

**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**

**平成25年度 総括・分担研究報告書**

**(H24 - 医薬 - 指定 - 014)**

**研究代表者 手島 玲子**

**平成26年3月**

# 目次

## ・総括研究報告書

- 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 …… 1  
手島 玲子

## ・分担研究報告書

1. 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究 …… 7  
手島 玲子
2. 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析 …… 2 3  
伊東 祐二
3. 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての  
動物モデルに関する研究 …… 3 7  
安達 玲子
4. 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査 …… 5 1  
板垣 康治
5. 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査 …… 6 1  
海老澤 元宏
6. 医薬部外品等の国内のアレルギー発症の事例調査並びに事後の  
経過観察 …… 6 5  
福富 友馬
7. 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 …… 7 3  
松永 佳世子
8. 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討 …… 8 3  
五十嵐 良明

## ・研究成果の刊行に関する一覧表

…… 8 9

## 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

研究代表者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

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を遂行するために、1 主任研究者、7 分担研究者を中心として、10 機関にわたる研究グループを組織した。1) 動物モデルを用いたアレルギー性の解析、2) 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析、3) 国内外のアレルギー事例の調査並びに事後の経過観察、4) 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討に関する研究を行った。

### 研究分担者

安達 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
板垣 康治	北海道文教大学人間科学部 健康栄養学科 教授
五十嵐 良明	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 部長
伊東 祐二	鹿児島大学理工学研究科 生命化学専攻課程 教授
海老澤 元宏	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 部長
福富 友馬	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 診断・治療薬開発研究室 室長
松永 佳世子	藤田保健衛生大学医学部 皮膚科学 教授

### A. 研究目的

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、小麦加水分解物(HWP)を含む医薬部外品(茶のしずく石鹸)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。

医薬部外品等においては、その原料の成分規格は医薬部外品原料規格などに準拠し、品質の確保が行われている。ただし、注意しなければならない点としては、問題となっている小麦加水分解物(茶のしずく石鹸に使われていたグルパール19S)においても、他の小麦加水分解物とは製造工程が異なり、グルテンを高温(95 )で40分間の条件で、部分酸加水分解したものであるものの、最終的には既存の成分規格には適合したものとして流通し、使用されていたことである。すなわち、成分規格には適合していても、製造工程の違いによって重篤なアレルギー反応を惹起するような製品が流通する可能性があるということである。

本研究では、まず小麦加水分解物に注目し、その製造工程の違いによって生じるアレルギー反応の惹起性について、動物モデルによる生体反応の解析と、ファージディスプレイ法による網羅的抗原性解析等を実施し検討を行う。ここから得られた成果を基に、現行の成分規格の改定の検討を

行い、医薬部外品等の安全性の確保を目指す。

また、小麦同様、他の原材料による健康被害の発生も予想されることから、国内外の健康被害の状況を調査の上、小麦加水分解物で得られた知見を基に、アレルギー反応の誘起性や成分規格の改定についての検討を行う。

医薬部外品等ではこれまで重大な健康被害が発生することは考えられていなかったため、詳細な研究は行われておらず、本研究による原因の解析とそれによる成分規格の改善については、医薬部外品等の安全性を高める観点から必要な研究である。

## B. 研究方法

医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究並びに総括を手島研究代表者が担当し、医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての動物モデルに関する研究を安達班員が担当し、医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析を伊東班員が担当し、医薬部外品等の国内のアレルギー発症の事例調査並びに事後の経過観察を福富班員が担当し、医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査を板垣班員が、医薬部外品等の国内外のアレルギー発症事例の文献調査を海老澤班員が担当し、医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討を五十嵐班員が担当し、医薬部外品等によるアレルギー発症例の調査と診断法に関する研究を松永班員が担当した。また、医薬部外品成分等によるアレルギーの実態調査については、北海道内で開業または医療機関に勤務している医師の協力を得た。また、加水分解小麦のゲルクロマトグラフィー等を用いる物性解析で、製品評価技術基盤機構の協力を得、動物モデルを用いる研究の病理解析では、当所病理部の協力を得た。

## C. 研究結果 及び D. 考察

### [ ] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

医薬部外品・化粧品には米や小麦などの食品を原材料とするものがあるが、これらのうち特定の

食品にアレルギーを持つ患者が当該食品を原材料とする医薬部外品・化粧品等を使用した場合に、アレルギー症状等を引き起こす可能性が指摘されている。近年、加水分解小麦 (HWP) を含有する洗顔石鹸の長期使用により小麦アレルギーを発症する事例が数多く報告され、社会的に大きな問題となった。本研究では、HWP に特徴的に発現するタンパク質の物性に関する研究を行うことを目的とし、(i)加水分解条件が異なる HWP(酸加水分解及びアルカリ加水分解小麦グルテン)を調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価を行い、(ii)茶のしずく石鹸に使われていた酸加水分解小麦(HWP, グルパール 19S) と 139 例の茶のしずく (HWP) 患者血清で感作されたヒト化マスト (RS-ATL8) 細胞を用いて、EXiLE 法にて細胞の活性化を促すかどうかの検討を行い、診断に使用できるかどうかの評価を行った。

(i)では、HWP の医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準策定も指向し、HWP のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析による分子量測定、及び定量的プロテオーム解析を用いた脱アミド化分析を行った。その結果、分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められ、脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。(ii)では、19S-EXiLE 法と 19S-ELISA 法の比較を ROC 曲線を用いて行ったところ、EXiLE 法は、感度は、ELISA 法より低い、特異度は高く、確定診断に用いることのできる試験であることが示された。

### [11] 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

茶のしずく小麦アレルギーの原因となる IgE 抗体の特性解析を行うため、患者由来の IgE 単鎖 Fv 抗体ライブラリを構築し、グルテンならびにグルパール 19S に対するバイオパンニングによって、疾患の原因と考えられる特異クローンの単離を行った。

得られたクローンの多くは、グルテンに対する結合活性を有するものの、グルパール 19S に対する特異性は示さなかった。グルパール 19S に特異性をもつクローンが得られなかった原因として、目的の抗体遺伝子の存在率が低く、また、バイオパンニングによる濃縮効率が低いことが考えられた。そこで、バイオパンニング前後でのライブラリ中の抗体配列を次世代シーケンサーによって網羅的に解析することで、特異クローンの解析を進めた結果、複数種のグルテン、並びに、グルパール 19S に特異的な IgE 抗体の VH 配列の特定に成功した。

このような小麦アレルギーでの IgE の特性の違いを明らかにすることで、茶のしずく発症の機構、さらには予防に対する展開を図っていくことが可能と思われる。

#### [III] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての動物モデルに関する研究

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されなことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール 19S と同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感作性や影響要因の詳細に関する解析を進めることにより、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積できると思われる。

#### [IV] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

北海道内の医療機関に勤務する医師、および開業医を対象として、小麦以外の加水分解物が添加された化粧品、医薬部外品によるアレルギー発症に関するアンケート調査を実施した。アンケートは 3995 名の医師に配布し、278 名から回答が得ら

れ回収率は 7.0%であった。小麦以外的小麦加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例については、3 名の医師が症例を経験していた。原因物質などの特定はできなかった。発症例については、アナフィラキシーなど重症化の可能性も示唆された。

食品由来であっても、化粧品や医薬部外品に使用される場合には、アレルギー発症のリスクがあることを、医師を介して、あるいは、国民へ直接、効果的に情報を伝えることが重要であると思われる。

#### [V] 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

医薬部外品のうち内服薬による健康被害に関して文献的調査を行うことを目的とした。方法：医薬部外品のうち内服薬によるアレルギー発症事例について、本邦および諸外国における報告事例を過去 10 年(2004～2013 年)にわたり調査を行った。結果：医薬部外品のうち内服薬による副作用報告は本邦においてウコンによる薬疹 4 例の報告が最も多かった。また、漢方に用いられる生薬では、麻黄、茴香(ウイキョウ)、縮砂(シュクシャ)による薬疹でそれぞれ 1 例、甘草によるアナフィラキシーで 1 例の報告を認めた。ビタミンでは、フルスルチアミン(ビタミン B1)による薬疹で 1 例、リン酸リボフラビンナトリウム(ビタミン B2)によるアナフィラキシーショックで 1 例の報告を認めた。諸外国では acetaminophen による蕁麻疹 13 例、アナフィラキシー 3 例の報告が最も多かった。考察：医薬部外品のうち内服薬による健康被害の報告は少ないが、比較的安全と考えられている成分でも健康被害を起こすことがあり、一層注意喚起することが必要であると思われる。

#### [VI] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

茶のしずく石鹼®(悠香)の使用によりその添加成分である加水分解小麦(グルパール 19S®)に経皮経粘膜感作されることによって発症した経口小麦アレルギーの症例の、発症の事後の経過に

ついて明らかにするために観察研究を行った。

本年度は生存時間分析 (Survival analysis) のモデルにより、石鹼使用中止後の経過期間と小麦アレルギー症状との関係について検討した。石鹼使用中止からの時間が経過するほど、略治状態まで改善する患者の割合が増加している傾向が示されているが、石鹼中止後 4-5 年を経過しても略治に至っているものは半数に達していない。現在、略治に至っていない者の臨床症状が、今後間違いなく改善して行くのかどうかも明らかでなく、これらの患者に関しては今後も注意深い経過観察が必要であると考えられた。

#### [VII] 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

近年、加水分解コムギ、グルパール 19S を含有した石鹼使用者に小麦アレルギー患者が多発し、社会問題化した。症例の約半数は、小麦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。分担研究者は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」委員長として、全国の症例の疫学調査を行い ELISA 法による特異 IgE 抗体の測定を施行した。その結果、2014 年 2 月 20 日時点、確実例は 2107 例で、女性 2020 例 (95.9%)、男性 87 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 代の女性であった。登録患者の都道府県別陽性症例数は、福岡県が第 1 位で 296 例、次いで北海道 123 例、東京都 123 例、第 4 位は大阪府 118 例、広島県 109 例であった。登録数は 2012 年 8 月をピークに徐々に減少しているが、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。

化粧品に含まれた加水分解蛋白による全身性の食物アレルギーは、加水分解コムギ以外にも起こり得る。分担研究者の施設では、化粧品に含まれた豆乳成分や、加水分解卵白などによる全身性の食物アレルギー症例を経験している。化粧品中のグルパール 19S 以外の小麦由来成分またはその他のタンパク成分によるアレルギーに関する

緊急疫学調査も実施し、その後の詳細な症例情報の平成 26 年 3 月時点における登録数は、19 以外の加水分解コムギ末における健康被害が疑われる症例は 3 例、コムギタンパク質以外の化粧品に含まれる成分における健康被害が疑われる症例は 10 例であった。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

特定の洗顔石けんの使用者に、小麦摂取による即時型アレルギーを発症する症例が増加し、大きな社会問題となった。本アレルギーは、石鹼に配合されていたグルパール 19S という成分によって引き起こされた事がわかった。グルパール 19S は、医薬部外品原料規格で加水分解コムギ末として収載されており、製品にもその名称で記載される。製造会社によると、現在の医薬部外品原料規格の試験法で規定される品質に関して逸脱はなかったという。他の分担研究者による昨年度までの研究で、加水分解コムギ末の製造法によって強いアレルギー性物質が生成するような物性変化が生じていることがわかった。小麦のような食品成分が経皮、経粘膜的に感作すること自体、想定されなかったことではあるが、現状の規格ではこのような健康障害を防止できなかったことが明らかになった。本研究では、加水分解コムギ末によるこのような健康被害の再発防止のため、これまでの研究班の結果をもとに、医薬部外品原料規格の改訂案を策定することとした。原材料グルテンの加水分解により短時間で一時的に分子量が増加し強い感作性を引き起こすこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し約 10,000 以下になったものでは感作性が認められなかったことから、この分子量をもとにした品質規格とその試験法を追加することとした。サイズ排除クロマトグラフィーを試験法として、分子量約 12,000 のチトクロム C を指標に、これ以下の分子量のものが一定量以上含まれることとした規格と試験法案を追加することを提案した。

## E. 結論

### [I] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

加水分解条件が異なる HWP として、酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンを調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価した。分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められた。脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。

また、19S-EXiLE 法を用いた研究に関しては、19S-ELISA 法に対して特異度では優れることが判明した。19S-EXiLE 法は、抗体の濃度検査だけではなく、抗体の機能の測定も行えることに特徴があり、ヒト好塩基球活性化試験(BAT)と同様に用いることも可能であると思われ、BAT と本試験の比較を行うことも重要と思われた。

### [II] 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

IgE 抗体ライブラリを使ったバイオパンニングと組み合わせられた次世代シーケンサーによる網羅的解析手法は、アレルギーの原因となる IgE 抗体配列の同定の上で、極めて有用であり、本法によって、小麦アレルギーの原因となる IgE のクローン配列が特定された。

### [III] 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての動物モデルに関する研究

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール 19S と同等の感作性が認められ、加水分解の進行

(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。

### [IV] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

・小麦以外の食品由来の加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例は確認されたが、非常に少なかった。しかし、発症した場合、アナフィラキシーなど重症化する可能性があるため、注意が必要である。

・食品由来であっても、化粧品や医薬部外品に使用される場合には、アレルギー発症のリスクがあることを医師を介して、あるいは、国民へ直接、効果的に情報を伝えることが重要である。

### [V] 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

医薬部外品のうち内用剤は、外用剤と比べて健康被害の報告は少なかった。しかし、比較的 안전と考えられている成分でも健康被害を起こすことがあり、一層注意喚起することが必要である。

### [VI] 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

小麦加水分解物(HWP)-WDEIA 群は、その小麦アレルギー感作ルートを反映して、眼瞼腫脹や鼻炎症状、顔面の腫脹など顔面や粘膜のアレルギー症状を認める症例が大半であった。また、通常的小麦アレルギー(CO-WDEIA)群では -5 グリアジン-IgE 抗体価の経年変化は認められなかったが、HWP-WDEIA 群においては石鹼使用中止後、全例において小麦、グルテン特異的 IgE 抗体価の減少傾向を認めた。ただし、症状改善の程度に個人差が存在することも同時に示唆され、今後の長期にわたる経過観察が必要であることが示された。

### [VII] 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

石鹼に含まれた加水分解コムギのグルパール 19S による即時型コムギアレルギーは全国で 2107 例の登録があった。登録数は 2012 年 8 月をピー

クに徐々に減少しているが、まだ、登録されていない症例もあることが推測された。

化粧品中のグルパール 19S 以外の小麦由来成分またはその他のタンパク成分によるアレルギーに関する調査も実施している。

#### [VIII] 医薬部外品の物性を考慮した成分規格の検討

加水分解コムギ末による健康被害の再発防止のため、これまでの研究の結果をもとにして、医薬部外品原料規格の改訂案を策定した。原材料グルテンの加水分解により短時間で一時的に分子量が増加し強い感作性を引き起こすこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し、感作性が認められなかったことから、分子量をもとにした品質規格とその試験法を追加することとした。定量性のあるサイズ排除クロマトグラフィーを試験法とし、分子量約 12,000 のチトクロム C を指標に、これ以下の分子量のものが一定量以上含まれるとする規格及び試験法を追加することを提案ができた。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

個別の研究報告書に記載済み。

#### **H. 知的財産権の登録**

なし

## 医薬部外品・化粧品に含まれる成分の物性に関する研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

### 研究要旨:

医薬部外品・化粧品には米や小麦などの食品を原材料とするものがあるが、これらのうち特定の食品にアレルギーを持つ患者が当該食品を原材料とする医薬部外品・化粧品等を使用した場合に、アレルギー症状等を引き起こす可能性が指摘されている。近年、加水分解小麦(HWP)を含有する洗顔石鹸の長期使用により小麦アレルギーを発症する事例が数多く報告され、社会的に大きな問題となった。本研究では、HWPに特徴的に発現するタンパク質の物性に関する研究を行うことを目的とし、(i)加水分解条件が異なるHWP(酸加水分解及びアルカリ加水分解小麦グルテン)を調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価を行い、(ii)茶のしずく石鹸に使われていた酸加水分解小麦(HWP, グルパール19S)と139例の茶のしずく(HWP)患者血清で感作されたヒト化マスト(RS-ATL8)細胞を用いて、EXiLE法にて細胞の活性化を促すかどうかの検討を行い、診断に使用できるかどうかの評価を行った。

(i)では、HWPの医薬部外品・化粧品の原材料の規格基準策定も指向し、HWPのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析による分子量測定、及び定量的プロテオーム解析を用いた脱アミド化分析を行った。その結果、分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められ、脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。(ii)では、19S-EXiLE法と19S-ELISA法の比較をROC曲線を用いて行ったところ、EXiLE法は、感度は、ELISA法より低い、特異度は高く、確定診断に用いることのできる試験であることが示された。

### 協力研究者

安達玲子 国立医薬品食品衛生研究所

代謝生化学部 室長

中村亮介 国立医薬品食品衛生研究所

医薬安全科学部 室長

渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所

食品部 室長

酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所

代謝生化学部 主任研究官

菊地博之 国立医薬品食品衛生研究所

食品部 主任研究官

中村里香 国立医薬品食品衛生研究所

代謝生化学部 研究員

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 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 主任

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 主査

### A. 研究目的

近年、加水分解小麦(HWP)を含有する医薬部外品・化粧品の長期使用において、小麦含有食品を摂取後に運動して全身性アレルギーである「アナフィラキシーショック」を発症した事例が数多く報告され、大きな社会問題となっている。現在、本課題研究に

参画する医療機関・研究機関が中心となって原因究明が進められているが、HWPの重篤なアレルギー反応機構の詳細については未だ不明な部分も多く、医薬部外品・化粧品原材料としてのHWPの規格基準を策定し、その品質及び安全性を確保することが望まれている。

本研究では、小麦グルテンの加水分解物であるHWPに特徴的に発現するタンパク質の物性に関する研究を行うことを目的とし、(i)加水分解条件が異なるHWP(酸加水分解及びアルカリ加水分解小麦グルテン)を調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分子量分布、脱アミド化を指標に評価を行い、(ii)茶のしづく石鹸に使われていた酸加水分解小麦(HWP, グルパール19S)と139例の茶のしづく(HWP)患者血清で感作されたヒト化マスト(RS-ATL8)細胞を用いて、EXiLEI (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression) 法にて細胞の活性化を促すかどうかの検討を行い、診断に使用できるかどうかの評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 加水分解条件が異なるHWPの物性に及ぼす影響の分析化学的解析

#### (1) 試料

グルパール19Sは株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma G5004)及びグルパール19S粉末を100 mg/mLとなるよう1M Tris (pH 11.4)に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製した。酸加水分解については、グルテンのストック懸濁液に、pH1となるように1N塩酸を加え、100のヒートブロック上で加熱した。他方、アルカリ加水分解については、グルテンのストック懸濁液に、pH12となるように1M水酸化ナトリウムを加え、100のヒートブロック上で加熱した。酸加水分解及びアルカリ加水分解は、0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24時間加熱した後、中和し加水分解を停止させ、グルテン終濃度10 mg/mLとなるようにPBSで希釈した。分解0時間のサンプルは、予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱を行わずに調製した。

#### (2) 分子量の測定

##### ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析

SDS-PAGEは、4-12%Bis-Trisゲル、MES SDSバッファーを用い各試料20 µgを電気泳動した後、コロイドブルーでタンパク質を染色した。

##### サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析

グルテン、グルパール19S、酸加水分解グルテン(0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h)、アルカリ加水分解グルテン(0h / 0.5h / 1h / 3h / 6h / 9h / 12h / 24h)について、各試料を下記測定条件で分析し、加水分解による経時的な分子量変化を測定した。

[測定条件]

カラム: GE Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)

移動相: Tris-HCl (pH7.4), 0.2M NaCl

流速: 0.75 mL/min

カラム温度: RT

検出波長: UV 210 nm

#### (3) タンパク質の脱アミド化の分析

##### 定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化分析

酸及びアルカリ加水分解物の0h, 0.5h, 1h, 9h, 12h試料のSDS-PAGEゲルレーンを10分割し、各切片をゲル内酵素消化装置(Proprep, Genomic Solutions)で洗浄・ジチオトレイトール(DTT)による還元・ヨードアセトアミドによるアルキル化・トリプシンによる消化を行った。得られたペプチド溶出液を減圧乾燥機で乾燥した。乾燥させた試料をサンプル溶解液(0.1%ギ酸, 2%アセトニトリル, 98%水)20 µLに溶かし、1分間以上振とう後、1時間以上静置し測定用試料とした。

[測定条件]

・HPLC

オートサンプラー: HTC PAL (CTC Analytics)

高速液体クロマトグラフ: Paradigm MS4 (Michrom)

BioResources)

インターフェース: ADVANCE Nano Spray Source  
(Michrom BioResources)

・MS

質量分析計: イオントラップ型質量分析計 LTQ XL  
(Thermo Fisher Scientific)

・LC/MS/MS 測定は、濃縮・脱塩用カラムによりペプチドの濃縮及び脱塩を行い、逆相C18カラムにより分離し、ナノエレクトロスプレーイオン化(nanoESI)法により溶出したペプチド断片をイオン化し、質量分析計へ導入し、MS 及び MS/MS スペクトルデータを取得した。各サンプルは繰り返し 4 回測定を行った。LC/MS/MS 測定の結果は、タンパク質同定ソフトウェア MASCOT(Matrix Science)を用い、下記のデータベースに対して検索を行った。公共データベース UniProt から“wheat” and (“gliadin” or “glutenin”)をキーワードに抽出された配列をデータベースとした。設定修飾は加水分解処理で想定される脱アミド化反応、グルタミンからグルタミン酸への変換(Q E)と、アスパラギンからアスパラギン酸への変換(N D)を追加した。酵素消化条件は、消化酵素を指定しない(None)条件とした。MASCOT 検索結果のうち、Ions score が 35 以上で rank top であるペプチドを有効とした。脱アミド化率の算出のため、定量的プロテオーム解析を実施した。解析方法は、量が多いものほど検出できる確率が高いという統計的概念を利用した非標識定量法を用い、修飾部位及び種類別のペプチドイオン検出回数を指標とした。脱アミド化には Q E と N D の 2 種が存在するが、グルテンはグルタミンの方がアスパラギンよりはるかに多く含まれているため、Q E をもって脱アミド化とした。

#### 蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化分析

グルテン総タンパク質の脱アミド化分析に関しては、前年度の検討条件より簡便、迅速、高感度化を試みた。タンパク質中に含まれるグルタミン及びアスパラギン残基について、ビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼン(BTI)試薬を用いたホフマン転位により脱炭酸反応を行い、塩酸加水分解後に生成したアミ

ノ酸を AccQ-Tag 法で蛍光ラベル化し、下記の測定条件において HPLC を用いて分析を行った。

#### [ホフマン転位反応]

タンパク質 1 mg に対して 40 mg の BTI 試薬をアセトニトリルに溶解し、ピリジン塩存在下 50 ℃、4 時間加熱してグルタミン及びアスパラギン残基の脱炭酸反応を行った。反応後、溶媒を真空乾燥し、BTI 試薬をクロロホルムで抽出除去した試料を水に再溶解し、等量の 6N 塩酸を加え 100 ℃ で終夜加水分解反応を行った。加水分解したアミノ酸は、ホウ酸緩衝液中

AccQ-Tag 法  
(AQC, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)で誘導体化した。

#### [HPLC 測定条件]

カラム: AccQ-Tag(粒径 4.0 μm、内径 3.9 mm×長さ 150 mm)

移動相 A: 12.5 mM リン酸緩衝液(pH 6.3)-アセトニトリル(100:1, v/v)

移動相 B: 12.5 mM リン酸緩衝液(pH 6.3)-アセトニトリル(70:30, v/v)

グラジエント溶出: 0 2%B (0 0.5 min), 2 4%B (0.5 7 min), 4 12%B (7 18 min), 12 31%B (18 26 min), 31 37%B (26 35 min), 37%B (35 55 min), 37 100%B (55 56 min), 100%B (56 65 min)

流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 37

蛍光検出: 励起 250 nm / 蛍光 395 nm

## 2. グルバール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

### 患者血清

藤田保健衛生大学より供与されたのべ 139 検体の患者血清について解析を行なった。検体は 19S-ELISA による抗体価<sup>1)</sup>、skin prick test (SPT)、および小麦製品摂取時の症状により 15 群に群分けされている。さらに、経時的に採血と ELISA による評価ができていた症例が 8 例あり、これらについては 19S

の抗体価が 10 unit 以上減少した群(5例)と変わらなかった群(3例)とに分けた。血清は使用直前まで -80 のディープフリーザーに保存した。

#### 細胞

RS-ATL8 細胞は、10%の非働化ウシ胎児血清(FCS; ニッスイ)と 500  $\mu$ g/mL geneticin、200  $\mu$ g/mL hygromycin B、penicillin/streptomycin を添加した MEM 培地(Gibco)を用い、一週間に一度 1:20 で継代しつつ、37 の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で維持した<sup>2-5)</sup>。

#### EXiLE 法

サブコンフルエントのRS-ATL8細胞をセルスクレイパーで採取し、培地で  $1.0 \times 10^6$  cells/mL に調整した。ここに患者血清を 1/100 量加え、クリアボトム 96 well 白色プレート(PerkinElmer ViewPlate)に  $5 \times 10^4$  cells/50  $\mu$ L/well 播種し、37 の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で一晚(20 時間)感作した。翌日、HydroSpeed(Tecan)を用いて PBS により細胞を穏やかに 3 回洗浄し、ただちに培地に希釈した抗原溶液を 50  $\mu$ L/well 添加して 37 で 3 時間インキュベートした。プレートを常温に戻し、基質液 ONE-Glo (Promega)を 50  $\mu$ L/well 添加した後、ルミノメータ EnVision (PerkinElmer)により発光を測定した。EXiLE の応答性は、各ウェルからブランクを差し引いた後、duplicate の平均値について、感作のみ行ない刺激を行わない条件を 1.0 とした場合の相対値として表した<sup>2-5)</sup>。

#### 抗原溶液

EXiLE 法で用いた抗原溶液は、グルパール 19S (片山化学工業より供与)および小麦グルテン(以後「Glu」; Sigma)を用いた。無菌 PBS により 1 mg/mL のストック懸濁液を作製し、細胞培養に用いるものと同様の培地で順次希釈して、100 pg/mL ~ 10  $\mu$ g/mL とした<sup>2,5)</sup>。また、陽性対照として、100 ng/mL のヤギ抗ヒト IgE 抗体(Bethyl)を用いた。

#### ROC 曲線解析

上記の濃度範囲で刺激した際の最大の EXiLE 応答を用い、GraphPad Prism により ROC 曲線解析を行

なった。症例の陰陽性の判定は、19S による SPT、19S-ELISA(カットオフ値 3 unit)、小麦製品摂取時のアナフィラキシーの有無、同じく呼吸困難の有無、によって分類した。また、19S-ELISA の unit および Glu 特異的 IgE(ImmunoCAP)の濃度(U<sub>A</sub>/mL)についても、同様に ROC 曲線解析を行なった。19S の EXiLE 応答と ELISA については、ROC 曲線上の対角線から最も遠い点より至適カットオフ値を求め、2 × 2 分割表を作成し、感度・特異度・陽性一致率・陰性一致率を求めた。

#### 統計処理

19S および Glu による EXiLE 応答、19S-ELISA、Glu 特異的 IgE については、スピアマンの順位相関係数を求め、相関を調べた。

### **C. 研究結果**

#### **1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析**

##### **(1) 分子量の測定**

##### ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析

酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE を図 1 に示す。酸加水分解物の分子量は、経時的に低分子化し、0.5h 加水分解物がグルパール 19S と最も類似した泳動パターンを示した。他方、アルカリ加水分解物においても、酸分解物と同様に経時的に低分子化し、0.5h 加水分解物がグルパール 19S と最も類似したパターンを示したが、酸加水分解物と比較して 12h 以降においても 20-10kDa のスミアなバンドを認めた。

##### サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析

酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンのサイズ排除クロマトグラムを図 2 に示す。グルパール 19S の SEC 分析の結果より、分子量マーカー 669,000 以上を頂点とする鋭いピークをフラクション A、分子量マーカー 6,500 ~ 669,000 を範囲とする幅広いピークをフラクション B とした。グルパール 19S はフラクション A が顕著に認められ、フラクション B は分布領

域 5,000 ~ 700,000 で中心分子量は 200,000 であった。酸加水分解グルテンでは、フラクション A は 0.5 ~ 3h まで顕著に認められ、6 ~ 24h ではほとんど見られなくなった。フラクション B は 0.5h で分布領域 5,000 ~ 700,000(頂点 200,000)から 24h の分布領域 3,000 ~ 10,000(頂点 7,000)まで、領域と頂点位置ともに反応時間とともに低分子側へシフトした。他方、アルカリ加水分解では、フラクション A はすべての試料においてほとんど認められなかった。フラクション B はアルカリ加水分解開始後すぐに、分布領域 2,000 ~ 40,000(頂点 10,000)の低分子まで分解され、0.5 ~ 3h までは継時的な低分子化が見られるが、それ以降はほとんど変化が認められなかった。

## (2) タンパク質の脱アミド化の分析

### 定量的プロテオーム解析法を用いた脱アミド化分析

検出されたペプチド全体のグルタミンのイオン検出数に占める脱アミド化されたグルタミンのイオン検出数の割合を脱アミド化率として図 3 に示す。酸加水分解グルテンに関しては加水分解時間が長くなるに伴って脱アミド化が進行し、分解時間 9h を経過すると脱アミド化率が 80%程度に達することが示された。分解時間 1h において脱アミド化率が 45%であり、グルパール 19S の脱アミド化率(48%)とほぼ同等であった。また、アルカリ加水分解物については、加水分解時間が長くなるに従って脱アミド化の進行が認められたものの、酸加水分解物と比較して変化は緩やかであり、分解時間 12h における脱アミド化率は 45%であった。

### 蛍光プレラベル化 HPLC 法を用いた脱アミド化分析

AccQ-Tag 法で誘導体化したアミノ酸標準品を HPLC で分析し、システム適合性(性能及び再現性)を確認した。ホフマン転位によって脱炭酸されたグルタミン残基のジアミノ酪酸誘導体への変換効率、及び気相による簡易加水分解の条件を検討し、次年度の研究において、酸及びアルカリ加水分解グルテンの脱アミド化の定量的評価を行う予定である。

## 2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

### 代表的な EXiLE 応答

各検体とも、抗ヒト IgE 抗体による刺激では、2 倍以上のルシフェラーゼ発現を示した。図 5 に代表的な EXiLE 応答を示す。なお、カットオフ値は、後に述べる ROC 曲線解析の結果より、1.311 とした。抗原として 19S と Glu を用いたが、139 例中、(A)両抗原に回答するものが 15 例、(B)19S にのみ回答するものが 60 例、(C)Glu にのみ回答するものが 7 例、および (D)いずれにも回答しないものが 57 例となった。(B)で示すように、EXiLE 応答はしばしば逆 U 字型の応答曲線を示すため、これらの濃度範囲における最大の応答を以降の解析に用いた。

### ROC 曲線解析

19S または Glu で刺激した際の EXiLE 応答、19S の ELISA、および Glu の ImmunoCAP の各数値が 19S による SPT 結果(+/-)を正しく予測できるかどうかについて、ROC 曲線解析を行なった(図 6)。その結果、19S-EXiLE の曲線下面積 (AUC) は 0.8328、 $P < 0.0001$  と、優れた診断的有用性を示した。しかし、最もパフォーマンスが高かったのは 19S による ELISA であった (AUC=0.9280)。また、SPT 以外に、19S-ELISA の有無(カットオフ値 3 unit)、小麦製品摂取時アナフィラキシーの有無、および小麦製品摂取時呼吸困難の有無について、前掲 4 種の試験の ROC 曲線解析を行なった結果を、Table 1 にまとめた。19S 特異的 IgE の有無については、当然ながら 19S-ELISA との相関は AUC=1 となるが、次に相関が高かったのは 19S-EXiLE であった(AUC=0.9015)。アナフィラキシーの発現については、Glu-ImmunoCAP (AUC= 0.672) と、Glu-EXiLE (AUC=0.6451)、19S-ELISA (AUC=0.6186) が  $P < 0.05$  のやや強い相関を示したが、呼吸困難の発現についてはいずれのパラメータも有意な相関はなく、診断的有用性は認められなかった。Glu-EXiLE はいずれのクライテリオンとも相関せず、HWP への感作の診断としては適用できないことが示された。

感度・特異度・陽性一致率 (PPV)・陰性一致率 (NPV)

図 6A の 19S-EXiLE の SPT に対する ROC 曲線において、対角線から最も遠い曲線上の点から診断パフォーマンスが最大となる至適カットオフ値を求めたところ、1.311 (fold)であった。同様に、19S-ELISA (図 6B)について求めると、11.0(unit)であった。これらを至適カットオフとして 19S に関する EXiLE 法および ELISA 法の結果を 2×2 分割表にまとめると、Table 2 のようになる。なお、ELISA の結果に空欄があるため、両試験の総数は一致しない。この結果から、19S による SPT の陽性 / 陰性結果を予測するにあたって、EXiLE 法は ELISA 法に比べて特異度はやや高いが (0.9444 > 0.9118)、感度は劣っている (0.7087 < 0.8911)ことが示唆された。

#### EXiLE 応答の強度と血清中 IgE レベルの相関

EXiLE や ELISA、ImmunoCAP のパラメータ間の相関についてスピアマンの順位相関係数を求めると、19S-EXiLE と 19S-ELISA は非常に高い相関 ( $R=0.8767$ )を示すことがわかった (Table 3)。一方、Glu に関しては、ROC 曲線解析の結果からも予想される通り、Glu-ImmunoCAP と Glu-EXiLE の相関は低かった ( $R=0.2026$ )。

#### 経時的に採血した血清 IgE による EXiLE 法

EXiLE 法は、好塩基球活性化試験と同様に、IgE の架橋を調べることができるという特徴を持つが、前者は保存血清を用いた後方視的研究に適用することができるが、後者はできないという違いがある。そこで、経時的な採血と ELISA による 19S 特異的 IgE 抗体価測定ができた 8 例について、EXiLE 法による解析を行なった。8 例はすべて女性で、年齢は 25 歳から 68 歳であった。このうち、追跡中に 19S 特異的抗体が ELISA で 10 unit 以上減少したものが 5 名、大きな変化がなかったものが 3 名であった (data not shown)。19S-EXiLE のカットオフ値を Table 2 の時と同様に 1.311 とすると、抗体価が減少した 5 例のうち、最終的に 19S-ELISA が 10 unit 以下にまで減少した 3 例 (subject No.1, 3, 5)については、EXiLE 試験の結果も陰性となった。一方、抗体価が減少しなかった 3 例については、3 例とも EXiLE 試験も陽性のまま変化が

なかった。図 7A-B に大きく抗体価が減少し 19S-ELISA が 10 unit 以下になった例として subject No.1 を、図 7C-D に減少はしたが 10 unit 以下にはならなかった例として subject No.2 を、そして抗体価に変化がなかった例として subject No.6 を Fig. 3E-F に示した。Subject No.1 の変化は非常に顕著で、19S および Glu とともに反応が陰性化した (図 7A-B)。Subject No.2 では、IgE 減少後も 19S-EXiLE の最大応答は 1.414 (> 1.311)であり、陰性化していない (図 7C)。これは、19S 特異的 IgE が 10 unit 以上の検体に限れば EXiLE 試験の判定と SPT 結果がよく対応するようになるという結果と矛盾しない。一方、半年間で 3 回の採血を行なった subject No.7 では、19S の抗体価にはほとんど変化がなかったにもかかわらず、EXiLE 応答は時間とともに減弱していた (図 7E)。ただし、カットオフ値を下回ったわけではなかった。

## D. 考察

### 1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析

#### (1) 分子量の測定

一般的なアレルゲンタンパク質の抗原性を考慮する際に、抗体産生を誘導する抗原の分子量は 10,000 以上であることが知られている。そこで、10,000 に近い分子量マーカー 12,400 である Cytochrome C の溶出時間 (23.5min) を基点とし、「分子量の大きい領域 (Cytochrome C より早く出現するピークエリアの合計)」と「分子量の小さい領域 (Cytochrome C より遅く出現するピークエリアの合計)」の面積比を算出した (図 4)。酸加水分解物、アルカリ加水分解物ともに、加水分解の進行に伴い「分子量の小さい領域」が占める割合が高くなり、反応終了時 (24 時間) に酸加水分解物は 81.1%、アルカリ加水分解物は 67.6%となった。マウスを用いた経皮感作性試験の結果と併せて勘案し、経皮感作性を示さない加水分解コムギの規格基準を策定する際に、SEC のデータは有用であると考えられた。

#### (2) タンパク質の脱アミド化の分析

グルパール 19S 及び感作性を示す酸加水分解グルテン(0.5h 分解)の脱アミド化率は 50%程度であった。アルカリ加水分解では、分解時間が長くなるに従って脱アミド化の進行が認められたものの、脱アミド化の割合の変化は酸加水分解と比較して緩やかであった。酸及びアルカリ加水分解グルテンの抗原性に関する知見を集約し、「分子量」と「脱アミド化率」の2つ異なる物性を評価することで、抗原性を評価することが可能であると考えられた。

アミノ酸分析ではプレカラム誘導体化 HPLC 法が多く用いられ、誘導体化試薬としては、AQC、OPA(o-phthaldehyde)、ダンシルクロライド、PITC(phenylisothiocyanate)などが汎用されている。これらの中でも、AQCを用いる誘導体化法は、ワンポット、数秒間の反応で誘導体化反応が完了し、極めて安定性の高い蛍光誘導体化物を生成することが可能である。また、他の方法に比べ副反応も起こりにくく、高感度で簡便、迅速なアミノ酸分析を行うことができることから、AQC 誘導体化を用いたグルテン総タンパク質の脱アミド化分析法の構築を目指す。

## 2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

本研究では、新しい in vitro アレルギー試験法である「EXiLE 法」が、19S への感作を証明するための手法としてどの程度有用性があるかについて、従来法の ELISA 法と比較しつつ解析した。

ROC 曲線解析によると、19S-EXiLE のパフォーマンスは AUC=0.8328 で、至適カットオフ値(1.311)における感度は 0.7087、特異度は 0.9444 であった。それぞれ 0.8911 と 0.9118 であった ELISA 法と比較すると、EXiLE 法は高特異度試験であり、陽性結果をもって確定診断することは可能であるが、陰性結果については偽陰性の可能性を排除できなかったため、除外診断に用いることは難しいと思われる。特に 19S 特異的 IgE が低値の血清において EXiLE 法の成績がよくなかったが、EXiLE 法の標準的なプロトコルでは、補体による細胞傷害性を避けるため、ヒト血清を 100 倍に希釈して用いる必要があるため、このために抗体

価の低い血清の応答を調べるにはやや感度が不足するであろうと推察された。実際、19S-ELISA により測定した 19S 特異的 IgE が 10 unit 以上の検体に限れば、EXiLE 法の感度は 0.8046(70/87)に増加し、40 unit 以上では 0.9792(47/48)に達することからもそれが伺える(data not shown)。

EXiLE 応答の強度と血清中 IgE レベルについては、19S については高い相関( $R=0.8767$ )が認められたが、Glu に関しては相関は非常に低いことがわかった( $R=0.2026$ )。むしろ 19S-EXiLE との相関の方が高く( $R=0.659$ )、この事実は、ImmunoCAP で測定される「Glu 特異的 IgE」の大半は、Glu そのものではほとんど架橋されず、19S をより強く認識している可能性を示唆するものと思われる。

最近、横大路ら<sup>9)</sup>により、茶のしずく石鹸患者 IgE は脱アミド化された グリアジンに強く結合し、脱アミド化前の グリアジンにも弱く交差反応できることが示されたが、このことは本研究結果の知見とよく合致する。

## E. 結論

### 1. 加水分解条件が異なる HWP の物性に及ぼす影響の分析化学的解析

加水分解条件が異なる HWP として、酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンを調製し、処理方法の違いがタンパク質の物性に及ぼす影響を分析化学的に評価した。分子量に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って低分子化が認められた。脱アミド化に関しては、酸及びアルカリともに加水分解の進行に伴って脱アミド化が進行したが、酸加水分解と比較してアルカリ加水分解は脱アミド化の変化が緩やかであった。

### 2. グルパール 19S-EXiLE 法の臨床診断への応用に関する検討

19S-EXiLE 法は 19S-ELISA 法に対して特異度ではやや優るものの感度では劣っており、簡便さやコストの面からも、スクリーニング法としては ELISA を用いる方が適切であろうと思われた。しかし、19S-EXiLE

法の特徴を考えれば、抗体の濃度検査だけでなく、抗体の機能の測定も行えることに特徴があり、ヒト好塩基球活性化試験(BAT)と同様に用いることも可能であると思われ、BAT と本試験の比較を行なうことも重要と思われる。

#### (参考文献)

- 1) 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* (in press).
- 2) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of allergenicity of acid-hydrolyzed wheat protein using an in vitro elicitation test. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;160:259-64.
- 3) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy* 2010;65:1266-73.
- 4) Nakamura R, Ishiwatari A, Higuchi M, Uchida Y, Nakamura R, Kawakami H, Urisu A, Teshima R. Evaluation of the luciferase assay-based in vitro elicitation test for serum IgE. *Allergol Int* 2012;61:431-7.
- 5) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1436-8.
- 6) Yokooji T, Kurihara S, Murakami T, Chinuki Y, Takahashi H, Morita E, Harada S, Ishii K, Hiragun M, Hide M, Matsuo H. Characterization of causative allergens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat proteins in facial soap. *Allergol Int* 2013;62:435-45.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013; 132; 1436-1438.
- 2) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. *Clinical Immunology & Allergology* 2013; 59, 598-602.
- 3) 手島玲子:食物アレルギーの話、日本小児アレルギー学会誌, 27(1), 15-19 (2013)
- 4) Teshima R: Food Allergen in Cosmetics, *Yakugaku Zasshi*. 2014;134(1): 33-38.
- 5) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. *Clinical Immunology & Allergology* 2013; 59, 598-602.

##### 2. 学会発表

- 1) 安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小麦タンパク質経皮感作能への酸加水分解の効果に関するマウスモデル実験系を用いた検討 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013. 5)
- 2) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、小麦グルテンはトランスグルタミナーゼ処理により酸加水分解小麦と同様のIgE反応性を獲得する 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013. 5)
- 3) 中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、齋藤嘉朗、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、酸加水分解コムギ特異的的患者血清IgEはトランスグルタミナーゼ処理小麦グルテンと交差反応する 第20回日本免疫毒性学会学術大会 (2013. 9)
- 4) 曹永晩、安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小川久美子、BALB/c マウスにおける酸加水分解コムギタンパク質による経皮感作に関する免疫学的及び病理組織学的解析 第20回日本免疫毒性学会学術大会 (2013. 9)
- 5) 酒井信夫、中村里香、齋島由二、福井千恵、鈴木孝昌、中村亮介、蜂須賀暁子、安達玲子、手

- 島玲子、加水分解小麦(グルパール 19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013. 11)
- 6) 佐々木和実、西嶋桂子、安宅花子、酒井信夫、手島玲子、小麦グルテンの酸加水分解時間による分子量分布・脱アミド化率の変化 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)
- 7) 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)
- 8) 手島玲子、中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、加水分解小麦による小麦アレルギー発症の基礎的検討 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013. 11)
- 9) 手島玲子、経皮感作のメカニズムと食物感作のクロストーク 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総合学術大会(2013.12)
- 10) Sakai S, Adachi R, Nakamura R, Kimura Y, Nakamura R, Sasaki K, Nishijima K, Ataku, H, Fukutomi Y, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Molecular profile analysis of allergenic acid hydrolyzed wheat protein. 53rd Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo (2014. 3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

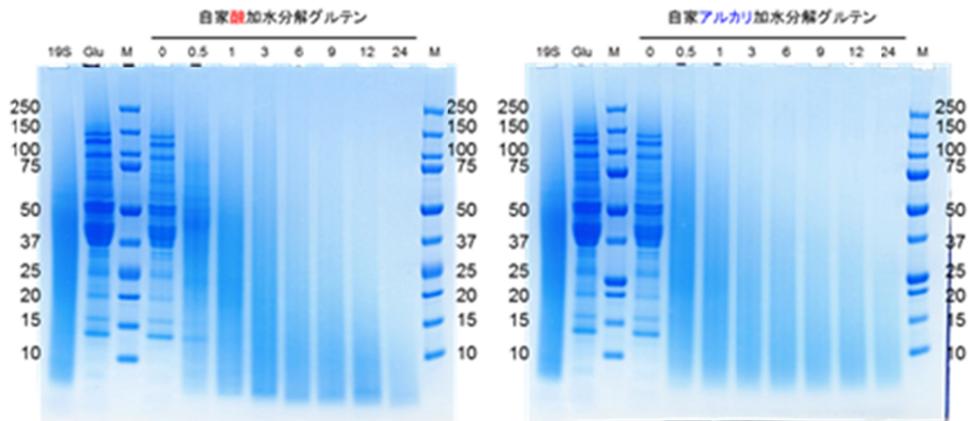


図1 酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンのSDS-PAGE

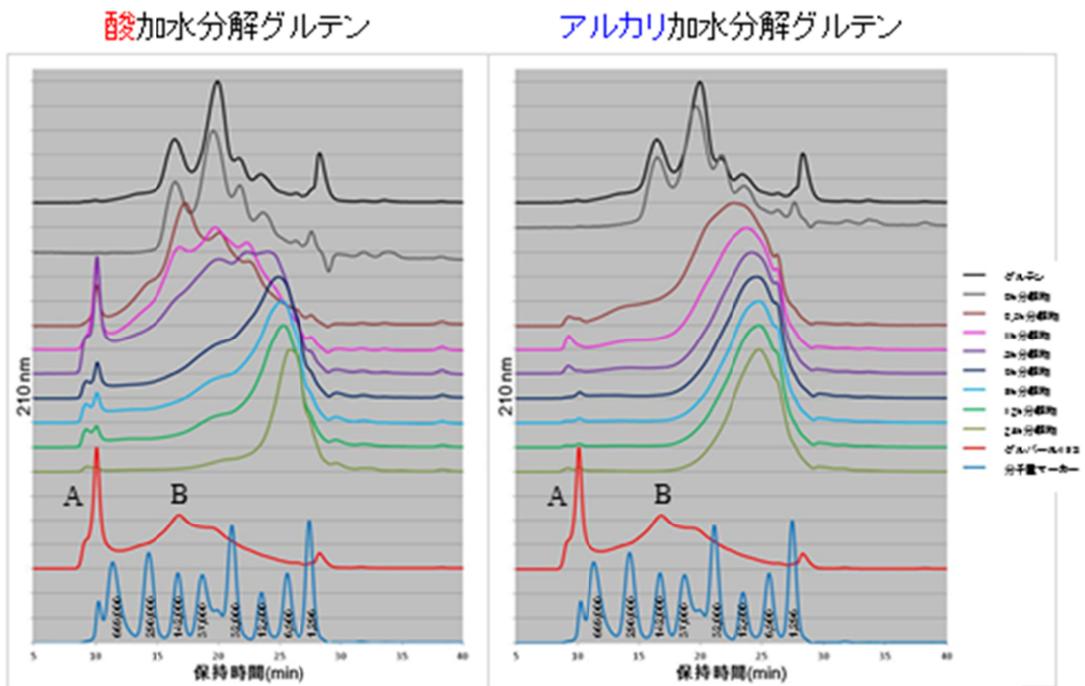


図2 酸加水分解グルテン及びアルカリ加水分解グルテンのサイズ排除クロマトグラム

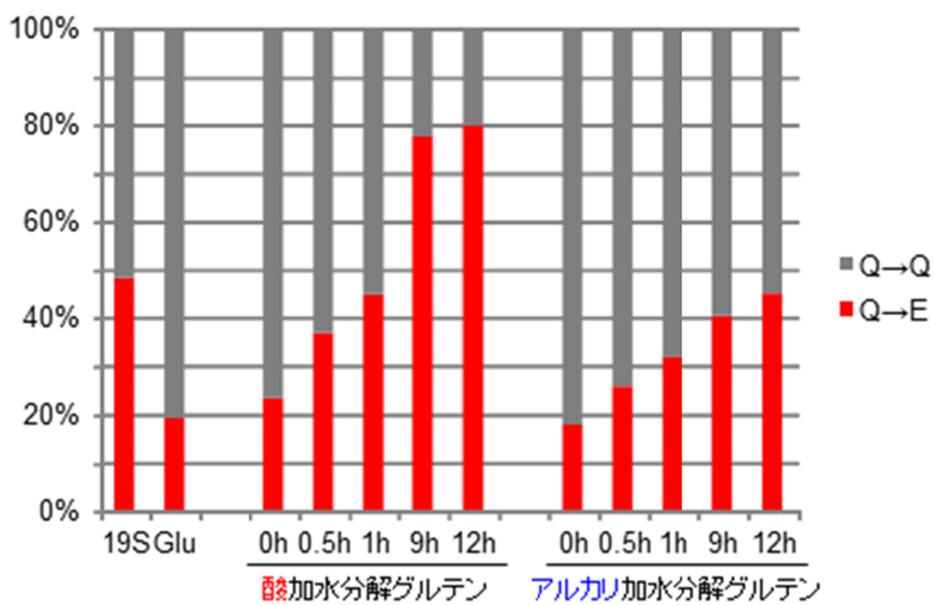


図3 検出ペプチド中のグルタミンの脱アミド化率

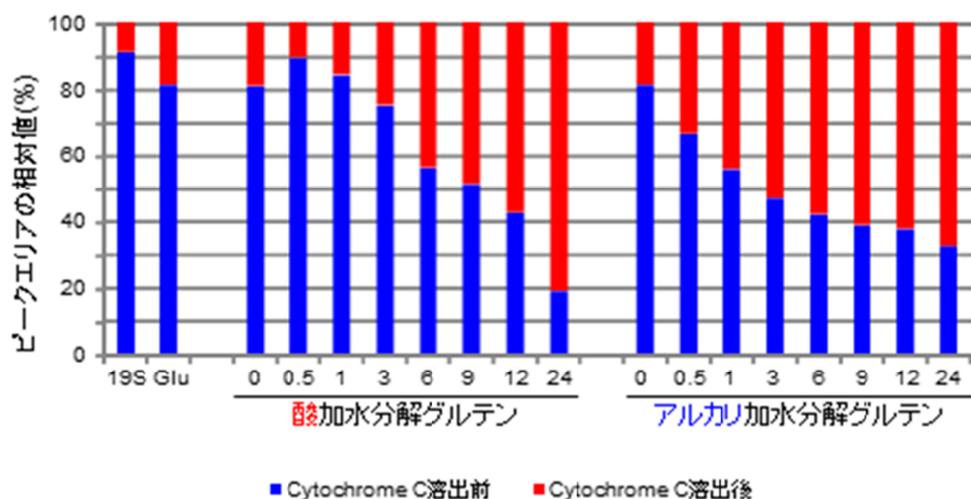


図4 加水分解の進行によるSECピークエリアの推移

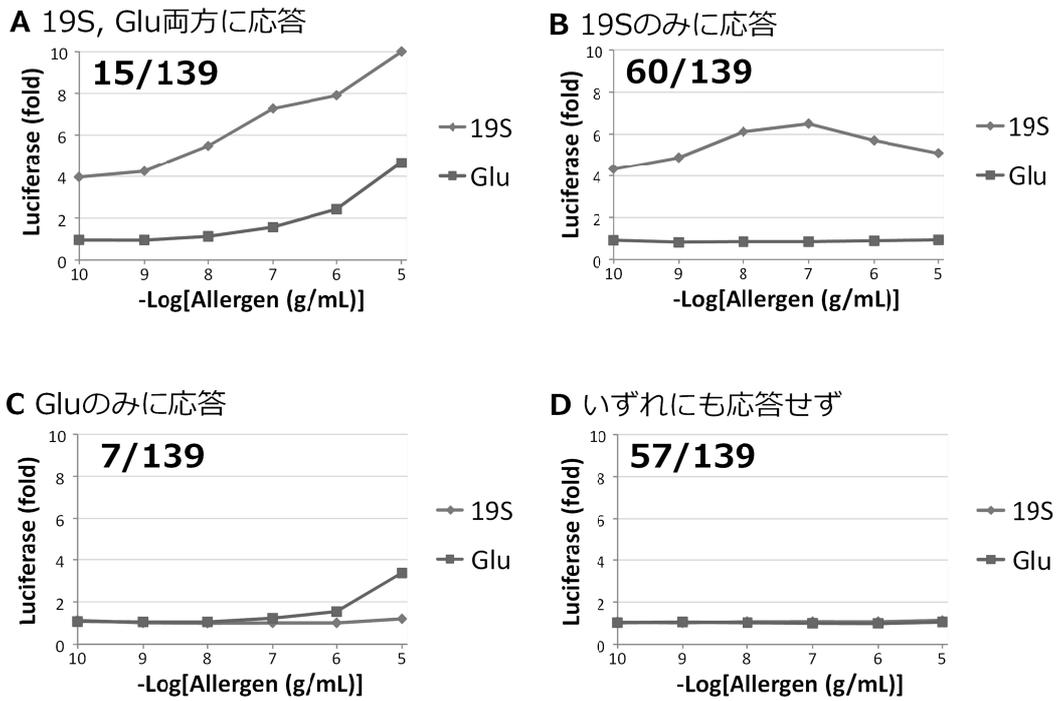


図 5. 代表的な EXiLE 応答パターン

100 倍希釈した患者血清により RS-ATL8 細胞を一晩感作し、100 pg/mL ~ 10 μg/mL の 19S または Glu により 3 時間刺激した。応答は、培地のみを加えたコントロールを 1.0 とした場合の相対値で示す。応答は、19S と Glu 両方に応答するもの(A)、19S にのみ応答するもの(B)、Glu にのみ応答するもの(C)、および両方に応答しないもの(D)に分類できる。

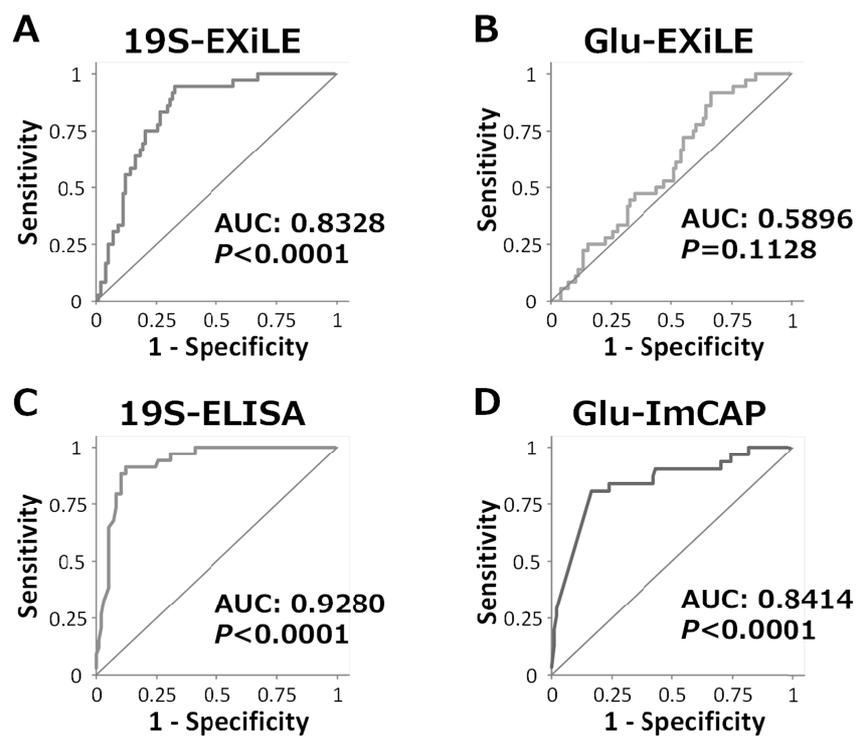


図 6. ROC 曲線解析

19S による SPT に対する、(A) 19S-EXiLE、(B) Glu-EXiLE、(C) 19S-ELISA、(D) Glu-ImmunoCAP の ROC 曲線解析を行なった。曲線下面積(AUC)およびその P 値を示す。(A)において至適カットオフ値は 1.311、(C)においては 11.0 unit であった。

Table 1. ROC curve analysis of 19S-EXiLE, Glu-EXiLE, 19S-ELISA, and Glu-ImmunoCAP

19S-EXiLE (maximum fold)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.8328	0.9015	0.6451	0.5797
Std. Error	0.03564	0.02499	0.04973	0.04949
95% confidence interval	0.7629 to 0.9026	0.8525 to 0.9505	0.5476 to 0.7426	0.4827 to 0.6767
P value	< 0.0001	< 0.0001	0.0102	0.1141
Glu-EXiLE (maximum fold)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.5896	0.525	0.5561	0.5817
Std. Error	0.05122	0.04987	0.05652	0.04998
95% confidence interval	0.4892 to 0.6900	0.4272 to 0.6228	0.4453 to 0.6669	0.4838 to 0.6797
P value	0.1128	0.6451	0.3203	0.1051
19S-ELISA (unit)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.928	1	0.6186	0.5566
Std. Error	0.0229	0	0.05203	0.0502
95% confidence interval	0.8831 to 0.9729	1.000 to 1.000	0.5166 to 0.7206	0.4582 to 0.6550
P value	< 0.0001	< 0.0001	0.03609	0.2619
Glu-ImmunoCAP (UA/mL)	vs. SPT	vs. 19S-ELISA	vs. Anaphylaxis	vs. Dyspnea
Area under the ROC curve				
Area	0.8414	0.8448	0.672	0.5797
Std. Error	0.0439	0.03749	0.05188	0.05079
95% confidence interval	0.7553 to 0.9274	0.7713 to 0.9183	0.5703 to 0.7737	0.4801 to 0.6793
P value	< 0.0001	< 0.0001	0.002587	0.1233

Table 2. Sensitivity, specificity, PPV, and NPV

		19S-EXiLE		19S-ELISA	
		+	-	+	-
SPT	+	73	30	90	11
	-	2	34	3	31
Sensitivity		0.7087		0.8911	
Specificity		0.9444		0.9118	
PPV		0.9733		0.9677	
NPV		0.5313		0.7381	

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 3. Spearman's rank correlation study

Compared tests :	19S-EXiLE	19S-EXiLE	Glu-EXiLE	19S-EXiLE	19S-ELISA
	19S-ELISA	Glu-EXiLE	Glu-ImCAP	Glu-ImCAP	Glu-EXiLE
Number of XY Pairs	137	139	130	130	137
Spearman R	0.8767	0.3195	0.2026	0.659	0.2284
P value (two-tailed)	<0.0001	0.0001	0.0208	<0.0001	0.0073

ImCAP, ImmunoCAP of Gluten.

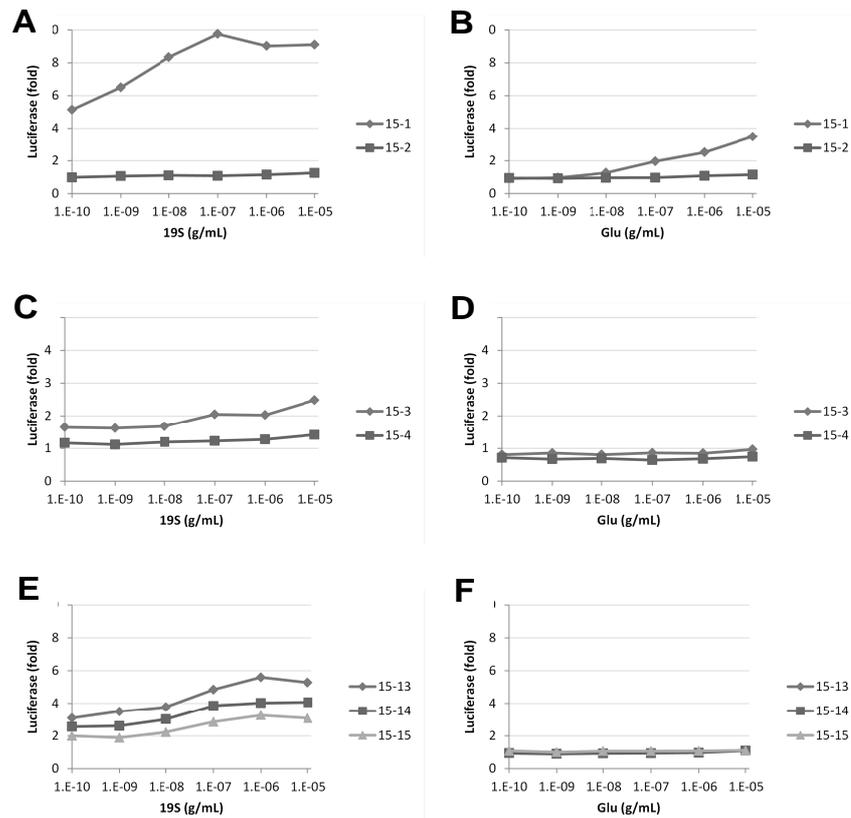


図 7. IgE 応答性の経時的変化

19S 特異的 IgE が 2 年で 8.7 unit にまで減少した subject No.1 (A, B)、減少はしたが 10 unit 以上であった subject No.3 (C, D)、ほとんど変わらなかった subject No.7 (E, F) について、19S (A, C, E) または Glu (B, D, F) により刺激を行なった。菱型 四角 (三角) の順に採血をしている。



## 医薬部外品等に含まれる成分の網羅的抗原性の解析

研究分担者 伊東 祐二 鹿児島大学大学院理工学研究科 生命化学専攻 教授

### 研究要旨:

茶のしずく小麦アレルギーの原因となる IgE 抗体の特性解析を行うため、患者由来の IgE 単鎖 Fv 抗体ライブラリを構築し、グルテンならびにグルパール 19S に対するバイオパンニングによって、疾患の原因と考えられる特異クローンの単離を行った。得られたクローンの多くは、グルテンに対する結合活性を有するものの、グルパール 19S に対する特異性は示さなかった。グルパール 19S に特異性をもつクローンが得られなかった原因として、目的の抗体遺伝子の存在率が低く、また、バイオパンニングによる濃縮効率が低いことが考えられた。そこで、バイオパンニング前後でのライブラリ中の抗体配列を次世代シーケンサーによって網羅的に解析することで、特異クローンの解析を進めた結果、複数種のグルテン、並びに、グルパール 19S に特異的な IgE 抗体の VH 配列の特定に成功した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、医薬部外品・化粧品に含まれる様々な工業添加物によるアレルギーの発症原因の解明に向け、アレルギー患者から原因となる抗体を単離し、その特異性や性質を決定することで、アレルギー反応に関わる物質の網羅的抗原性の解析を行うことである。このような、疾患の直接的原因となる抗体クローンの解析は、本研究で用いる抗体ファージライブラリ技術によって初めて可能であり、より詳細な抗原性の解析が達成できる。

昨年度において、茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者 13 名の血清中の小麦加水分解物に対する抗体価の測定により、原因となるグルパール 19S に対する IgE 抗体が患者血清の中で有意に高いことを明らかにし、患者(患者 4)由来の抗体ライブラリを構築した。このライブラリを用いて、グルパール 19S に対するバイオパンニングによって、特異的抗体クローンファージの単離を行ったところ、3 種の特異的ク

ローンファージの単離に成功した。本年度は、これらのクローンの特性解析を進めるとともに、他の茶のしずく石鹼による小麦アレルギー患者、さらに、通常的小麦アレルギー患者の IgE 抗体ライブラリを作製し、アレルギーの原因となる抗体の単離を進めた。特に、次世代シーケンサー技術をファージライブラリによる抗体単離と組み合わせることにより、アレルギーの原因となる IgE クローンの網羅的な解析技術の確立を試みた。

### B. 研究方法

**生体サンプルと材料** 茶のしずく石鹼による小麦アレルギーを発症した患者 P4 と P12、並びに、通常的小麦アレルギー患者(P' 14-17)の血液サンプルは、昨年度の報告書に記載した様に、国立病院機構相模原病院の福富友馬医師のご協力により、患者本人との同意書による承諾のもと採取されたものを用いた。

**患者血漿を用いた ELISA 測定** 患者血清のグルテン並びにグルパール 19S に対する IgE 抗体価

は、昨年度の報告書に記載の方法で測定した。**IgE 抗体ファージライブラリの作製** 患者由来の IgE 抗体ライブラリの作製は、昨年度の報告書に記載の方法で構築した。

**バイオパンニングによる抗体クローンの単離** グルテン、グルパール 19S に対するバイオパンニングの方法も、昨年度の報告書の記載の方法で行った。

**次世代シーケンサーによる IgE 抗体の VH 領域の網羅的配列解析** 構築した IgE 抗体ライブラリあるいはバイオパンニング後の抗体ライブラリからファージミド DNA を精製し、これを鋳型に VH 特異的 5' 並びに 3' プライマーを用いて、VH 遺伝子を増幅した。次世代シーケンサー用のサンプル調製は、基本的に TruSeq™ DNA Sample Preparation v2 (Illumina) のプロトコールに従って行った。先に増幅した PCR 産物の両端に、アダプター配列を付加するための PCR を行い、さらにインデックス配列を付加した P5 並びに P7 プライマーを使って PCR を行った。解析は、次世代 DNA シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて行った。得られたシーケンスデータの解析は、CLC Genomics Workbench ver5 (CLC Bio) ソフトウェアを使って行い、"Merge Overlapping Pairs" tool を使って、5' 側 3' 側の配列をつなぐことによって、全長の VH 遺伝子配列を決定した。

## C. 研究結果

**グルテン、グルパール 19S に対する患者抗体の解析** 昨年度報告した“茶のしずく”小麦アレルギー患者 P4、P12、通常小麦アレルギー患者 P15、並びに代表的な健康人の血漿中のクラス別の抗体価を評価した結果を示した(図1)。アレルギーの原因となる IgE に関しては、茶のしずく患者並びに通常的小麦アレルギー患者において、グルテンに対する抗体価が上がっているが、特に

茶のしずく患者では、グルパール 19S に対する IgE 抗体価が高いのが特徴であり、このアレルギー患者は、グルパール 19S を含む茶のしずく石鹸によりアレルギーが誘発されたことを支持している。一方、通常小麦アレルギーの患者の IgE については、グルパール 19S に対する抗体価は低く、グルテンに対する抗体のみが見られた。

**抗原特異的 IgE の取得のための患者抗体ライブラリの作製** このような抗原の違いによって誘導される IgE 抗体のクローンレベルでの特異性、エピトープの違いを明らかにするため、茶のしずく患者 P4 並びに P12、通常小麦アレルギー患者の血液由来の IgE 抗体ファージライブラリを作製し、特異的な IgE クローンの単離を試みた。

昨年度の報告で、茶のしずく患者 P4 由来の IgE 抗体ライブラリを作製したが、これに引き続き、本年度では、茶のしずく患者 P12 と通常小麦アレルギー患者 4 人のプール血液サンプル由来の抗体ファージライブラリを作製した。作製した抗体ライブラリの多様性は、昨年度報告した茶のしずく患者 P4 ライブラリが、 $3.8 \times 10^7$  (VH-VL :  $2.1 \times 10^7$  並びに VH-VL :  $1.7 \times 10^7$ )、茶のしずく患者 P12 ライブラリが、 $2.8 \times 10^7$  (VH-VL :  $1.1 \times 10^7$  並びに VH-VL :  $1.7 \times 10^7$ )、通常小麦アレルギーライブラリは、 $4.8 \times 10^7$  (VH-VL :  $2.8 \times 10^7$  並びに VH-VL :  $2.0 \times 10^7$ ) であった。これらのライブラリを用いて、グルテン、並びに、グルパールに対するバイオパンニングを行った。

茶のしずく患者 P4 ライブラリのグルパール 19S に対するバイオパンニングでは、B9、E9、G7 の 3 つのクローンが得られたが、これらはいずれも、グルテンに対する高い特異性を示した(図2)。このことは、得られた 3 種のクローンは、グルパール 19S に特異的なエピトープではなく、グルテンに特異的なエピトープを認識していることを

示している。バイオパンニングによる段階でもグルテンに対する結合が優位に見えている（図4A）ことから、パンニングで、グルテンに対するクローンが優位に増幅されたことが考えられるが、何故、グルパール19Sに存在しないエピトープを認識する抗体クローンがグルパール19Sに対するパンニングで、エンリッチされるのか原因は定かでない。

次に、茶のしずくアレルギーの特徴となっているグルパール19Sに対するIgE抗体クローンの取得のため、グルテンに対するIgE抗体価が低く、グルパール19Sに極めて高いIgE抗体価を示す患者P12（図1のIgEのパネル参照）由来のライブラリを使って、グルパール19Sに対するバイオパンニングを行った。その結果、図3Aに示した様に、第1ラウンドにおいて、若干グルパール19Sに対する濃縮が確認されたが、第2、3ラウンドでは、同時にグルテンへの結合の増強が見られた。2ラウンド後の各抗体ファージクローンのELISAによる結合スクリーニングを行った。その結果、図3に示した様に、3種の特異的と思われるクローン（クローン8、14、18）が得られたが、いずれも、グルテン特異的なクローンであった。グルパール19Sに対して高いIgE抗体価を有する患者由来のライブラリにおいても、グルテンに対して特異的なクローンしか得られないのが現状では、その理由は不明である。

一方で、通常的小麦アレルギーを引き起こすグルテンに対するIgEと茶のしずくアレルギーの同じくグルテンに対するIgEとの質的な違いがあるかどうかを検討するため、患者P4ライブラリを使ってグルテンに対するパンニングを行い、特異的なクローンの取得を試みた。興味深いことに、パンニング前の最初のライブラリの段階から、グルテンあるいはグルパール19Sに対する高い結合

活性を示し、2ラウンドの後、結合活性がさらに上昇した（図4A）。そこで、1ラウンドならびに2ラウンドのバイオパンニング後のクローン化サンプルのELISAによるスクリーニングを行った（図4）。その結果、1ラウンド後では、48クローン中3クローンでグルテンもしくはグルパール19Sへの結合が見られたが、2ラウンド後では、48クローン中の40クローンで結合活性が見られた。このことは、2ラウンド後、効率よく、グルテンに対する抗体ファージの濃縮が起きていることを示す。ここで、得られたクローンのうち多くのクローンが、弱いながらもグルパール19Sへの結合活性を有していたことは注目に値する。

図2、3、4において示してきたように、患者由来のIgE抗体ライブラリから単離された抗体クローンは、スクリーニングの範囲では、標的としていたグルパール19Sに対するものではなく、グルテンに特異性を持ったクローンしか得られていない。この理由として、患者P12のような高いグルパール19Sに対するIgE抗体価を有する場合でも、グルテンに対するIgE抗体を分泌するB細胞に比べ、グルパール19Sに特異的な抗体を産生するB細胞は極めて少ないことが考えられる。そのため、ライブラリ化してグルパール19Sに対するパンニングを行ったとしても、多くの濃縮される抗体クローンが、グルテン特異的なものであり、100個程度のスクリーニングでは、見つけ出せない可能性が考えられた。そこで、グルパール19Sあるいはグルテンに対する多様な抗体クローンの取得に向け、バイオパンニングの前後で増幅してくる抗体クローンの配列の次世代シーケンサーによる網羅的解析を試みた。

**次世代シーケンサーによる抗体の網羅的配列解析** 今回は、患者P4のIgEライブラリを使ったグルテンに対する1回のバイオパンニング、並びに、患者P12 IgEライブラリを使ったグルパール19Sに対する同じく1回のバイオパンニ

ングによって、増幅されてくる IgE 抗体配列の解析を行った。結果を図 5 と図 6 に示す。

患者 P4 は、グルパール 19S とグルテンに対する IgE 抗体価を示す茶のしずくの小麦アレルギー患者であり、この患者からグルテンに対する IgE 抗体も通常のバイオパンニングによって複数のクローンが得られている (図 4)。図 5 A に、グルテンに対する 1 回のバイオパンニングの前後で、存在率の増加が大きかった配列クローンの上位 (増幅倍率として 2.5 倍以上) を並べた。一番大きな P4-GT1 で、33 倍以上の配列の増幅が見られ、このような増幅率の大きな配列は、グルテン特異的な配列クローンである可能性が高くなる。このような同定をより確実にするため、図 5 A のクローン配列を基に分子系統樹を作製したところ、図 5 B に示した様に、これらのクローンは、互いに高い相同性を持った 11 のサブグループ (クラスター) を形成することが分かった。このうち、クラスター X, Y, Z の中の代表的な配列を図 7 に示した。この X, Y, Z のクラスター内の配列は、極めて高い (98% 以上) 相同性を示し、また、H-CDR3 の配列も基本的には同じであることから、これらのクラスター内の配列の抗体は、同じ親 B 細胞由来のものであることを示している。さらに、図 4 で示した様に、患者 P4 ライブラリからグルテンに対するバイオパンニングによって得られた E7 の配列は、P4-GT2 の配列と同じであったことから、この次世代シーケンサーによる抗原特異的抗体の同定方法が、確度の高いものであることを示している。図 5 で見られるいくつかのクラスターは、異なる特異性を持つ IgE の VH クローンの存在を示しており、これら解析により、グルテンによるアレルギーの原因となる IgE の特定が期待できる。

次に、グルパール 19S に特異的な IgE クローンの特定のために、患者 P12 由来の IgE ライブラリを使って、グルパール 19S に対するパンニング前後の網羅的開裂解析を行った。その結果、グルテンに対する場合と同じように、パンニングによっ

て存在率が増幅されるクローンが見いだされた。図 6 A に示した様に、増幅倍率が 2.5 倍以上の配列クローンは、49 個であったが、グルテンの場合 (図 5 A) と異なり、増幅倍率は、最も高いもの (P12-GP1) で、6 倍程度とそれほど大きくなかった。これらのアミノ酸配列を基に作製した分子系統樹を図 6 B に示す。いくつかのクラスターの形成が見られたが、多くのクラスター内の配列間の相同性は、クラスター M を除いて、それほど高くなく、92% 程度であった。クラスター L, M, N の中の代表的な配列を、図 7 に示すが、グルテンに特異的な IgE の VH 配列として同定された X, Y, Z のグループ内の H-CDR3 がほぼ同じ配列を示すのに対し、グルパールに特異的な IgE の H-CDR3 配列は、クラスター M 以外では、変化に富むものであった。

#### D. 考察

倍パンニング前後でのライブラリ中の抗体の網羅的配列解析によって、2 人の患者由来の IgE ライブラリから、グルテンならびにグルパールに特異性を有する可能性を持つ、いくつかの VH 配列が同定された。バイオパンニングという抗原に対する結合特異性を保証するステップを含んでいるものの、最終的には、抗体を作製し、その特異性を証明する必要がある。通常のパンニングで得られた P4-GT-E7 のクローン (図 4) と、次世代シーケンサー解析により同定された P4-GT2 (図 5) が同一であったことは、次世代シーケンサーによる配列解析が、抗原特異抗体の特定に十分使用できることを示している。図 4 B において得られているクローンのすべての配列の解析を完了しているわけではないが、少なくとも、図 5 B のクラスター解析は、10 種類以上のグルテン特異的な配列の存在を示唆しており、このような多様な IgE 抗体の構造情報は、アレルギー反応の IgE 抗体レベルでの包括的な理解に極めて重要

な情報であり、網羅的配列解析により初めて明らかになったものである。現在、VHの情報だけでなく、ペアとなってFv領域を構成するVLの配列情報の解析を進めている。

患者P12のグルパールに対して得られたIgEのVH配列においても、いくつかのクラスターが見られた。その中で、クラスターM内の配列は、H-CDR3の領域を含め互いに極めて高い相同性を示すこと、この配列がグルパール19S特異的なIgE抗体の可能性が最も高いと予想している。一方、その他のクラスターでは、高い相同性は見られず（90%前後）、これらの配列があまり高くない増幅倍率を示すことを考え併せると、非特異的なクローンである可能性を否定できない。しかし、別の可能性として、これらのクローンは、特異的ではあるが、抗体を発現するB細胞の免疫応答による細胞増殖が強く起こっていないため存在率が極めて少ないことが考えられる。また、標的となるグルパール19Sは、多様なタンパク質の集団であるグルテンをさらに化学的に処理しているため、抗原のエピトープとしては極めて多様性に富んでいることから、パンニングによる濃縮もかかりにくくなっていることが考えられる。

茶のしずく患者と通常型の小麦アレルギーの患者におけるIgE抗体の特性は、患者血清中のポリクローナル抗体のレベルで現在まで解析されてきた。ここで示すアプローチは、疾患の原因となるIgEの特性をクローンのレベルで解析することで、以下のようなアレルギー応答に対する疑問に対する回答が可能かもしれない。1)一般的な小麦アレルギーと茶のしずくアレルギーでは、IgEの特性にどのような質的な違いがあるのか。2)茶のしずくアレルギーは、グルテンとグルパール19Sに交差活性をもつIgEの出現によってか、それとも、グルパール19Sに特異的なIgEの出現

によって、引き起こされるのか。3)そのようなIgEは、どのような部位を標的とするのか。このような小麦アレルギーでのIgEの特性の違いを明らかにすることで、茶のしずく発症の機構、さらには予防に対する展開を図っていきたい。

## E. 結論

IgE抗体ライブラリを使ったバイオパンニングと組み合わされた次世代シーケンサーによる網羅的解析手法は、アレルギーの原因となるIgE抗体配列の同定の上で、極めて有用であり、本法によって、小麦アレルギーの原因となるIgEのクローン配列が特定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y. and Taki, M., Gp10 based-thioetherification (10NASEd-T) on a displaying library peptide of bacteriophage T7, *Molecular BioSystems*, **9**, 2988-2991 (2013)
- 2) Muraoka, J., Kamiya, N. and Ito, Y., Preparation and evaluation of cellulose-dissolving magnetic ionic liquid, *Journal of Molecular Liquids*, **182**, 76-78 (2013)
- 3) Muraoka, J., Ozawa, T., Enomoto, Y., Kiyose, N., Imamura, A., Arima, K., Nakayama, H. and Ito, Y., Selection and characterization of human serum albumin-specific porcine scFv antibodies using a phage display library, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, **33**, 42-48 (2014)
- 4) Tokunaga, Y., Azetsu, Y., Fukunaga, Y., Hatanaka T., Ito, Y. and Taki, M., Pharmacophore

Generation from a Drug-like Core Molecule Surrounded by a Library Peptide via the 10BASEd-T on Bacteriophage T7, *Molecules*, **19**, 2481-2496 (2014)

- 5) Imamura, A., Hatanaka, T., Ichizu, K., Kikuta, Y., Himeno, A. and Ito, Y., Identification of Chicken IgY-Specific Binding Peptide from Random Peptide Library and its application for IgY Affinity Purification, *Peptide Science 2013* (2014)
- 6) Imakiire, A., Nakashimada, Y., Hatanaka, T. and Ito, Y., Characterizations and Applications of Small Affinity Peptides Isolated from Disulfide-containing Random Peptide Library, *Peptide Science 2013* (2014)
- 7) Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y., Minami, M., and Taki M., Construction of a crown ether-like supramolecular library by conjugation of genetically-encoded peptide linkers displayed on bacteriophage T7, *Chemical Communications*, accepted.

## 2. 学会発表

- 1) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 患者由来の抗体ファージライブラリを用いた肝癌細胞を標的とした自己抗体の単離と機能解析, 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会(佐賀), 2013 年 5 月 18 ~ 19 日
- 2) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 萩原義久, 有馬一成, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイープ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の特性解析, 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会 (佐賀), 2013 年 5 月 18 ~ 19 日
- 3) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 患者由来の抗体ファージライブラリから得られた肝癌細胞抗原ルテランに対する自己抗体の性状解析, 第 86 回日本生化学会大会(横浜), 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
- 4) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 有馬一成, 岸本聡, 萩原義久, 伊東祐二, アルパカ由来 VHH ナイープ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の単離と機能解析, 第 86 回日本生化学会大会(横浜) 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
- 5) 小澤拓矢, 若井純子, 有馬一成, 伊東祐二, ブタ抗体ファージライブラリを使った抗原特異的ヒト化抗体, 第 86 回日本生化学会大会(横浜) 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
- 6) 宮崎誠生, 清瀬紀彦, 萩原義久, 井上聖也, 有馬一成, 伊東祐二, 抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリからの抗原特異的抗体の単離と機能解析, 第 86 回日本生化学会大会(横浜) 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
- 7) Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Hiromi Saitoh, Yurie Enomoto, Yuji Ito, Satoshi Nisizuka, Go Wakabayash, Isamu Hoshino, Hisahiro Matsubara, Takeshi Tomonaga, Development of High-Throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhus Gastric Cancer Biomarker, HUPO 12th Annual World Congress (横浜), 2013 年 9 月 14 ~ 18 日
- 8) 榎元友里恵, 吉川大和, Hui Kam Man, 有馬一成, 伊東祐二, 肝癌患者由来の抗体ファージライブラリから得られた抗ルテラン抗体の機能解析, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(長崎), 2013 年 9 月 26 ~ 28 日
- 9) 清瀬紀彦, 宮崎誠生, 井上聖也, 萩原義久, 有馬一成, 伊東祐二, Alpaca 由来 VHH ナイープ抗体ファージライブラリから単離された抗原特異的 VHH 抗体の機能解析, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(長崎), 2013 年 9 月 26 ~ 28 日
- 10) 宮崎 誠生, 清瀬 紀彦, 萩原義久, 松田 知成, 井上 聖也, 有馬 一成, 伊東 祐二, 抗原免疫動物から構築したアルパカ VHH 抗体ファージライブラリの特性と抗原特異的抗

体単離の研究，第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(長崎)，2013 年 9 月 26～28 日

- 11) 今給黎厚志，中島田雄一，畠中孝彰，伊東祐二，Characterizations and Applications of Small Affinity Peptides Isolated from Disulfide-Containing Random Peptide Library，4th Asia-Pacific International Peptide Symposium，第 50 回ペプチド討論会(大阪)2013 年 11 月 7 日
- 12) 今村礼奈，畠中孝彰，市津希理、菊田朝美、姫野ありさ、伊東祐二，Identification of Chicken IgY-Specific Binding Peptide from Random Peptide Library and its application for IgY Affinity Purification，第 50 回ペプチド討論会(大阪)2013 年 11 月 7 日
- 13) Nobuo Miyazaki, Norihiko Kiyose, Yoshihisa Hagihara, Matsuda Tomonari, Seiya Inoue, Kzunori Arima and Yuji Ito, Isolation and characterization of antigen-specific VHH antibodies from immunized alpaca VHH antibody phage library using Next Generation Sequencing (NGS), Antibody Engineering & Therapeutics 2013 (Huntington Beach, CA) December 08-12, 2013

## **G. 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

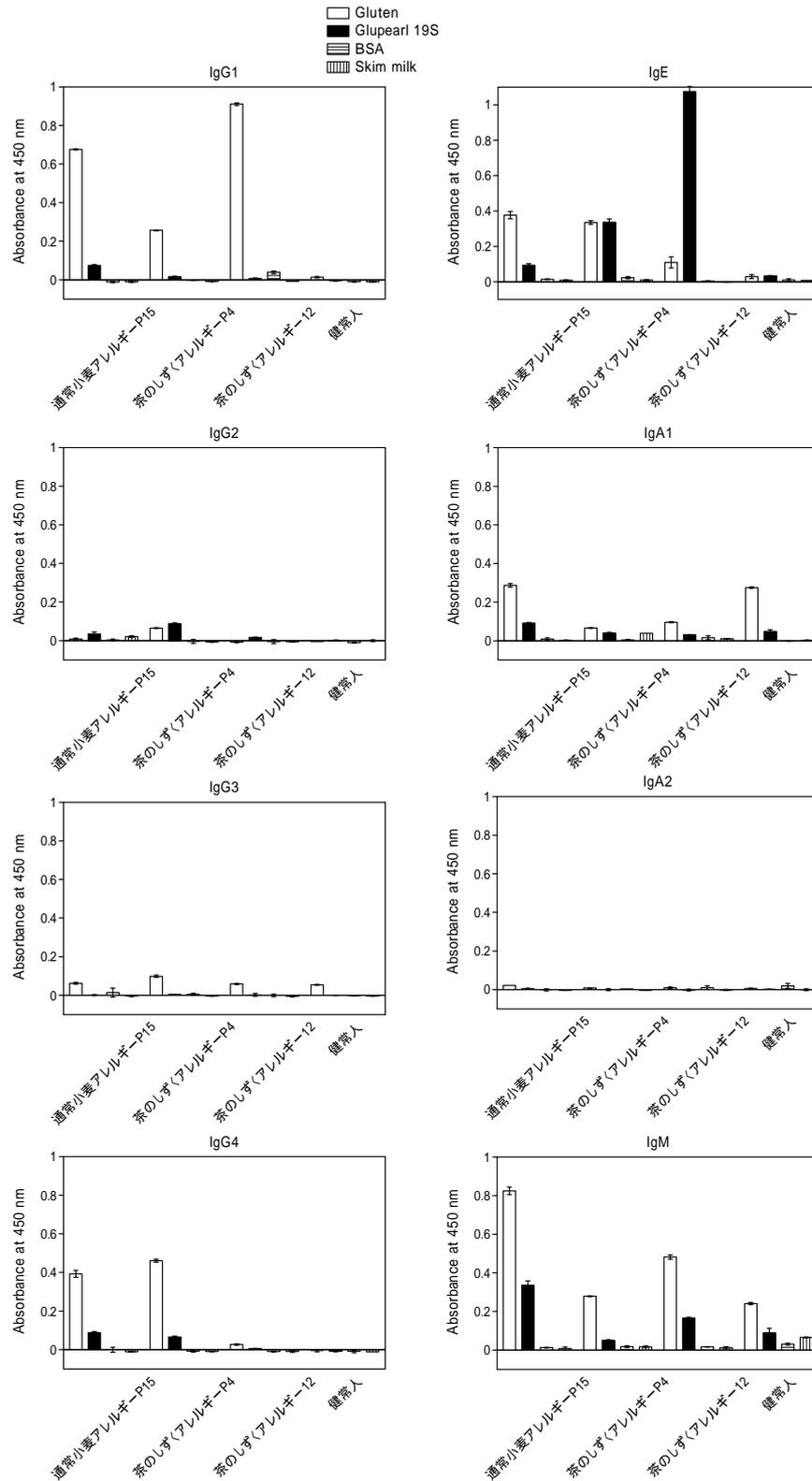
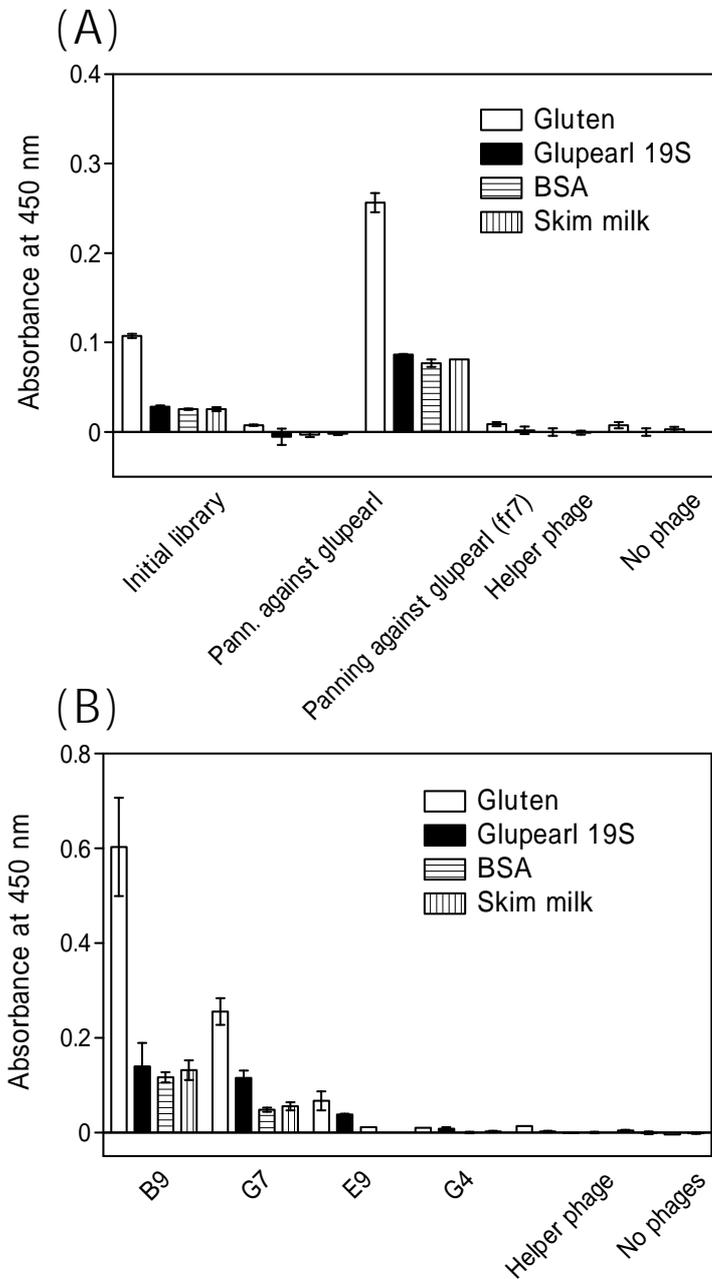
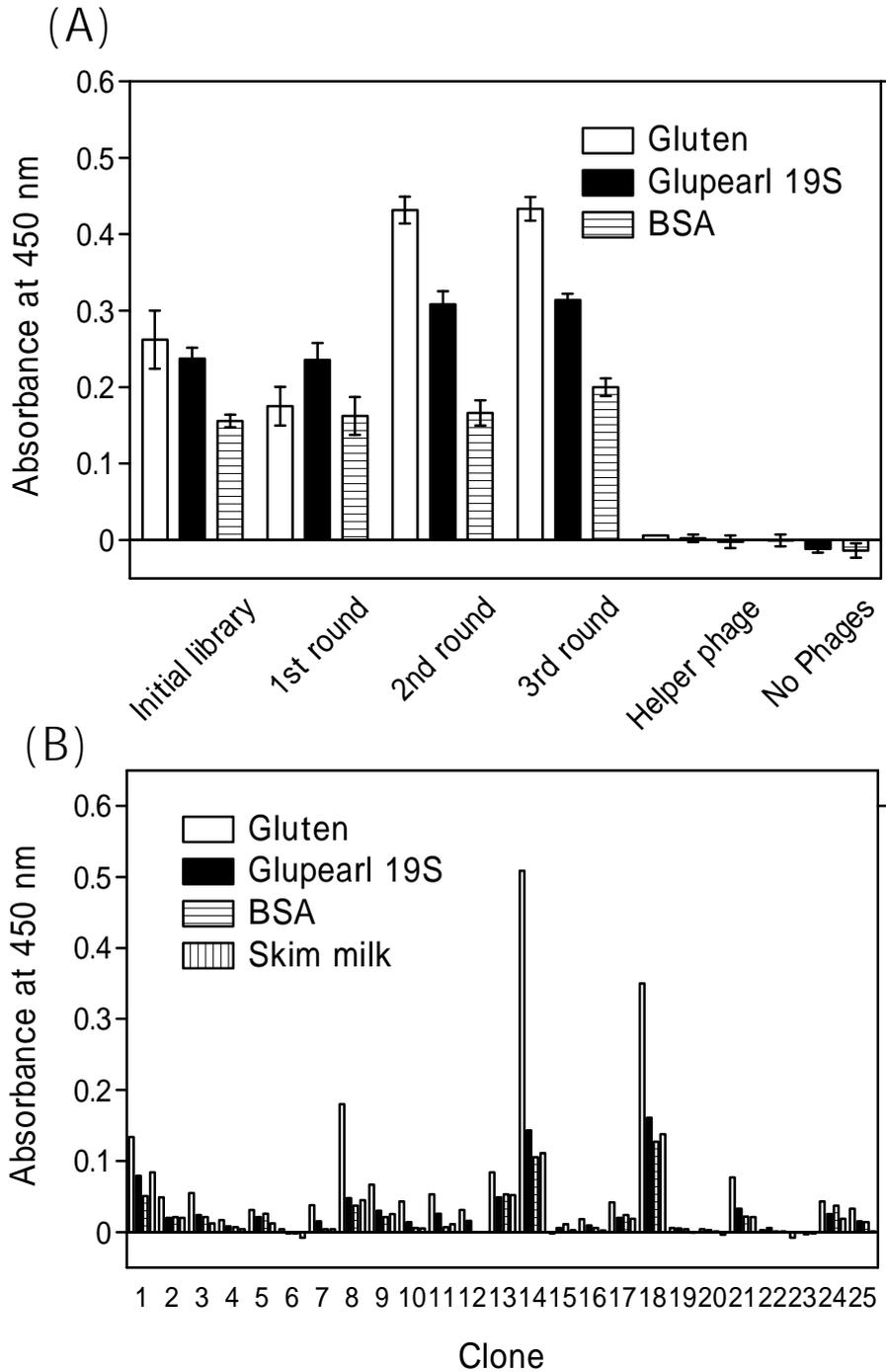


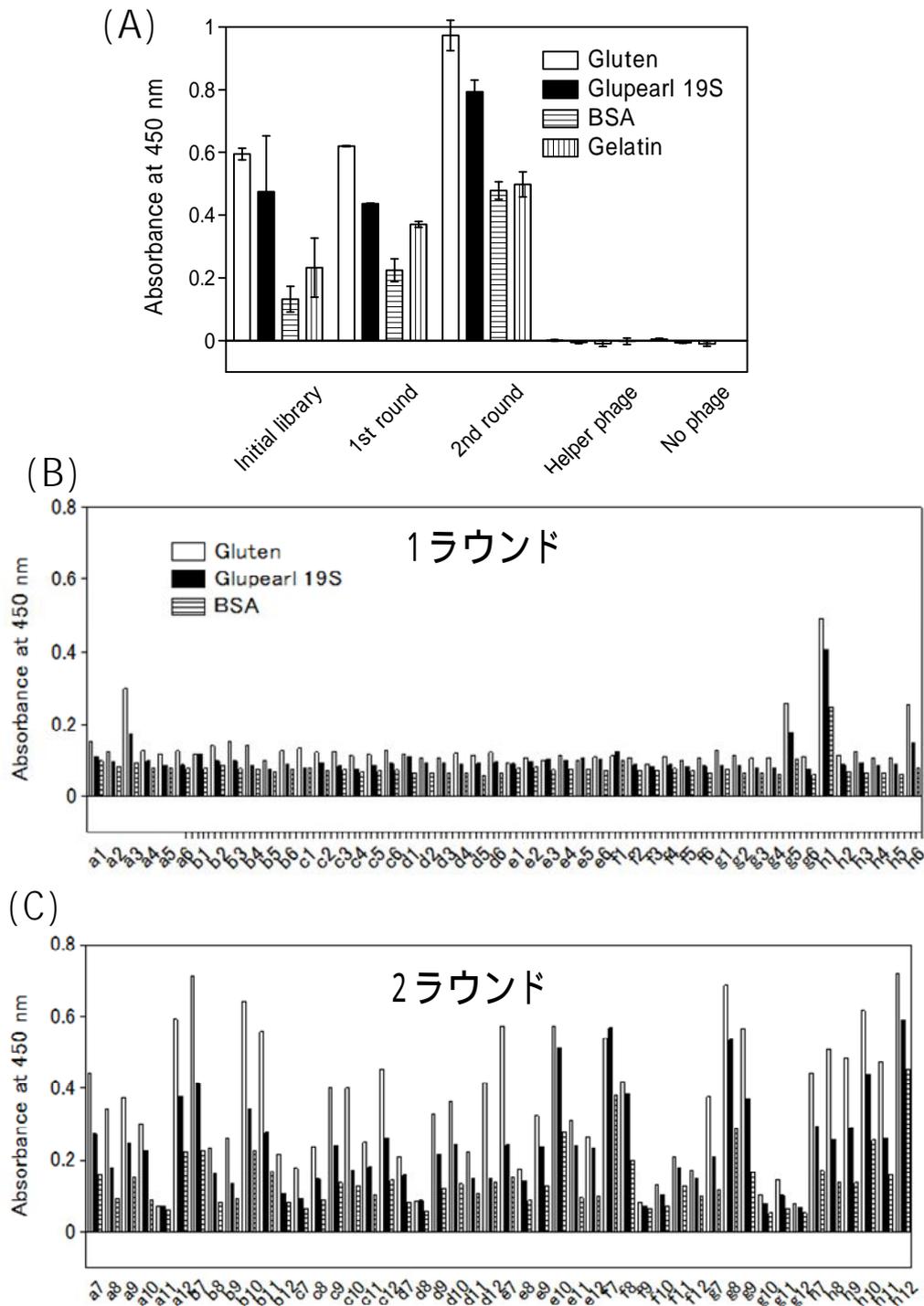
図1 茶のしずく小麦アレルギー患者 P4 と P12 ならびに通常小麦アレルギー患者 P15)の血漿中のグルテン、グルパール 19S に対するクラス別抗体価



**図2 茶のしずく患者P4 ライブラリ単鎖Fv抗体ファージライブラリからのグルパール19Sに対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離** (A) 患者4由来のIgE抗体ファージライブラリからグルパール(Glupearl-1R)並びにグルパール分画7(昨年度の報告参照)に対する1回のバイオパンニングによって得られたファージ集団のELISAによる抗原結合活性、(B)グルパール(グルパール分画7)に対するバイオパンニングによって得られた3種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性



**図3 茶のしずく患者 P12 ライブラリ単鎖 Fv 抗体ファージライブラリからのグルパール 19S に対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離** (A) 患者 P12 由来の IgE 抗体ファージライブラリからグルパール (Glupearl 19S) に対する 1 - 3 回のバイオパンニングによって得られたファージ集団の ELISA による抗原結合活性、(B) グルパール (グルパール分画 7) に対する 2 回のバイオパンニング後に得られた 3 種のグルテン特異的抗体クローンの結合特性

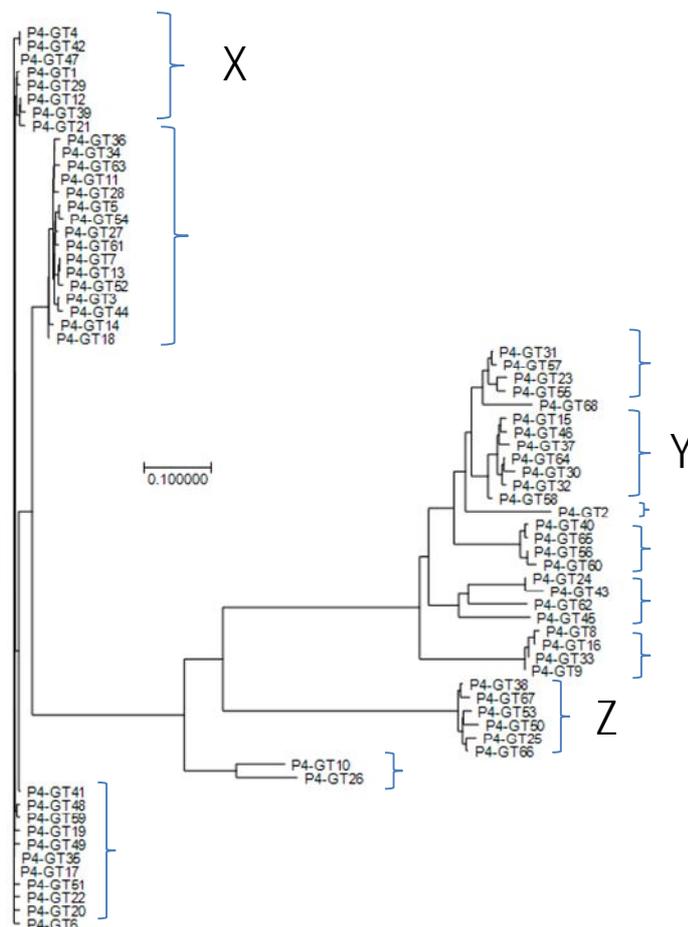


**図4 茶のしずく患者P4 ライブラリ単鎖Fv抗体ファージライブラリからのグルテンに対するバイオパンニングによる抗原特異的クローンの単離** (A) 患者4由来のIgE抗体ファージライブラリからグルテンに対するバイオパンニングによって得られたファージ集団のELISAによる抗原結合活性、(B) 1回のバイオパンニング後のクローンのELISAによる結合スクリーニング、(C) 2回のバイオパンニング後のクローンのELISAによる結合スクリーニング

(A)

ID	増幅倍率	パニング前 含有率	パニング後 含有率
>P4-GT1	33.77094	0.00469	0.15828
>P4-GT2	26.53431	0.00937	0.24873
>P4-GT3	19.29768	0.00469	0.09045
>P4-GT4	19.29768	0.00469	0.09045
>P4-GT5	14.47326	0.00469	0.06783
>P4-GT6	14.47326	0.00469	0.06783
>P4-GT7	14.47326	0.00469	0.06783
>P4-GT8	13.26716	0.00937	0.12436
>P4-GT9	12.06105	0.00469	0.05653
>P4-GT10	12.06105	0.00469	0.05653
>P4-GT11	11.68994	0.06093	0.71227
>P4-GT12	10.85495	0.00937	0.10175
>P4-GT13	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT14	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT15	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT16	9.64884	0.00469	0.04522
>P4-GT17	7.79329	0.06093	0.47484
>P4-GT18	7.23663	0.01406	0.10175
>P4-GT19	7.23663	0.00937	0.06783
>P4-GT20	7.23663	0.00937	0.06783
>P4-GT21	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT22	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT23	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT24	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT25	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT26	7.23663	0.00469	0.03392
>P4-GT27	6.75419	0.02343	0.15828
>P4-GT28	6.43256	0.01406	0.09045
>P4-GT29	6.03053	0.00937	0.05653
>P4-GT30	6.03053	0.00937	0.05653
>P4-GT31	5.30686	0.02343	0.12436
>P4-GT32	4.82442	0.01406	0.06783
>P4-GT33	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT34	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT35	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT36	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT37	4.82442	0.00937	0.04522
>P4-GT38	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT39	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT40	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT41	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT42	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT43	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT44	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT45	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT46	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT47	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT48	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT49	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT50	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT51	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT52	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT53	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT54	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT55	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT56	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT57	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT58	4.82442	0.00469	0.02261
>P4-GT59	4.02035	0.01406	0.05653
>P4-GT60	4.02035	0.01406	0.05653
>P4-GT61	3.61832	0.01875	0.06783
>P4-GT62	3.61832	0.00937	0.03392
>P4-GT63	3.61832	0.00937	0.03392
>P4-GT64	3.31679	0.03750	0.12436
>P4-GT65	3.21628	0.01406	0.04522
>P4-GT66	3.01526	0.01875	0.05653
>P4-GT67	3.01526	0.01875	0.05653
>P4-GT68	2.89465	0.02343	0.06783

(B)



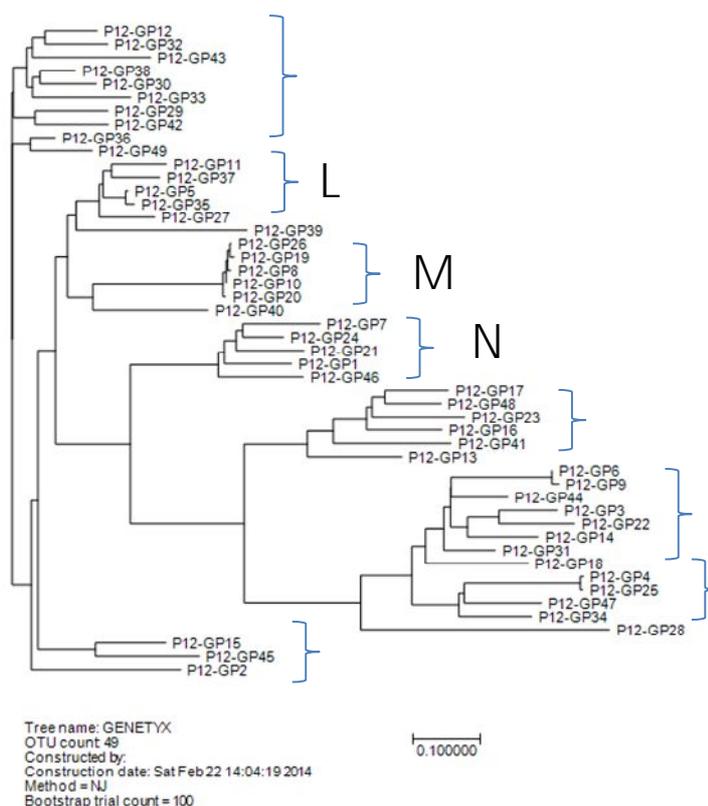
**図5 次世代シーケンサーによって解析された、患者 P4 の IgE ライブラリのグルテンに対するバイオパンニングによって増幅された特異クローン** (A) 患者 P4 の IgE ライブラリのバイオパンニング

前後での各クローン配列の全体集団における存在率と、存在率の比から算出されたバイオパンニングによる増幅倍率。(B) 増幅倍率が 2.5 倍以上のクローン (ID) のアミノ酸配列を基にした分子系統樹。}は、系統樹でクラスターを形成すると認められるクローンをまとめた。クラスターX,Y,Z の中の代表的なクローンのアミノ酸配列を図7に示した。

(A)

ID	増幅倍率	パニング前 含有率	パニング後 含有率
>P12-GP1	6.01385	0.01581	0.09509
>P12-GP2	5.26212	0.00791	0.04160
>P12-GP3	5.26212	0.00791	0.04160
>P12-GP4	5.26212	0.00791	0.04160
>P12-GP5	5.07418	0.01581	0.08023
>P12-GP6	4.88625	0.00791	0.03863
>P12-GP7	4.88625	0.00791	0.03863
>P12-GP8	4.51039	0.00791	0.03566
>P12-GP9	4.51039	0.01581	0.07132
>P12-GP10	4.25198	0.12649	0.53784
>P12-GP11	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP12	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP13	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP14	4.13452	0.01581	0.06537
>P12-GP15	4.13452	0.00791	0.03269
>P12-GP16	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP17	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP18	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP19	3.75865	0.00791	0.02972
>P12-GP20	3.50808	0.02372	0.08320
>P12-GP21	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP22	3.38279	0.01581	0.05349
>P12-GP23	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP24	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP25	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP26	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP27	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP28	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP29	3.38279	0.00791	0.02674
>P12-GP30	3.25750	0.02372	0.07726
>P12-GP31	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP32	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP33	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP34	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP35	3.00692	0.00791	0.02377
>P12-GP36	2.91296	0.03162	0.09212
>P12-GP37	2.81899	0.01581	0.04457
>P12-GP38	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP39	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP40	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP41	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP42	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP43	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP44	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP45	2.63106	0.01581	0.04160
>P12-GP46	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP47	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP48	2.63106	0.00791	0.02080
>P12-GP49	2.50577	0.02372	0.05943

(B)



**図6 次世代シーケンサーによって解析された、患者 P12 の IgE ライブラリのゲルパール 19S に対するバイオパニングによって増幅された特異クローン** (A) 患者 P12 の IgE ライブラリのバイオ

パニング前後での各クローン配列の全体集団における存在率と、存在率の比から算出されたバイオパニングによる増幅倍率。(B) 増幅倍率が 2 . 5 倍以上のクローン (ID) のアミノ酸配列を基にした分子系統樹。クラスター L, M, N の中の代表的なクローンのアミノ酸配列を図 7 に示した。



## 医薬部外品・化粧品に含まれる成分による免疫学的反応についての 動物モデルに関する研究

研究分担者 安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

### 研究要旨:

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール19Sと同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感作性や影響要因の詳細に関する解析を進めることにより、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

### 協力研究者

酒井 信夫、中村 里香、手島 玲子

(国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部)

### A. 研究目的

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質あるいはその分解物が配合されているものがある。薬事法上、医薬部外品等は人体に対する作用が緩和であり、その使用による健康被害が起きた場合でも、人体に対してそれ程重大な影響は与えないと考えられてきた。しかし最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物(グルパール19S)を含有する洗顔石鹸(茶のしずく石鹸:医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となっている。この事例においては、洗顔の際に、経皮的あるいは経粘膜的(眼や鼻の粘膜を介する)に石鹸中の小麦タンパク質加水分解物が体内に吸収されて感作され、小麦を使用した食品を摂取した際に小麦に対する食物アレルギーの症状が

現れたものと考えられている。本研究では、タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因がこの経皮感作性に与える影響について解析することを目的とし、マウスを使用する経皮感作モデル実験系を用い、加水分解コラーゲンの経皮感作性、及び、グルパール19Sとは異なる調製方法であるアルカリ加水分解により調製した小麦タンパク質加水分解物の感作性について検討した。

### B. 研究方法

#### 抗原懸濁液の調製

グルパール19Sは株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma G5004)およびグルパール19S粉末を100 mg/mLとなるよう1M Tris(pH 11.4)に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を作製した。経皮感作には、ストック溶液をPBSで10倍希釈し、pHを8付近に調整したものをを用いた。

加水分解コラーゲン9試料(A~I)は日本化粧品工業連合会を通じて入手した。試料をTable 1に示す。ウシ由来コラーゲン(BC; Sigma C9879)、

ウシ由来ゼラチン(BG; シグマアルドリッチジャパン 12-0230-5)、魚由来コラーゲン(FC; 井原水産)、魚由来ゼラチン(FG; Sigma G7041)、ウシ由来コラーゲンペプチド酸分解品(J; 和光純薬 032-15791)、及びウシ由来コラーゲンペプチド酵素分解品(K; 和光純薬 035-15801)は試薬標準品を購入した。これらの試料は終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。Fig. 1 に加水分解コラーゲンの SDS-PAGE パターンを示す。

アルカリ加水分解グルテンについては、グルテンのストック懸濁液に 1M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を約 12 に調整し、100 のヒートブロック上で、0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間加熱した。所定の時間経過後、1N 塩酸を加えて中和し加水分解を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1M 水酸化ナトリウムを予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。Fig. 2 にアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを示す。

#### マウスを用いた経皮感作実験

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 群中の匹数は 5-8 匹とした。8 週齢時に背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間抗原懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った(Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50  $\mu$ L の抗原懸濁液(500  $\mu$ g protein)を浸潤させて貼付した。パッチテスターの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3 日間の感作後にパッチを外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4 クールの感作後、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応

の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg/100  $\mu$ L を腹腔内投与(i.p.)して行った。i.p.後 30 分間、マウスの直腸内体温の測定を行った。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 2 の基準に従ってスコアリングした。惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

【実験 1-1/1-2】加水分解コラーゲンの経皮感作性に関する検討

感作抗原は Table 3 に、感作スケジュールは Fig. 3 に示す。加水分解コラーゲンの経皮感作性を評価するため、陽性コントロールにグルパール 19S(19S)を、陰性コントロールには PBS(V)を使用した。【実験 1-1】の感作検体には、19S、V に加え、ウシ由来コラーゲン(BC)、ウシ由来ゼラチン(BG)の試薬標準品、ウシ由来ゼラチン加水分解物 2 種(A, B)、ブタ由来ゼラチン加水分解物 2 種(C, D)を用いた。【実験 1-2】は 19S、V に加え、魚由来コラーゲン(FC)、魚由来ゼラチン(FG)の試薬標準品、ティラピア由来コラーゲン及びゼラチン加水分解物(F, G)、サケ由来加水分解物(H, I)を用いた。全ての感作検体にはラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を終濃度 0.5%で添加し、1 回の感作抗原量は 500  $\mu$ g proteinとした。1 群の設定匹数を 5 匹として経皮感作性及びアナフィラキシー誘導能を評価した。

【実験 2】アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

感作抗原は Table 3 に、感作スケジュールは Fig. 3 に示した。グルテンのアルカリ加水分解は上述のとおりに行った。加水分解時間を変化させたアルカリ加水分解グルテンに SDS を終濃度 0.5%となるように添加し、貼付抗原とした。1 群の設定匹数を 8 匹として、未分解グルテン(AIk0h)、グルパール 19S と同様の SDS-PAGE パターンを示した 0.5 時間加水分解グルテン(AIk0.5h)、および加水分解が進み、SDS-PAGE で 30kDa 以上のタンパク質バンドがほぼ消失している 12 時間加水分解グルテン(AIk12h)の経皮感作性を検討した。

## 統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、IBM SPSS Statistics ソフトウェアを用いて V 群を基準とした Dunnett の検定および各群間の Tukey の多重検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。なお、図中には  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  で有意差の程度を示した。

### (倫理面への配慮)

マウスへの経皮感作、採血においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の利用規定に従った。本実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

【実験 1-1/1-2】加水分解コラーゲンの経皮感作性に関する検討

加水分解コラーゲンの経皮感作性について検討を行った。Fig. 4-1 には、感作 4 週後のマウス血清中の抗原特異的抗体価についての検討結果を示す。A、B はそれぞれ抗原特異的 IgE 及び IgG1 についての検討結果を示している。グルパール 19S 感作群(19S)では昨年度の研究結果と同様に、血清中グルパール 19S 特異的 IgE、IgG1 が Vehicle 群 (V) と比較して有意に増加した(いずれも  $p < 0.001$ )。他方、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群(BC, BG, FC, FG, A~D, 及び F~I)では V 群と比較して血清中抗原特異的 IgE、IgG1 の増加は認められなかった。

Fig. 4-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー(能動的全身性アナフィラキシー)反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し( $3.1 \pm 2.2$ 、 $4.2 \pm 1.4$ )、V 群と比較して有意差が認められた(いずれも  $p < 0.001$ )。一方、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では体温低下は認められなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒ

スタミン濃度が大きく上昇していた。体温低下が認められなかったコラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では、ヒスタミン濃度についても上昇が認められなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果である。19S 群では平均 3.0 と高いスコアであったのに対し、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲン感作群では平均 1.0 以下と低いスコアであった。

【実験 2】アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関する検討

本実験に供したアルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE パターンを Fig. 2 に示す。アルカリ加水分解 0.5 時間においてグルパール 19S と同等の泳動位置に広範囲のスメアなバンドが観察された。この SDS-PAGE パターンを基に、未分解グルテン(Alk0h)、0.5 時間加水分解物(Alk0.5h)及びほぼ 30kDa 以下にまで分解されている 12 時間加水分解物(Alk12h)を検体とし、マウスに対する経皮感作性を検討した。

Fig. 5-1A には血清中抗原特異的 IgE、B には IgG1 の測定結果を示す。19S 群、Alk0h 群、Alk0.5h 群は V 群と比較して抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の有意な増加が認められた(いずれも  $p < 0.001$ )。一方、Alk12h 群では V 群との間に有意差は見られなかった。

Fig. 5-2 には、抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー(能動的全身性アナフィラキシー)反応の結果を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、19S 群では体温が大きく低下し( $4.6 \pm 1.1$ )、V 群と比較して有意差が認められた( $p < 0.001$ )。Alk0h 群及び Alk0.5h 群では、19S 群には及ばないものの、それぞれ  $2.3 \pm 1.6$ 、 $3.5 \pm 1.4$  の体温低下が観察され、V 群と比較して有意差が認められた( $p < 0.001$ )。一方 Alk12h 群における体温低下は  $0.6 \pm 1.3$  であり、V 群との間に有意差は見られなかった。B は惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示している。体温が大きく低下した 19S 群では、血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。また Alk0h 群、

AIk0.5h 群においても同様に血清中ヒスタミン濃度が大きく上昇していた。AIk12h 群ではこのような大きな濃度上昇は見られず、V 群との間に有意差は認められなかった。C は惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果である。19S 群及び AIk0.5h 群は平均 3.4 と高いスコアであった。AIk0h 群では 2.0 と中程度のスコアであった。一方 AIk12h 群では 1.4 と低いスコアであった。

#### D. 考察

我々はこれまでに、茶のしづく石鹸の使用とコムギ摂取によるアレルギーの因果関係を検討するため、マウスを用いた経皮感作性試験を行ってきた。その結果、マウスの皮膚にグルパール 19S を浸潤させたパッチを貼付するという感作を 4 回 (4 週) 繰り返すことにより経皮感作が成立し、その後の抗原の腹腔内投与によりアレルギー症状 (アナフィラキシー) を惹起することが可能であることを示した。これらの研究結果は、食物由来タンパク質による感作が経皮的に起こりうるという他のグループの報告とも矛盾しない。

本年度は、加水分解コムギと同様に、医薬部外品・化粧品に含有されるタンパク質加水分解物のひとつであり、原材料として含有される製品の市場規模が比較的大きいと考えられる「加水分解コラーゲン」に着目し、経皮感作性の検討を行った (【実験 1-1/1-2】)。また、昨年度はアルカリ加水分解グルテンの経皮感作性について検討し、アルカリ条件下で加水分解した場合には経皮感作性を示さないことを報告したが、今年度においては念のため 1 群のマウス個体数を増やして追試を行った (【実験 2】)。

コラーゲンは皮膚 (真皮)、靭帯、腱、骨、軟骨等を構成するタンパク質の 1 種である。数種のタイプがあるが、脊椎動物で最も多く存在するのは I 型コラーゲンであり、真皮や骨に多く含まれている。生体内では分子量 10 万程度のポリペプチド 3 本がらせん構造を形成しており、不溶性の

繊維状タンパク質である。ゼラチンは、熱によりコラーゲンのらせん構造を解離させ、変性したコラーゲン分子として可溶性にしたものである。コラーゲン (ゼラチン) は食物アレルギーを引き起こすアレルゲンタンパク質であることが知られている。

【実験 1】に供した加水分解コラーゲン 9 試料 (A~I) は、日本化粧品工業連合会を通じて入手した原料 (溶液) である。Table 1 には試料添付文書に記載された分子量を示す。また Fig. 1 には SDS-PAGE パターンを示す。通常の SDS-PAGE で分子量数千 Da 程度のポリペプチドを分離・検出することは困難であるため、Table 1 に示された分子量のバンドは検出されていないが、それぞれの検体について分子量数万 Da 程度のより高分子領域の成分が検出されている。検体 B、D、F では他の検体と比較して添付文書に記載された分子量が大きい。これら 3 検体は Fig. 1 においても高分子領域に濃いスメアなバンドが確認されている。

本研究では加水分解コラーゲンの基原を「哺乳動物」と「魚類」に分け、2 つの独立した動物実験 (【実験 1-1】及び【実験 1-2】) を行った。その結果、コラーゲン、ゼラチン、加水分解コラーゲンではいずれも経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーについても誘導されなかった。原因としては、コラーゲンの抗原性 (グルパール 19S の原料である小麦タンパク質と比較して弱い可能性) や皮膚透過性の違い等が考えられる。また、コラーゲンの主な抗原部位は分子の末端部分 (テロペプチド) に存在していることが知られている。酵素処理によりこのテロペプチドを切断し抗原性を低下させたものがアテロコラーゲンであり、医療用材料や化粧品等にコラーゲンが使用される際、実際にはこのアテロコラーゲンが使用されている場合がある。本研究に用いた加水分解コラーゲン検体がアテロコラーゲン由来であった場合には、感作性が見られなかったという結果は妥当なものと考えられる。更に、加水分解による低分子化の程度についても抗原性の

重要な因子であると考えられることから、今後 SDS-PAGE だけでなくゲル濾過クロマトグラフィー等で確認することが重要と考えられた。

医薬部外品・化粧品の中には、製品に保湿効果等の特性を持たせるために、食品等に由来するタンパク質の加水分解物が配合されているものがある。医薬部外品原料規格 2006 によれば加水分解コムギ末、加水分解コラーゲン末以外にも、加水分解カゼイン、加水分解コンキオリン液、加水分解シルク末、加水分解卵白等、基原となるタンパク質に抗原性があることが既に知られているもの、あるいは疑われるものも数種存在する。これらのタンパク質加水分解物の経皮・経粘膜的な感作性についても今後検討を重ねることが必要であろう。

【実験 2】においては、アルカリ加水分解グルテンの経皮感作性に関して、1 群のマウス個体数を 8 匹に増やし、昨年度の追試を行った。

Fig. 2 の SDS-PAGE パターンでは、アルカリ加水分解 0.5 時間においてグルパール 19S と同等の泳動位置にバンドが観察され、アルカリ加水分解の進行に伴い広くスミアなバンドが低分子領域に移動しており、昨年度の結果とよく一致している。Alk0h、Alk0.5h、Alk12h の経皮感作性について検討を行った結果、Alk0.5h はグルパール 19S と同程度の経皮感作性を示し、能動的全身性アナフィラキシーの誘導実験においてもグルパール 19S と同程度の反応が見られた。Alk0h ではグルパール 19S より程度はやや弱い、感作性及びアナフィラキシー反応が見られた。一方 Alk12h では感作性、アナフィラキシー反応とも V 群との間に有意差は認められなかった。昨年度行った試験では、Alk0.5h では経皮感作性は見られず、今年度の結果と一致していないが、今年度の試験では 1 群あたりのマウス匹数を昨年度よりも多く設定しており、今年度の試験結果の方が信頼性が高い。従って、グルテンの 0.5 時間アルカリ加水分解物も、グルパール 19S や 0.5 時間酸加水分解物と同様に、経皮感作性を示すと考えてよいだろう。

タンパク質加水分解の処理方法としては一般的に酸性条件、アルカリ性条件、酵素的条件等が考えられる。これらの加水分解条件の反応機構とそれに付随する構成アミノ酸置換(脱アミド反応)が経皮感作成立に及ぼす影響について、今後更に詳細な検討を加えることが急務と考えられる。

## E. 結論

これまでに確立したマウス経皮感作試験系を用いて、基原の異なる数種の加水分解コラーゲンの感作性を評価した。その結果、経皮感作は成立せず、能動的全身性アナフィラキシーも誘導されないことが示された。また、コムギタンパク質のアルカリ加水分解物の感作性を評価したところ、0.5 時間アルカリ加水分解グルテンにグルパール 19S と同等の感作性が認められ、加水分解の進行(低分子化)に伴い、感作性が減弱することが明らかになった。今後更に検討を重ね、タンパク質加水分解物による経皮感作について、感作性や影響要因の詳細に関する解析を進めることにより、医薬部外品・化粧品等の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

## (参考文献)

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 127 (2): 531-533.
- 2) Hsieh KY, Tsai CC, Herbert Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1067-75.
- 3) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv Mice.

Allergol Int 2006; 55: 43-48.

4) Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. J Food Sci 2007; 72(2): 103-107.

5) Bouchez-Mahiout I, Pecquet C, Kerre S, Snégaroff J, Raison-Peyron N, Laurière M. High Molecular Weight Entities in Industrial Wheat Protein Hydrolysates Are Immunoreactive with IgE from Allergic Patients. J Agric Food Chem 2010; 58: 4207-4215.

6) Laurière M, Pecquet C, Bouchez-Mahiout I, Snégaroff J, Bayrou O, Raison-Peyron N, Vigan M. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. Contact Dermatitis 2006; 54: 283-289.

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

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

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

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

11) Wang YH, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand and interleukin-25 in

allergic responses. Clin Exp Allergy 2009; 39: 798-806.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2013; 132; 1436-1438.

2) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R. Sensitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration. Clinical Immunology & Allergology 2013; 59, 598-602.

### 2. 学会発表

1)安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小麦タンパク質経皮感作能への酸加水分解の効果に関するマウスモデル実験系を用いた検討 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013. 5)

2)中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、小麦グルテンはトランスグルタミナーゼ処理により酸加水分解小麦と同様のIgE反応性を獲得する 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2013. 5)

3)中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、齋藤嘉朗、宇理須厚雄、福富友馬、手島玲子、酸加水分解コムギ特異的的患者血清IgEはトランスグルタミナーゼ処理小麦グルテンと交差反応する 第20回日本免疫毒性学会学術大会 (2013. 9)

4)曹永晩、安達玲子、酒井信夫、木村美恵、中村里香、福富友馬、手島玲子、小川久美子、BALB/cマウスにおける酸加水分解コムギタンパク質による経皮感作に関する免疫学的及び病理組織学

的解析 第 20 回日本免疫毒性学会学術大会  
(2013. 9)

5) 酒井信夫、中村里香、齋島由二、福井千恵、鈴木孝昌、中村亮介、蜂須賀暁子、安達玲子、手島玲子、加水分解小麦(グルパール 19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013. 11)

6) 佐々木和実、西嶋桂子、安宅花子、酒井信夫、手島玲子、小麦グルテンの酸加水分解時間による分子量分布・脱アミド化率の変化 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)

7) 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)

8) 手島玲子、中村亮介、中村里香、酒井信夫、安達玲子、加水分解小麦による小麦アレルギー発症の基礎的検討 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013. 11)

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

**Table 1 加水分解コラーゲンサンプル**

	由来		分子量	分解方法	製品濃度(%)
A	ウシ	ゼラチン	約400	アルカリ及び酵素	30
B	ウシ	ゼラチン	約4,000	アルカリ及び酵素	20
C	ブタ	ゼラチン	約1,000	アルカリ及び酵素	30
D	ブタ	ゼラチン	約2,000	アルカリ	30
E	ティラピア	ゼラチン	約400	アルカリ及び酵素	20
F	ティラピア	ゼラチン	約2,000	アルカリ	20
G	ティラピア	コラーゲン	約400	アルカリ及び酵素	30
H	サケ		約280	酵素	1
I	サケ		約1,500	酵素	30
-----					
J	ウシ	コラーゲンペプチド	約1,000	酸	30
K	ウシ	コラーゲンペプチド	約2,000	酵素	30

**Table 2 アナフィラキシー症状のスコアリング**

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

**Table 3 感作抗原**

**実験1-1 哺乳動物由来コラーゲン (1群5匹 x 8群)**

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
BC	ウシコラーゲン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ウシコラーゲン
BG	ウシゼラチン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ウシゼラチン
A	ウシゼラチン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ウシゼラチン加水分解物
B	ウシゼラチン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ウシゼラチン加水分解物
C	ブタゼラチン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ブタゼラチン加水分解物
D	ブタゼラチン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ブタゼラチン加水分解物

**実験1-2 魚類由来コラーゲン (1群5匹 x 8群)**

群名	感作検体	感作抗原量	惹起方法	惹起検体
V	PBS + 0.5%SDS	-	i.p. (1 mg)	グルバール19S
19S	グルバール19S + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	グルバール19S
FC	魚コラーゲン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	魚コラーゲン
FG	魚ゼラチン + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	魚ゼラチン
F	ティラピアゼラチン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ティラピアゼラチン加水分解物
G	ティラピアコラーゲン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	ティラピアコラーゲン加水分解物
H	サケコラーゲン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	サケコラーゲン加水分解物
I	サケコラーゲン加水分解物 + 0.5%SDS	500 µg	i.p. (1 mg)	サケコラーゲン加水分解物

**実験2 アルカリ加水分解グルテン (1群8匹 x 5群)**

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

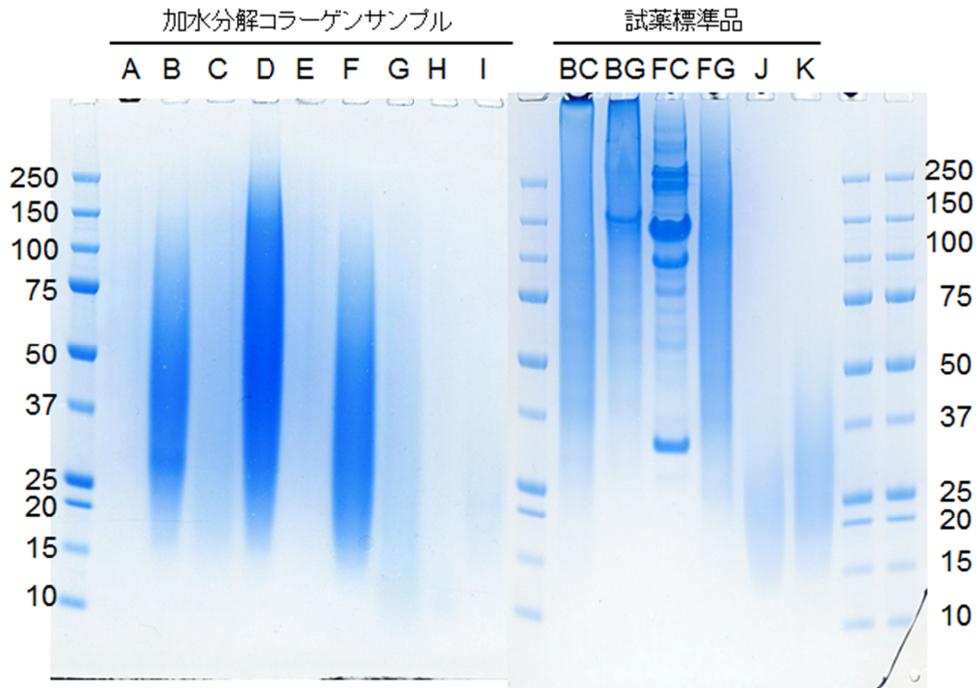


Figure 1 **加水分解コラーゲンの SDS-PAGE**  
4-12% Bis-Tris Gel の染色パターン

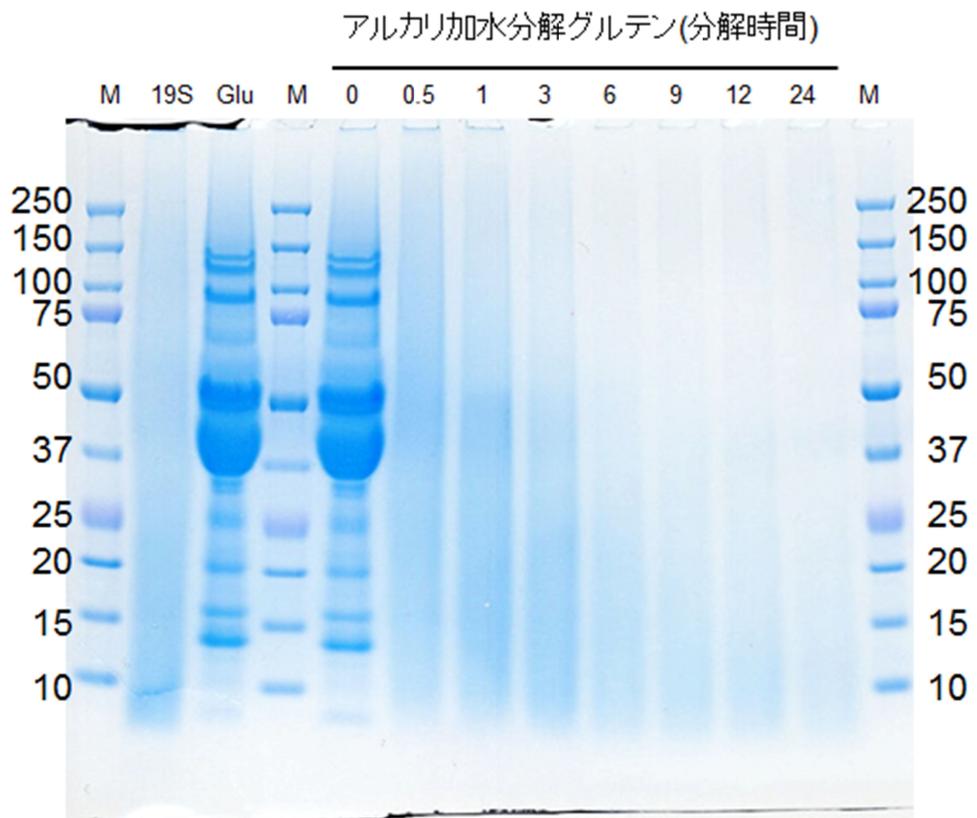


Figure 2 **アルカリ加水分解グルテンの SDS-PAGE**  
4-12% Bis-Tris Gel の染色パターン

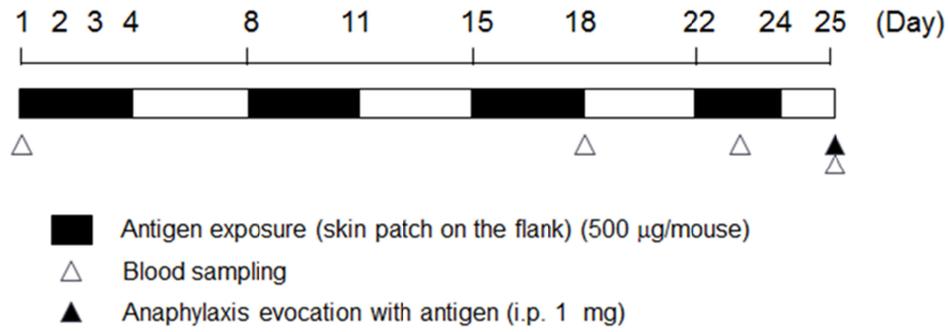
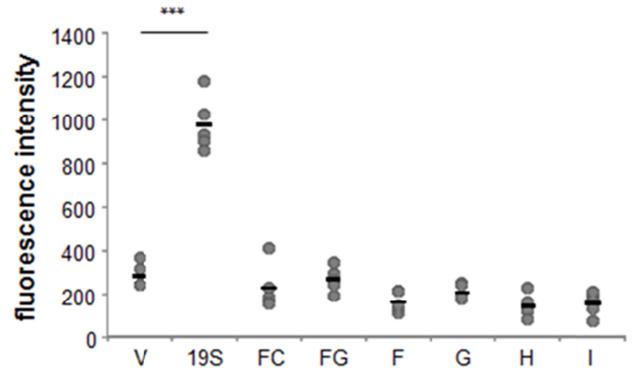
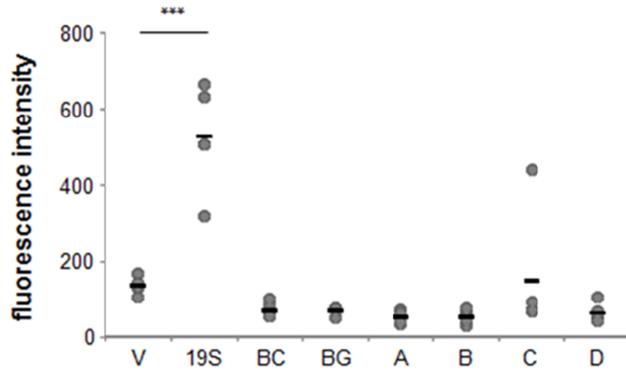


Figure 3 経皮感作試験スケジュール

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

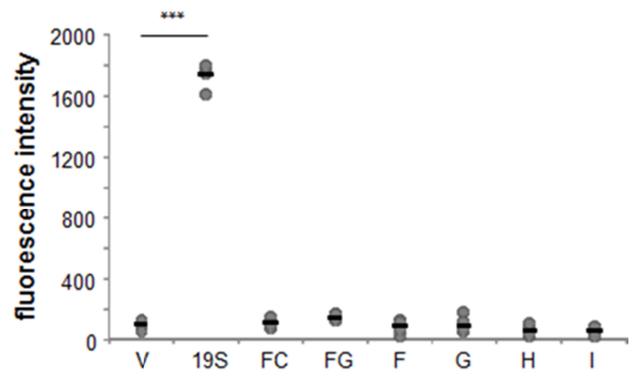
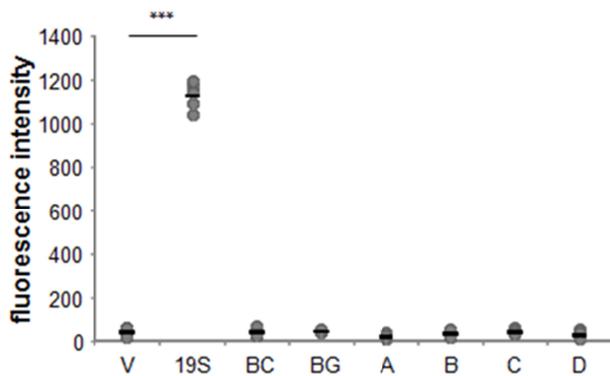
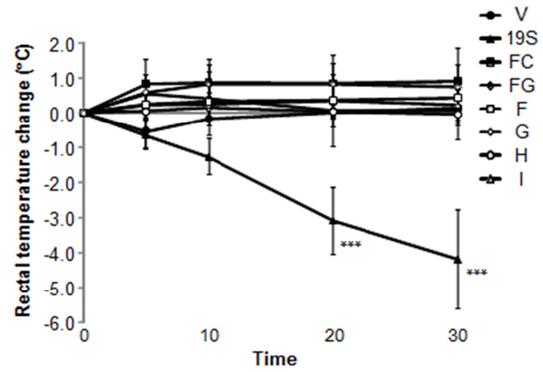
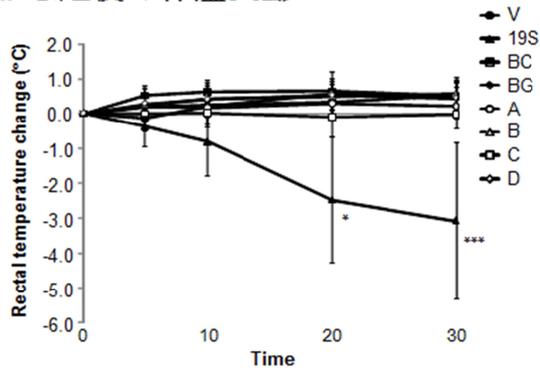


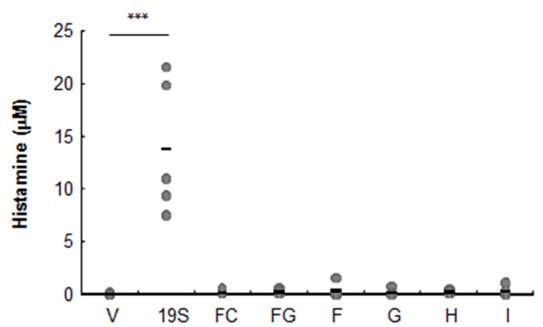
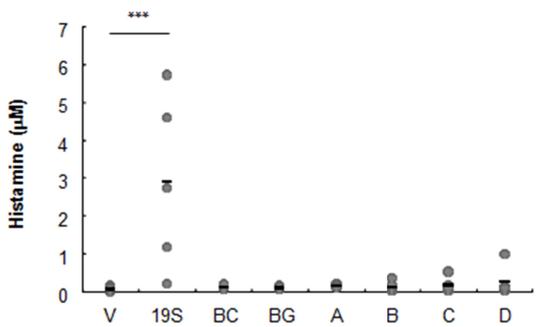
Figure 4-1 加水分解コラーゲン経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生

各群の処理抗原については Table 3 に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\*\*\* $p < 0.001$

### A. 惹起後の体温変動



### B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



### C. アナフィラキシー症状のスコアリング

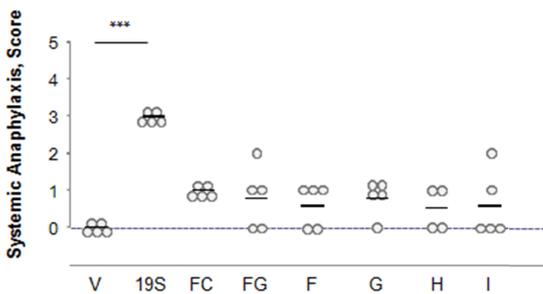
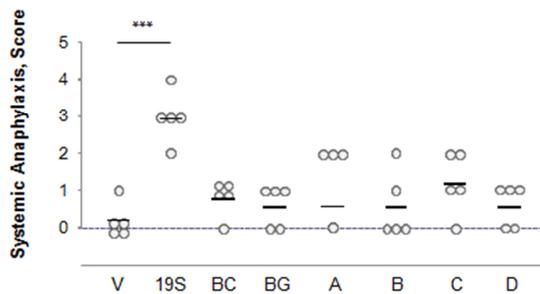
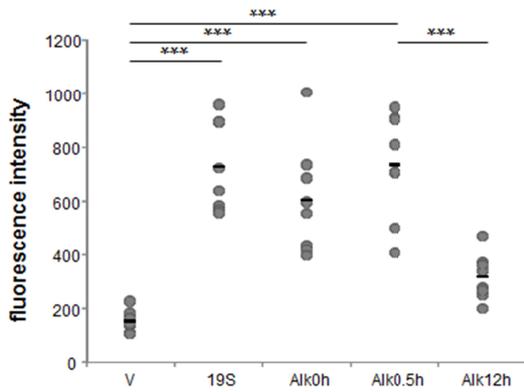


Figure 4-2 加水分解コラーゲン経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A: 各群のデータを Mean ± S.D.で示す。

B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\*\*\*p<0.001, \*p<0.05

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

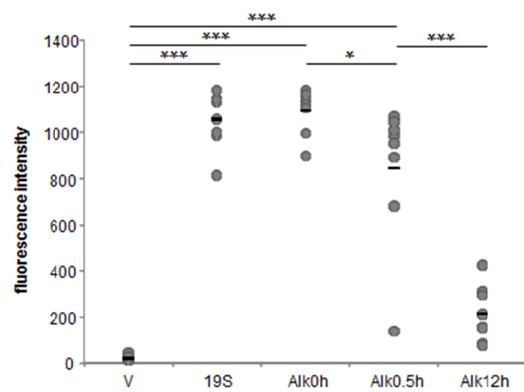
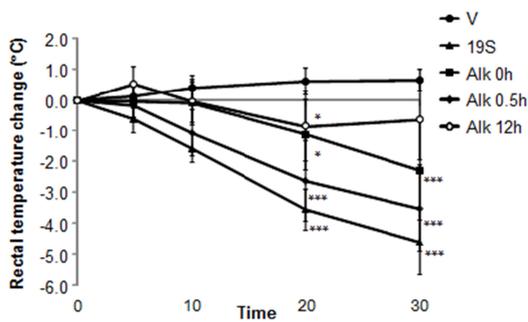
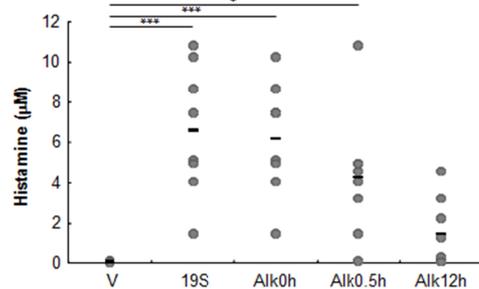


Figure 5-1 アルカリ加水分解グルテン経皮感作4週後(Day 23)の抗原特異的抗体産生  
各群の処理抗原については Table 3 に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の  
平均値を示す。 \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

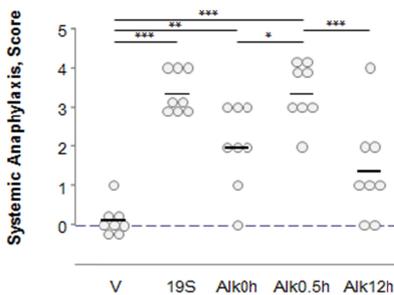


Figure 5-2 アルカリ加水分解グルテン経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A: 各群のデータを Mean  $\pm$  S.D.で示す。

B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。 \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$



## 医薬部外品等の国内のアレルギー発症のアンケート調査

研究分担者 板垣 康治 北海道文教大学人間科学部 健康栄養学科 教授

### 研究要旨:

北海道内の医療機関に勤務する医師、および開業医を対象として、小麦以外の加水分解物が添加された化粧品、医薬部外品によるアレルギー発症に関するアンケート調査を実施した。アンケートは3995名の医師に配布し、278名から回答が得られ回収率は7.0%であった。小麦以外的小麦加水分解物を添加している化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例については、3名の医師が症例を経験していた。原因物質などの特定はできなかった。発症例については、アナフィラキシーなど重症化の可能性も示唆された。

食品由来であっても、化粧品や医薬部外品に使用される場合には、アレルギー発症のリスクがあることを、医師を介して、あるいは、国民へ直接、効果的に情報を伝えることが重要である。

### 協力研究者

手嶋 哲子 北海道文教大学人間科学部  
健康栄養学科

### A. 研究目的

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

そこで、本研究では、国内で販売されている医薬部外品、化粧品に添加物として使用されている小麦、コラーゲン由来の加水分解物、動植物などから抽出した成分などに起因するアレルギーの国内における発症状況をアンケート調査によって把握することを目的とする。

### B. 研究方法

本研究では、平成24年度から26年度までの3カ年にわたり、食品由来の成分が添加されている化粧品や医薬部外品によって起きる食物アレルギーの現状をアンケート調査によって明らかにする。平成24年度は、国内で医薬部外品、化粧品素材として利用されている小麦加水分解物すべてについて、アレルギー発症の実態をアンケート調査によって把握し、調製方法によるアレルゲン性の有無や差異を検証した。平成25年度は、コラーゲンなど小麦以外の加水分解物を含有する医薬部外品、化粧品によるアレルギー発症の実態を、平成26年度(最終年度)は、コチニール、パパインなど動植物由来の食品成分を含有する医薬部外品、化粧品によるアレルギー発症の実態について平成24年度と同様の方法によって把握する。対象は北海道内で開業、または医療機関に勤務している皮膚科、内科、アレルギー科、眼科、耳鼻咽喉科等を専門とする医師とした。

平成25年度は、平成26年1月1日から1月31日までの期間で実施した。平成24年度と同様に、アンケート用紙の配布はメール便で行い、FAX(フリーダイヤル)で回収した。

### C. 研究結果

以下にアンケート調査の集計結果を示す。

#### 1. アンケート配布数と回収率

アンケートは2,303施設、3,995名の医師に配布し、250施設、278名から回答を得た。回収率は施設で10.9%、医師で7.0%であった。

#### 2. 回答者の性別

回答者278名中、男性は240名で86.3%を占めていた(図1)。

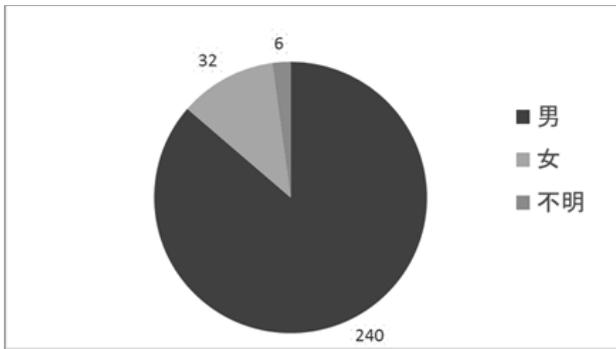


図1. 回答者の性別

#### 3. 回答者の年齢

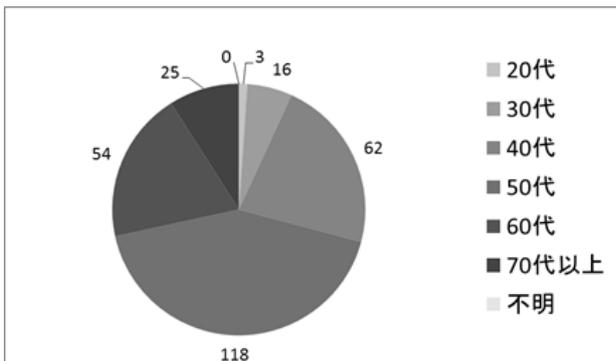


図2. 回答者の年齢

回答者の年齢は、50歳代が最も多く42.4%を占めていた。次いで40歳代(22.3%)、60歳代(19.4%)、70歳代(9.0%)、30歳代(5.8%)、20歳代(1.0%)の順であった(図2)。

#### 4. 専門分野

回答した医師の専門分野を図3に示した。内科が

134名(48.2%)で最も多かった。

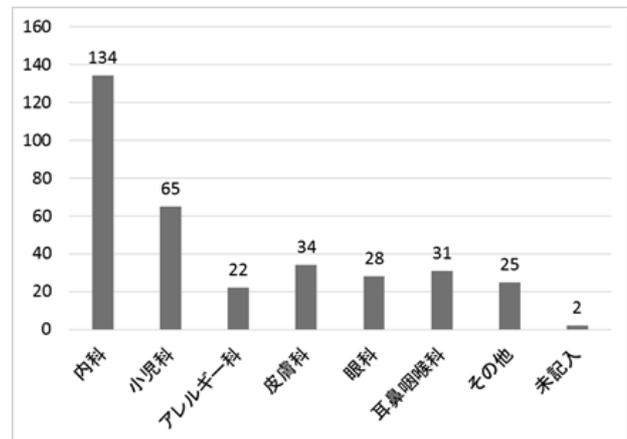


図3. 専門分野

#### 5. 施設区分

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

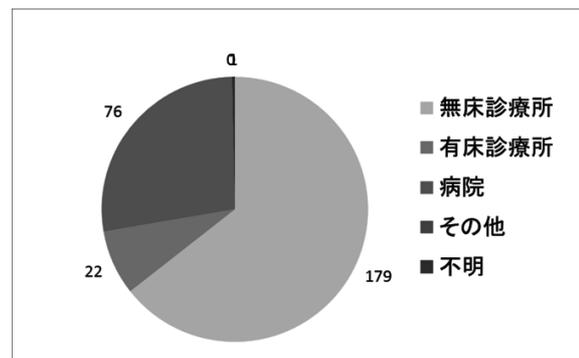


図4. 施設区分

#### 6. 病床数

回答した医師が勤務している医療機関の病床数は無床が179名(64.4%)と最も多かったが、有床では、200床以上が15.5%を占めていた(図5)。

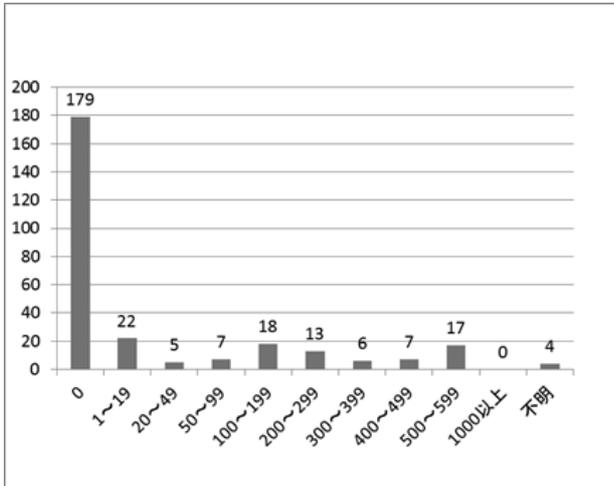


図5．病床数

7．受診者数

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

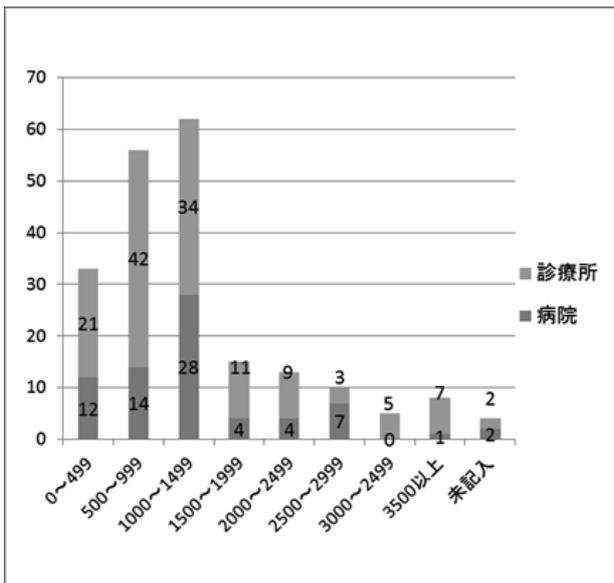


図6．受診者数

8．食品由来成分使用の認知度

「茶のしずく」洗顔石鹸のように、小麦加水分解

物などの食品由来の成分が化粧品や医薬部外品に添加物として使用されていることを「知っている」と回答した医師は242名(87%)であり、大部分の医師は認知していた一方で、前年度と同様に、化粧品や医薬部外品に食品由来の成分が添加されていることを知らない医師もいることが明らかとなった(図7)。

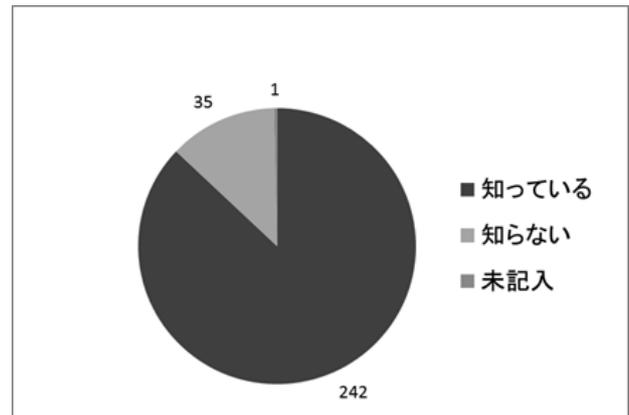


図7．食品由来成分使用の認知度

9．「茶のしずく」アレルギー患者診察の有無

「茶のしずく」洗顔石鹸使用により、小麦アレルギーを発症した患者を診察した経験があると答えた医師は35名(12.6%)であった。

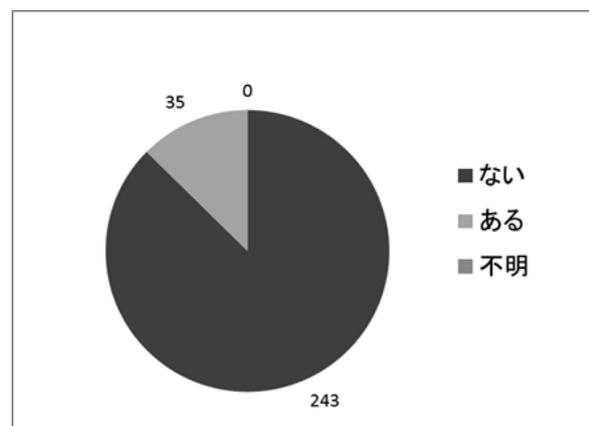


図8．「茶のしずく」アレルギー患者診察の有無

10．「茶のしずく」アレルギー患者登録の有無

日本アレルギー学会特別委員会では、「茶のしずく」洗顔石鹸の使用により小麦アレルギーを発症し

た患者を診察した医師に、専用の登録サイトへの患者登録を依頼しているが、本調査の結果では、「茶のしずく」アレルギー患者診察経験のある医師 35 名中、「登録していない」と回答した医師は 27 名で約 77%を占めていた。（図 9）

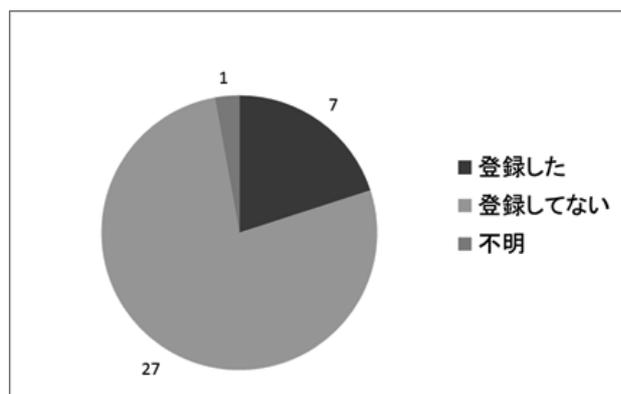


図 9. 患者の登録について

患者登録をどのように知ったかについては、7 名中、3 名が「学会 HP」と答えていた。また、前年度の「本アンケート調査」によって知ったと答えた医師が 2 名いた（図 10）。

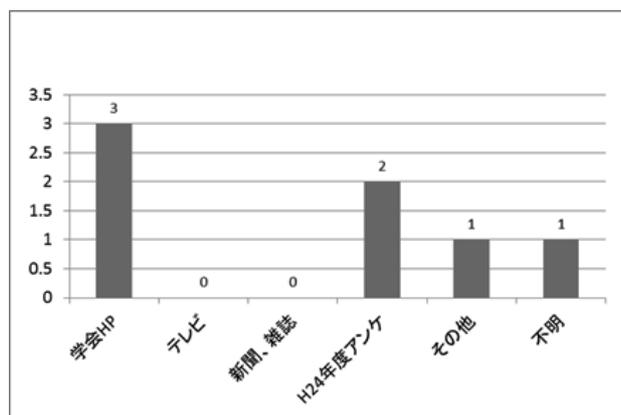


図 10. 登録制度をどのように知ったかについて

## 11. 小麦以外の加水分解物によるアレルギー発症について

小麦以外の加水分解物を添加した化粧品、あるいは医薬部外品を使用して食物アレルギーを発症した症例を経験したと答えた医師は 3 名であった（図 11）。

患者の状況を表 1 に示した。いずれも、原因物質は特定できていないが、アナフィラキシー、呼吸苦など重篤な症状を呈している症例もあることから、発症頻度は少ないものの、注意を要する。

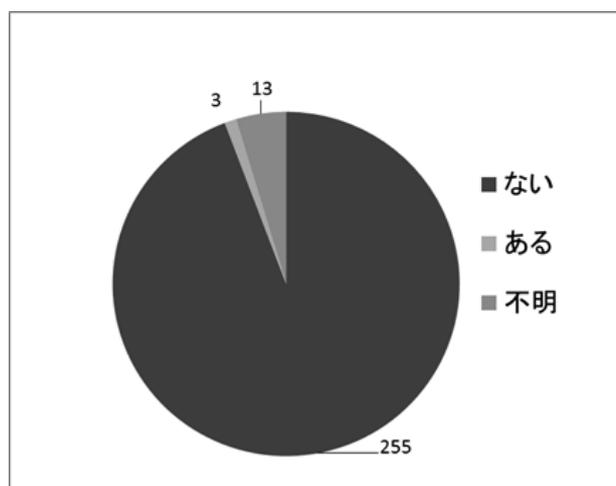


図 11. 小麦以外の加水分解物症例

表 1. 患者の状況

報告番号	原因商品	件数	使用期間	患者の性別	患者の年齢	発祥部位	他アレルギー疾患の有無
1	化粧品			女性			
2	不明	2~3	2回	女性	50~59歳	体躯・全身のかゆみ	無
3	不明	1	不明	女性	60~69歳	アナフィラキシー、喘息、呼吸苦、顔面浮腫、全身蕁麻疹	有

## 17. その他

化粧品や医薬部外品に添加されている食品由来成分について意見を以下に列記した。

現状については、

- ・成分に関して含有量の表記がされていないものが多い。同じ成分でも純度、製造法によってアレルギーの発生頻度は異なると思う。

・患者が副作用と考えず問診で話さないケースが多いと思う。一般用医薬品を含め情報が医師に入っていない。

・この数年、化粧品でのトラブルが多い（石ケンや美白に効果があるもの）ようだが、規制があまいのではないか。

・食品由来成分に対するアレルギーの反応だと気付かなかったケースはあるかもしれない。

・女性の化粧品の内容やアレルギーの情報が無いため診断できない。

・医薬品とちがい、イエローレター（「緊急安全性情報」）がないため、いったん問題が発生すると把握が難しい。

・患者はみな副作用がないものであると信じているだけに危険である。

・潜在的にはまだ他にも原因物質があるのでは、とは感じている。

・最近、「経皮感作」ということがさかんに言われるようになったので、いろいろな物質で今後問題がおこりそうな気がします。

・不明な添加物が含まれている場合が多いので気をつけて使用しなければならないと思う。

・最近豆乳を含む石鹸などが市販されており、アレルギーをおこす可能性があると思う。食品をせっけんなどに混ぜることはやめて頂きたい。

・化粧の若年化など以前よりリスクは高まっていると考える。他方で過度の制限でアレルギーとは異なる影響の経験もあり、添加物の情報提供が大事である。

・何らかの使用基準が必要ではないか。

・規制、罰則が甘いと思う。

さらに、要望としては、

・今までの小さな字での記載を大きくし、特に食品由来や生物由来は別表記とし販売時の説明を義務づけるような、法整備を検討してはどうか。

・（目で確認できるものについては）国民全体に広く周知し、迅速な対応がとれるよう対応等の立案をお願いしたい。

・医師会などのメールを通じて情報がほしい。

・テレビコマーシャルの宣伝ももう少し規制した方がよい。

・擬似薬品の広告宣伝に歯止めが必要だと考える。

・数多くある添加物で、何がアレルギーを発症するか明確な所はなく、簡単に良し悪しの判断できないが、症例の蓄積と情報ネットワークでより早期に発症物質が判明できれば、被害は最小限に食い止められると思う。

・食品由来成分の添加物に対する反応は個人差があると思うので、一律に禁止することは無理だと思うが、十分に検討してから製品化する努力を惜しまないで頂きたい。

・化粧品、医薬部外品などによる健康被害発生の監視迅速に被害拡大の防止策を実行できる強力な国の体制を確立してもらいたい。

・誇大広告の規制等を迅速に進めることを期待する。

・ビタミン剤、ミネラル、諸種食品栄養成分を添加して、皮膚から吸収され、又、皮膚組織の栄養成分となるごとき効果を書き並べているが、根拠がどこまで実証的であるのか、調査が望ましい。

・食品由来だから安心、安全とあまり思わせない宣伝を願う。

以上のような意見が挙げられた。

## D. 考察

アンケートの回収率は7.0%と低値であった。これは、昨年とほぼ同じ医療機関からの回答が多くを占めていることが推定される。

回答した医師の性別は圧倒的に男性が多く、勤務医に比べ開業医のほうが年齢が高いなどの傾向についても昨年と同様であった。

「茶のしずく」洗顔石鹸が原因で発症した患者の「茶のしずく石鹸等による小麦アレルギー情報サイト」への登録に関しても、昨年同様、登録していないと回答した割合が高い。一方、登録サイトにおける昨年の記録では、昨年度に本調査を実施した時期である1月期に急激に登録者数が増加している。

小麦以外の加水分解物が添加されている化粧品や医薬部外品によってアレルギーなどの健康被害が起きているかについては、3名の医師が症例を経験していると答えているが、原因物質など詳細については、明らかにすることは出来なかった。その一因として、回答者の多くが開業医であり、検索システムがないため、過去のカルテを精査することが困難であることが考えられる。本調査の対象地域は、北海道であり、サンプル数も多くはないので断定的なことは言えないが、前年度の調査において、「茶のしずく」洗顔石鹸以外的小麦加水分解物による発症例が確認できなかったことも考慮すると、小麦以外の加水分解物を添加した化粧品や医薬部外品によるアレルギー発症のリスクについても、あまり高くはないものと推定される。

小麦、およびその他の食品の加水分解物を使用した化粧品や医薬部外品による食物アレルギー発症に関して、小麦タンパク質、「茶のしずく」洗顔石鹸の特殊性が大きく影響している可能性が考えられる。すなわち、小麦に含まれるタンパク質は、いずれもアミノ酸組成が非常によく似ており、グルタミンを多く含むため加熱加水分解により脱アミド化がおきやすいこと、「茶のしずく」洗顔石鹸で使用された小麦加水分解物の平均分子量が比較的大きいこと、さらに、販売個数が多かったことなどの要因が重なったことが、発症の一因として考えられる。

## E. 結論

・小麦以外の食品由来の加水分解物を添加している

化粧品、医薬部外品でのアレルギー発症例は確認されたが、非常に少なかった。しかし、発症した場合、アナフィラキシーなど重症化する可能性があるため、注意が必要である。

・食品由来であっても、化粧品や医薬部外品に使用される場合には、アレルギー発症のリスクがあることを医師を介して、あるいは、国民へ直接、効果的に情報を伝えることが重要である。

・化粧品や医薬部外品を製造するメーカーだけが製品に対する責任を負うのではなく、素材を供給するメーカーにおいても、厳しく安全性について検討する必要があると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Inuo, C., Kondo, Y., Itagaki, Y., Kurihara, K., Tsuge, I., Yoshikawa, T., Urisu, A., Anaphylactic reaction to dietary oats: The first case report. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 110, 305-306, 2013.

2. Nakagawara, R., Itagaki, Y., Kohno, M., Matsukura, S., Miyazawa, M., Kumasaka, K., Kojima, T., Ikezawa, Z., Aihara, M. Analysis of Novel Soybean Allergens That Cause Food-Induced Anaphylaxis. *Food Sci. Technol. Res.* 19, 617-621, 2013

### 2. 学会発表

なし

## G. 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

**平成 25 年度厚生労働科学研究 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によるアレルギー症状発症に関するアンケート調査**

・開業または医療機関等に勤務されている**医師の方**にお聞きします。何卒、ご協力のほど、お願いいたします。

**本調査は、平成 25 年度厚生労働科学研究 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」に基づくアンケート調査です。**

【調査内容】 今年度の本調査は、市販されている**化粧品、医薬部外品に添加物として使用されている食品由来の加水分解物（小麦加水分解物を除く。たとえばコラーゲン加水分解物など）が原因と考えられる食物アレルギー発症事例**に関する調査です。

【実施方法】 アンケート用紙は郵送で送付し、FAX にて回収いたします。

**送信先 FAX 番号（フリーダイヤル） 0120-938-850 北海道文教大学 板垣康治 宛**

**2～4 ページ（合計 3 枚）をご返送ください。**

**FAX 番号をお間違いのないようお願いいたします。**

【実施期間】 **平成 25 年 1 月 1 日（水）～1 月 31 日（金）迄**

【回答取扱】 得られた結果は、統計学的な解析を行い、厚生労働省へ報告いたします。なお、ご協力いただきました結果につきましては、本研究以外の目的には使用いたしません。

【実施責任者】 北海道文教大学 人間科学部健康栄養学科 板垣 康治（分担研究者）  
北海道文教大学人間科学部健康栄養学科 手嶋哲子

【問合せ先】 北海道文教大学人間科学部健康栄養学科 板垣 康治  
電話 0123-34-1639  
メール yitagaki@do-bunkyo.ac.jp

開業、または医療機関等に勤務されている医師の方にお聞きします。何卒ご協力くださいますよう宜しくお願いいたします。

貴医療機関名；
所在地（市町村名）；

【問 1】 性別を教えてください。どちらかに をつけてください。 ・男性 ・女性

【問 2】 御年齢を教えてください。該当するものに をつけてください。

1 . 2 0 代 2 . 3 0 代 3 . 4 0 代 4 . 5 0 代 5 . 6 0 代 6 . 7 0 代以上

【問 3】 御専門分野（標榜、または御担当されている科名）に をつけてください（複数回答可）。

1 . 内科（ 内科） 2 . 小児科 3 . アレルギー科 4 . 皮膚科 5 . 眼科 6 . 耳鼻咽喉科  
7 . その他（ ）

【問 4】 勤務されている、あるいは開業されている医療機関の施設区分を選択してください。該当するものに をつけてください。

1 . 無床診療所 2 . 有床診療所 3 . 病院 4 . その他（ ）

【問 5】 病床数をお答えください。該当するものに をつけてください。

1 . 0 2 . 1 ~ 1 9 3 . 2 0 ~ 4 9 4 . 5 0 ~ 9 9 5 . 1 0 0 ~ 1 9 9  
6 . 2 0 0 ~ 2 9 9 7 . 3 0 0 ~ 3 9 9 8 . 4 0 0 ~ 4 9 9 9 . 5 0 0 ~ 9 9 9  
1 0 . 1 0 0 0 以上

【問 6】 貴院、または貴科の一ヶ月の平均受診者数をお書きください。

1 . 貴科として 2 . 貴診療所 / 病院として 約 \_\_\_\_\_ 人

【問 7】 化粧品、医薬部外品に添加物として、食品由来のタンパク質成分が使用されている場合があることをご存知ですか？ 知っている 知らない

【問 8】 これまでに、洗顔石鹸「茶のしずく」に含有していた小麦加水分解物が原因の小麦アレルギー患者を診察したことがありますか？ これまでに何件くらいの症例を診察されましたか？

ない ある（ 例）

【問 9】【問 8】で「ある」と答えた方にお聞きします。日本アレルギー学会では、「茶のしずく」石鹸による皮膚アレルギーおよび小麦アレルギー疾患発症に対応するために「化粧品のタンパク加水分解物の安全性に関する特別委員会」を発足しました。その活動の一環として、症例の実態を把握するために、当該症例を経験されているすべての医師の皆さまを対象として、症例の登録をお願いしておりますが、登録はされましたでしょうか？

登録した 登録していない

【問 10】【問 9】で「登録した」と答えた方にお聞きします。症例登録制度はどのようにして知りましたか。

☑をしてください。

日本アレルギー学会HP      テレビ      新聞・雑誌      平成 24 年度の本アンケート調査

その他 ( )

【問 11】 食品由来加水分解物(小麦加水分解物を除く。コラーゲン加水分解物など。シルクタンパク質加水分解物、真珠タンパク質加水分解物を含む)を含有している化粧品や医薬部外品が原因と考えられる食物アレルギーの症例を診察した経験はありますか? これまでに何件くらいの症例を診察されましたか?

ない      ある (      例 )

**「ない」と答えられた方は、【問 14】にお進みください。**

【問 12】 【問 11】で「ある」と答えた方にお聞きします。原因となった商品が判明している場合は、商品ごとに商品名、メーカー名と件数をご記入ください。

例) 商品名: ○○洗顔石鹸      原因物質名: 豚コラーゲン加水分解物      件数: 3 件  
メーカー名: ○○化粧品(株)

1 .商品名: \_\_\_\_\_ 原因物質名: \_\_\_\_\_ 件数: \_\_\_\_\_ 件  
メーカー名: \_\_\_\_\_

2 .商品名: \_\_\_\_\_ 原因物質名: \_\_\_\_\_ 件数: \_\_\_\_\_ 件  
メーカー名: \_\_\_\_\_

3 .商品名: \_\_\_\_\_ メーカー名: \_\_\_\_\_ 件数: \_\_\_\_\_ 件  
メーカー名: \_\_\_\_\_

【問 13】 【問 11】で「ある」と答えた方にお聞きします。

原因となった食品由来加水分解物を含有する化粧品や医薬部外品を患者様が使用した期間(または回数)をご記入ください。(複数回答可)

- 1 . 1 回のみ (      人 )      2 . 2 回 (      人 )      3 . 3 回 (      人 )      4 . 1 週間 (      人 )  
5 . 1 カ月間 (      人 )      6 . 3 カ月間 (      人 )      7 . 6 カ月間 (      人 )  
8 . 1 年以上 (      人 )      9 . 不明

患者様の性別をご記入ください。

- 1 . 男性 (      人 )      2 . 女性 (      人 )      3 . 不明 (      人 )

患者様の年齢をご記入ください。

[ 男性 ]

- 1 . 0 ~ 9 歳 (      人 )      2 . 10 ~ 19 歳 (      人 )      3 . 20 ~ 29 歳 (      人 )  
4 . 30 ~ 39 歳 (      人 )      5 . 40 ~ 49 歳 (      人 )      6 . 50 ~ 59 歳 (      人 )  
7 . 60 ~ 69 歳 (      人 )      8 . 70 ~ 79 歳 (      人 )      9 . 80 歳以上 (      人 )

〔女性〕

- 1 . 0 ~ 9 歳 ( 人 )    2 . 10 ~ 19 歳 ( 人 )    3 . 20 ~ 29 歳 ( 人 )  
4 . 30 ~ 39 歳 ( 人 )    5 . 40 ~ 49 歳 ( 人 )    6 . 50 ~ 59 歳 ( 人 )  
7 . 60 ~ 69 歳 ( 人 )    8 . 70 ~ 79 歳 ( 人 )    9 . 80 歳以上 ( 人 )

症状についてお答えください。発症部位、例数、具体的な症状についてご記入ください。

- 1 . 眼 ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )  
2 . 鼻 ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )  
3 . 顔 ( 眼、鼻以外 ) ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )  
4 . 口腔・咽喉頭部 ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )  
5 . 気道 ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )  
6 . 体躯 ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )  
7 . アナフィラキシー ; \_\_\_\_\_ 例 ( \_\_\_\_\_ )

他にアレルギー疾患をお持ちでしたでしょうか？

- 1 . ない    2 . ある

で「ある」と答えた方にお聞きします。具体的なアレルギー疾患名をお答えください。

- 1 . 食物アレルギー ( \_\_\_\_\_ 例 )    2 . 花粉症 ( \_\_\_\_\_ 例 )    3 . アトピー性皮膚炎 ( \_\_\_\_\_ 例 )  
4 . 喘息 ( \_\_\_\_\_ 例 )    5 . その他 ( \_\_\_\_\_ 例 )

で「食物アレルギー」と答えた方にお聞きします。具体的な原因食品名をお答えください。

- 1 . \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ 例 )    2 . \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ 例 )    3 . \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ 例 )  
4 . \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ 例 )    5 . \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ 例 )    6 . \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ 例 )

【問 14】化粧品、医薬部外品の添加物（食品由来成分）に関して、お気づきの点、ご意見をお書きください。

以上で質問は終了です。お忙しいところご協力をいただきまして誠にありがとうございました。

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25年度)

## 医薬部外品等による国内外のアレルギー発症事例の文献調査

研究分担者 海老澤 元宏 国立病院機構相模原病医院臨床研究センター  
アレルギー性疾患研究部 部長

### 研究要旨:

医薬部外品のうち内服薬による健康被害に関して文献的調査を行うことを目的とした。方法: 医薬部外品のうち内服薬によるアレルギー発症事例について、本邦および諸外国における報告事例を過去10年(2004~2013年)にわたり調査を行った。結果: 医薬部外品のうち内服薬による副作用報告は本邦においてウコンによる薬疹4例の報告が最も多かった。また、漢方に用いられる生薬では、麻黄、茴香(ウイキョウ)、縮砂(シクシャ)による薬疹でそれぞれ1例、甘草によるアナフィラキシーで1例の報告を認めた。ビタミンでは、フルスルチアミン(ビタミンB1)による薬疹で1例、リン酸リボフラビンナトリウム(ビタミンB2)によるアナフィラキシーショックで1例の報告を認めた。諸外国では acetaminophen による蕁麻疹13例、アナフィラキシー3例の報告が最も多かった。考察: 医薬部外品のうち内服薬による健康被害の報告は少ないが、比較的安全と考えられている成分でも健康被害を起こすことがあり、一層注意喚起することが必要である。

### 協力研究者

岡田 悠 国立病院機構相模原病院 小児科

### A. 研究目的

本研究は医薬部外品の不適切使用による接触皮膚炎・アレルギー等の健康被害に関して国内外での発生報告事例を中心に文献的調査を行うことを目的としている。

平成24年度は化粧品など外用薬を中心に調査を行い、診断用の試薬がある成分の接触性皮膚炎の報告や食物成分を使用した製品によるアナフィラキシーの報告があることをまとめた。

平成25年度はドリンク剤・胃腸薬などの内服薬を中心に健康被害の調査を行った。

### B. 研究方法

医薬部外品のうち内服薬によるアレルギー

発症事例について、本邦および諸外国における報告事例を過去10年(2004~2013年)にわたり調査した。

医学中央雑誌刊行会(医中誌)、U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed)を用い、表1に示す検索キーワードで検索を行い、得られた論文について検討した。

表1. 検索キーワード

	keyword
医中誌	ドリンク剤, 胃腸薬, カルシウム含有保健薬, 健胃薬, 瀉下薬, 消化薬, 生薬, 生薬含有保健薬, 整腸薬, ビタミン含有保健薬, アレルギー
PubMed	over the counter, nonprescription, allergy

## C. 研究結果

医中誌、Pubmed 検索による医薬部外品のうち内服薬に関するアレルギー発症事例の検索結果を表 2、表 3 に示す。それぞれの検索によって得られた報告症例数を表 4、表 5 に示す。アナフィラキシーの症例報告を表 6 に示す。本邦ではウコンによる薬疹 4 例の報告が最も多かった(表 4)。また、漢方に用いられる生薬では、麻黄、茴香(ウイキョウ)、縮砂(シュクシャ)による薬疹でそれぞれ 1 例、甘草によるアナフィラキシーで 1 例の報告を認めた(表 4、表 6)。ビタミンでは、フルスルチアミン(ビタミン B1)による薬疹で 1 例、リン酸リボフラビンナトリウム(ビタミン B2)によるアナフィラキシーショックで 1 例の報告を認めた(表 4、表 6)。諸外国では acetaminophen による蕁麻疹 13 例、アナフィラキシー 3 例の報告が最も多かった(表 5)。

表 2. 検索結果(医中誌)

keyword	検索結果数
ドリンク剤	88
胃腸薬	3073
カルシウム含有保健薬	0
健胃薬	23
瀉下薬	24
消化薬	3098
生薬	572
生薬含有保健薬	0
整腸薬	84
ビタミン含有保健薬	2

表 3. 検索結果(PubMed)

keyword	検索結果数
over the counter, nonprescription	261

## D. 考察

1. 医薬部外品によるアレルギー等の健康被害の報告は、外用薬が多いもので 1 成分あたり 1000 名近くの報告があったことに対して、内服薬は多いものでも 1 成分あたり 10 数名の報告であった。

これは国内外で医薬部外品の内服薬に用いる

ことができる成分を、適切に判断できていることが示唆された。一方、文献調査の限界として、内服薬による健康被害のうち軽症事例を把握しきれていない可能性が考えられた。

2. 症例は少ないが、小児の解熱鎮痛薬として頻用されるアセトアミノフェン(acetaminophen)、漢方の 1 成分である甘草、ドリンク剤に含まれるリン酸リボフラビンナトリウム(ビタミン B2)などでアナフィラキシー発症例の報告があった。このため、これらの成分でもアナフィラキシーが起こる可能性について注意が必要である。

## E. 結論

医薬部外品のうち内服薬は、外用薬と比べて健康被害の報告は少なかった。しかし、比較的安全と考えられている成分でも健康被害を起こすことがあり、一層注意喚起することが必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ebisawa M, Brostedt P, Sjölander S, Sato S, Borres MP, Ito K. Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children. . J Allergy Clin Immunol. 2013 ; 132(4) : 976-978
- 2) Simons FE , Arduzzo LR , Dimov V , Ebisawa M , El-Gamal YM , Lockey RF , Sanchez-Borges M , Senna GE , Sheikh A , Thong BY , Worm M .World allergy organization anaphylaxis guidelines: 2013 update of the evidence base. . Int Arch Allergy Immunol. 2013 ; 162(3) : 193-204
- 3) M Ebisawa , S Nishima , H Ohnishi , N Kondo . Pediatric allergy and immunology in Japan . Pediatric Allergy and Immunology 2013 ; 24(7) : 704-14

- 4) Ohta K, Jean Bousquet P, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J. . Visual analog scale as a predictor of GINA-defined asthma control. The SACRA study in Japan. . J Asthma. 2013 ; 50(5) : 514-21
- 5) Shimizu Y, Kishimura H, Kanno G, Nakamura A, Adachi R, Akiyama H, Watanabe K, Hara A, Ebisawa M, Saeki H. . Molecular and immunological characterization of  $\beta^2$ -component (Onc k 5), a major IgE-binding protein in chum salmon roe. . Int Immunol. 2013 ; [Epub ahead of print] :
- 6) G W Canonica, I J Ansotegui, R Pawankar, P Schmid-Grendelmeier, M van Hage, C E Bae-na-Cagnani, G Melioli, C Nunes, G Passalacqua, L Rosenwasser, H Sampson, J Sastre, J Bousquet, T Zuberbier and WAO-ARIA-GA2LEN Task Force: K Allen, R Asero, B Bohle, L Cox, F de Blay, M Ebisawa, R Maximiliano-Gomez, S Gonzalez-Diaz, T Haahtela, S Holgate, T Jakob, M Larche, P M Matricardi, J Oppenheimer, L K Poulsen, H E Renz, N Rosario, M Rothenberg, M Sanchez-Borges, E Scala, R Valenta . A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics . World Allergy Organization Journal 2013 2013; [Epub ahead of print] :
- 7) 今井孝成, 海老澤元宏 . 全国経口食物負荷試験実施状況 -平成 23 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査から- . アレルギー 2013 ; 62(6) : 681-8
- 8) 海老澤元宏, 伊藤浩明 . ピーナッツアレルギー診断における Ara h 2 特異的 IgE 抗体測定の意義 . 日本小児アレルギー学会誌 2013 ; 27(4) : 621-8
- 9) 今井孝成, 杉崎千鶴子, 海老澤元宏 . アナフィラキシー症状におけるアドレナリン投与のタイミングに関する意識調査 . アレルギー 2013 ; 62(11) : 1515-21
- 2 . 学会発表
- 1) Motohiro Ebisawa . Plenary Symposium : Management of food allergy .EAACI - WAO World Allergy & Asthma Congress . Milan, Italy 2013.6.22-26
- 2) Motohiro Ebisawa . Scientific presentation : Oral Immunotherapy for Food Allergy . 7th International Summit on Allergic Diseases . Beijing, China 2013.7.27
- 3) Motohiro Ebisawa .Symposium2 : Immunotherapy in respiratory allergy . APAPARI-AAIAT Joint Congress 2013 . Bangkok, Thailand 2013.10.2-4
- 4) Motohiro Ebisawa .Symposium3 : Recent advance in food allergy diagnosis . APAPARI-AAIAT Joint Congress 2013 . Bangkok, Thailand 2013.10.2-4
- 5) Motohiro Ebisawa . FA Symposium3 : Food allergen immunotherapy, can anyone develop tolerance? . APAPARI-AAIAT Joint Congress 2013 . Bangkok, Thailand 2013.10.2-4
- 6) Motohiro Ebisawa . Scientific program : Use of Allergen Components: A New Era in Allergology . WAO Symposium on Immunotherapy and Biologics 2013 . Chicago, USA 2013.12.13-14
- 7) 海老澤元宏, 柳田紀之, 小倉聖剛, 佐藤さくら . イブニングシンポジウム : 食物アレルギーに対する経口免疫療法の意義と作用機序 .第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 . 横浜市 2013.5.11-12
- 8) 海老澤元宏, 林典子, 杉崎千鶴子, 飯倉克人 . 一般演題 : エリスリトール (甘味料) 等の摂取による即時型アレルギー全国調査 .第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 . 横浜市 2013.5.11-12
- 9) 海老澤元宏 . シンポジウム : 小児気管支喘息に関連する他のアレルギー疾患 .第 23 回国際喘息学会 日本・北アジア部会 . 千代田区 2013.6.28-29
- 10) 海老澤元宏 . シンポジウム 1 : 食物アレルギーの最新の対応 . 第 37 回日本小児皮膚科学会 . 港区 2013.7.14-15
- 11) 海老澤元宏 . 第 5 回研究小集会 : 鶏卵アレルギーに関する最近の話題 . 第 60 回日本食品科学工学会 . 日野市 2013.8.29-31

- 12) 海老澤元宏 . Presidential Plenary : 自分の経験から次世代の先生方へのメッセージ . 第 50 回日本小児アレルギー学会 . 横浜市 2013.10.19-20
- 13) 海老澤元宏 . シンポジウム 1 : 学校におけるアレルギー対応 ( 沙清さん追悼シンポジウム ) 学会の立場で . 第 50 回日本小児アレルギー学会 . 横浜市 2013.10.19-20
- 14) 海老澤元宏 . シンポジウム 5 : 経口免疫療法の現状・急速法・緩徐法のまとめ . 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 千代田区 2013.11.28-30
- 15) 海老澤元宏 , 佐藤さくら . イブニングシンポジウム 10 : ピーナッツ・大豆アレルギー診療におけるコ

ンポーネント特異的 IgE 測定の意義・活用方法 . 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 千代田区 2013.11.28-30

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 4. 報告症例数(アナフィラキシー症例を除く、医中誌)

製品	原因物質	論文数	薬疹	肝機能障害	作用
ウコン茶など	ウコン	4	4		
麻黄附子細辛湯	麻黄	1	1		発汗作用 鎮咳作用
胃腸薬	茴香(ウイキョウ)	1	1		健胃作用
胃腸薬	縮砂(シュクシャ)	1	1		健胃作用
胃腸薬	不明	1	1		
センナ茶	センノシド	1	1		緩下作用
緩下薬	フェノールフタレイン	1	1		
ドリンク剤	フルスルチアミン (ビタミン B1)	1	1		
中国製ダイエット用健康食品	不明	2		2	
防風通聖散	不明	1		1	
アガリクス	カワハリタケ	1		1	

表 5. 報告症例数(PubMed)

製品	原因物質	論文数	蕁麻疹	アナフィラキシー	薬疹	作用
解熱鎮痛薬	acetaminophen	1	13	3		解熱鎮痛
解熱鎮痛薬	naproxen	1			2	解熱鎮痛

表 6. アナフィラキシー症例(医中誌、Pubmed)

製品	原因物質	年齢	性別	症状	報告年	雑誌
大黄甘草湯	甘草	31	女性	アナフィラキシー	2007	アレルギー
ドリンク剤	リン酸リボフラビンナトリウム (ビタミン B2)	23	女性	アナフィラキシー ショック	2008	アレルギー
ドリンク剤	Major Royal Jelly protein 1,2	17	男性	アナフィラキシー	2011	皮膚病診療
クラッシュゼリー	Major Royal Jelly protein 1,2	18	男性	アナフィラキシー	2011	昭和医学会雑誌
鎮咳薬	Clobutinol	38	男性	アナフィラキシー	2007	Emerg Med J

## 医薬部外品等の国内のアレルギー発症事例調査並びに事後の経過観察

研究分担者 福富 友馬 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
診断・治療薬開発研究室 室長

### 研究要旨:

茶のしずく石鹼®(悠香)の使用によりその添加成分である加水分解小麦(グルパール19S®)に経皮経粘膜感作されることによって発症した経口小麦アレルギーの症例の、発症の事後の経過について明らかにするために観察研究を行った。

本年度は生存時間分析(Survival analysis)のモデルにより、石鹼使用中止後の経過期間と小麦アレルギー症状との関係について検討した。石鹼使用中止からの時間が経過するほど、略治状態まで改善する患者の割合が増加している傾向が示されているが、石鹼中止後4-5年を経過しても略治に至っているものは半数に達していない。現在、略治に至っていない者の臨床症状が、今後間違いなく改善して行くのかどうかも明らかでなく、これらの患者に関しては今後も注意深い経過観察が必要であると考えられる。

### 協力研究者

南 崇史 国立病院機構相模原病院  
アレルギー科  
齋藤 明美 国立病院機構相模原病院  
臨床研究センター

### A. 研究目的

(旧)茶のしずく石鹼®(悠香)の使用により加水分解コムギ(グルパール19S®)に経皮経粘膜感作されることによって発症した経口小麦アレルギー症例の、事後の経過について明らかにする。

本年度は、生存時間分析(Survival analysis)の統計モデルにより、石鹼使用中止から経過期間と小麦アレルギー症状の改善との関係について検討した。

### B. 研究方法

1. 対象患者  
NHO 相模原病院アレルギー科を受診した、以下の3つの条件を満たす患者を調査対象とした。

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」作成の「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(資料1)」を満たす。

2012年8月までに当科に初診。

2012年9月以降1回以上の受診歴がある。

上記を満たす患者84名のうち、も満たすものが61名存在した。61名を調査対象とした。

## 2. 調査期間と調査対象

初診時から 2013 年 10 月 30 日までの、カルテ情報。初診時のカルテから抽出した調査項目は表 1 に示した。外来受診ごとに以下項目を評価した。

< 定期外来受診時の評価項目 >

### ✓投薬状況

抗ヒスタミン薬の予防内服の有無

### ✓小麦摂取状況

安静時の摂取状況

軽運動前の摂取状況

中等度運動前の摂取状況

強運動前の摂取状況

### ✓特異的 IgE 抗体価

小麦-IgE

グルテン-IgE

5-gliadin-IgE

グルパール 19S - IgE

## 3. アウトカム

今回の検討では、小麦を通常に摂取して中等度の運動(スポーツとして行う激しい運動ではなく、息が切れない程度の、日常生活で行う範囲内の運動)を症状なく習慣的に3か月以上行っている状態を「略治」と定義し、これをアウトカムとした。

## 4. 統計解析

調査対象者の選択バイアスの有無の検討のために、調査対象者と非対象者の背景因子の比較をした。

Kaplan-Meier) 曲線にて(旧)茶のしづく石鹼中止から経過期間と「略治」状態まで改善したものの割合との関係を示した。

コックス比例ハザードモデル(Cox's proportional hazard model)にて「略治」の予測因子の検討を行った。

解析は SPSS (IBM 社) を用いて行った。

## 5. 倫理

本研究は、国立病院機構相模原病院倫理委員会の承認を経て行われた。

## C. 研究結果

方法 1. の条件を満たす患者がカルテ調査で 84 名存在したが、継続的に受診しており の条件を満たす患者は 61 名( = 本研究調査対象者)しか存在しなかった。最初に、調査対象者のバイアスの有無を評価するために、84 名のうち今回調査対象となった 61 名と、対象にならなかった 23 名に関してその背景因子に差異があるかどうか検討した(表 2)。両群で有意差を認めたのは年齢と、小麦摂取による全身性皮膚症状の 2 つの因子のみであった。

図 1 に調査対象者 61 名の石鹼使用中止からの経過期間と「略治」状態まで改善したものの割合との関係を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。石鹼使用中止後 3 年(36 か月)で累積略治者の割合が 23%、4 年(48 か月)で 28%であった。経過中に、研究期間の終了という理由以外の理由で観察打ち切りとなった患者は 1 名のみ(外来に受診しなくなった)であった。

表 3 にコックス回帰分析による、各背景因子と略治の関係について示した。安静時誘発のエピソード、小麦アレルギー症状として全身性皮膚症状、呼吸器症状があると、略治しにくい(すなわち、予後が悪い)という傾向を認めた。また、小麦、パンによる Skin prick test 膨疹径、小麦、グルテン、グルパール 19S への特異的 IgE 抗体価が高いと予後が悪い傾向を認めた。

表 4 に示すのは、表 3 で有意差を認めた背景因子をステップワイズ(変数増加法)ですべて投入したコックス回帰分析の結果である。表に示した因子以外の因子はモデルから除外され、このモデ

ルから、グルテンに対する IgE 抗体価高値と、安静時の症状誘発のエピソードがあるという因子があると、有意に略治しにくいという結果が得られた。

#### D. 考察

本研究は、主に当科に定期通院をしている患者が対象になっている。調査対象患者は非調査対象患者に比べて、年齢が低い傾向を認めた。これは、若年患者は患者側の都合で定期通院が困難となりやすいためであると考えられる。その他の因子では一つを除き有意差を認めるものは無かった。研究開始前に、調査対象患者、すなわち定期通院患者は、一般的な患者に比べて、重症度の高い患者に偏っている可能性を危惧していたが、実際には明らかなそのような傾向は無かった。したがって、本研究の結果の外的妥当性はある程度担保されていると考えている。

カプランマイヤー曲線に示したとおり、経年的に「略治」状態になる患者が増加はしているが、石鹼中止後4年を経過してもその割合は28%に留まっていた。一方で本研究結果としては示していないが、4年経過しても一切小麦摂取ができていない患者も少なからず存在している。小麦アレルギー症状の改善傾向がすべて患者において例外なく認められているのかどうかは明らかではない。

初診時の特異的 IgE 抗体価が高く、安静時にも小麦アレルギー症状が誘発されていることが、予後不良の危険因子として見出された。すなわち、概して初診時に重症であった患者は、その後の経過も良好でない傾向が認められている。

#### E. 結論

生存時間分析 (Survival analysis) のモデルによ

り、石鹼使用中止後の経過期間と小麦アレルギー症状との関係について検討した。石鹼使用中止からの時間が経過するほど、略治状態まで改善する患者の割合が増加している傾向が示されているが、石鹼中止後4-5年を経過しても略治に至っていないものは半数に達していない。現在、略治に至っていない者の臨床症状が、今後間違いなく改善して行くのかどうかも明らかでなく、これらの患者に関しては今後も注意深い経過観察が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahashi K, Taniguchi M, Fukutomi Y, Sekiya K, Watai K, Mitsui C, Tanimoto H, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Minoguchi K, Nakajima H, Akiyama K. Oral Mite Anaphylaxis Caused by Mite-Contaminated Okonomiyaki/Pancake-Mix in Japan: 8 Case Reports and a Review of 28 Reported Cases. *Allergol Int.* in press

Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R. Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Dec; 132(6): 1436-1438. e4.

Sekiya K, Taniguchi M, Fukutomi Y, Watai K, Minami T, Hayashi H, Ito J, Tanimoto H, Oshikata C, Tsurikisawa N, Tsuburai T, Hasegawa M, Akiyama K. Age-Specific Charac-

teristics of Inpatients with Severe Asthma Exacerbation. Allergol Int. 2013 Jun 25.

Nakazawa T, Khan AF, Yasueda H, Saito A, Fukutomi Y, Takai T, Zaman K, Yunus M, Takeuchi H, Iwata T, Akiyama K. Immunization of rabbits with nematode *Ascaris lumbricoides* antigens induces antibodies cross-reactive to house dust mite *Dermatophagoides farinae* antigens. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(1):145-50.

Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R. Evaluation of Allergenicity of Acid-Hydrolyzed Wheat Protein Using an in vitro Elicitation Test. Int Arch Allergy Immunol. 2013;160(3):259-64.

福富 友馬 国立病院機構 相模原病院  
臨床研究センター (旧)茶のしずく石鹼による小麦アレルギー問題からの教訓 職業・環境アレルギー誌 20 (2) p1-11 2013

## 2 . 学会発表

福富友馬 茶のしずく石けんによる小麦アレルギーの総括 第13回 食物アレルギー研究会 特別プログラム 2013.1.27 東京

福富友馬 内科アレルギー科医師がみるアナフィラキシーの実態と対策 第25回アレルギー学会 春季臨床大会 イブニングシンポジウム 2013.5.11 横浜

福富友馬 加水分解コムギアレルギー：最新の知見. 第50回日本小児アレルギー学会 シンポジウム 2013/10/19 横浜

福富友馬 成人の吸入性アレルギー・食物アレルギーにおけるアレルゲンコンポーネント解析. 第63回 日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム 2013.11.29 東京

## G . 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

**資料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

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

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,接触蕁麻疹(痒み,眼瞼浮腫,鼻汁,膨疹など)が出現した。
  - 2-2)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(備考参照)。
  - 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。

表 1 初診時の調査項目

Demographics	(旧)茶のしずく石 鹼の使用状況	小麦アレルギー症状 (初診時)	アレルギー検査(初診時)
初診時年齢	使用開始年月	これまでの症状の回数	SPT(小麦、パン、GLP19S)
性別	使用中止年月	これまでのAnの回数	IgE(小麦、グルテン、GLP19S)
アレルギー性合併 症(AR,AD,BA)	使用期間(月)	運動誘発の有無	総IgE
精神疾患の合併	使用時の接触症状 の有無	非運動時の症状誘発の 既往	
		誘発症状の内容	

表 2 調査対象者と非調査対象者の背景因子の違い

	調査対象者 N=61	非調査対象者 N=23	P value
初診時年齢 (yrs, median)	<b>42</b>	<b>36</b>	<b>0.006</b>
性別(女性、%)	100%	100%	n.s.
喫煙習慣あり(%)	10%	9%	n.s.
石鹼使用状況			
使用期間(month, median)	25.5	22	n.s.
使用開始から発症までの期間(month, median)	18	14	n.s.
使用中止から初診までの期間 (month, median)	5	8	n.s.
使用時の接触蕁麻疹症状あり (%)	74	67	n.s.
合併症 (%)			
AR	49	57	n.s.
AD	10	22	n.s.
BA	10	9	n.s.
何らかの精神疾患	5	4	n.s.
初診までの小麦アレルギー発作回数が5回以上 (%)	59	68	n.s.
運動誘発のエピソードあり (%)	93	96	n.s.
安静時誘発のエピソードあり (%)	61	64	n.s.
小麦アレルギー症状(最も重篤な時)			
眼瞼・鼻症状	85%	96%	n.s.
全身性皮膚症状	<b>82%</b>	<b>59%</b>	<b>0.043</b>
呼吸器症状	34%	18%	n.s.
消化器症状	49%	46%	n.s.
血圧低下とその関連症状	39%	41%	n.s.
Skin prick test 膨疹径			
小麦 (mm, median)	1	1	n.s.
パン(mm, median)	1	2	n.s.
グルパール 19S 0.01%(mm, median)	4	3	n.s.
血清総IgE値 (IU/mL, 対数変換値(底10), median)	2.105	2.188	n.s.
特異的IgE抗体価(IU/mL, 対数変換値(底10), median)			
コムギ	0.0455	-0.0808	n.s.
グルテン	0.1873	0.0336	n.s.
グルパール 19S	0.8610	0.7057	n.s.

図1 カプランマイヤー曲線：石鹼使用中止からの経過期間と「略治」状態まで改善したものの割合

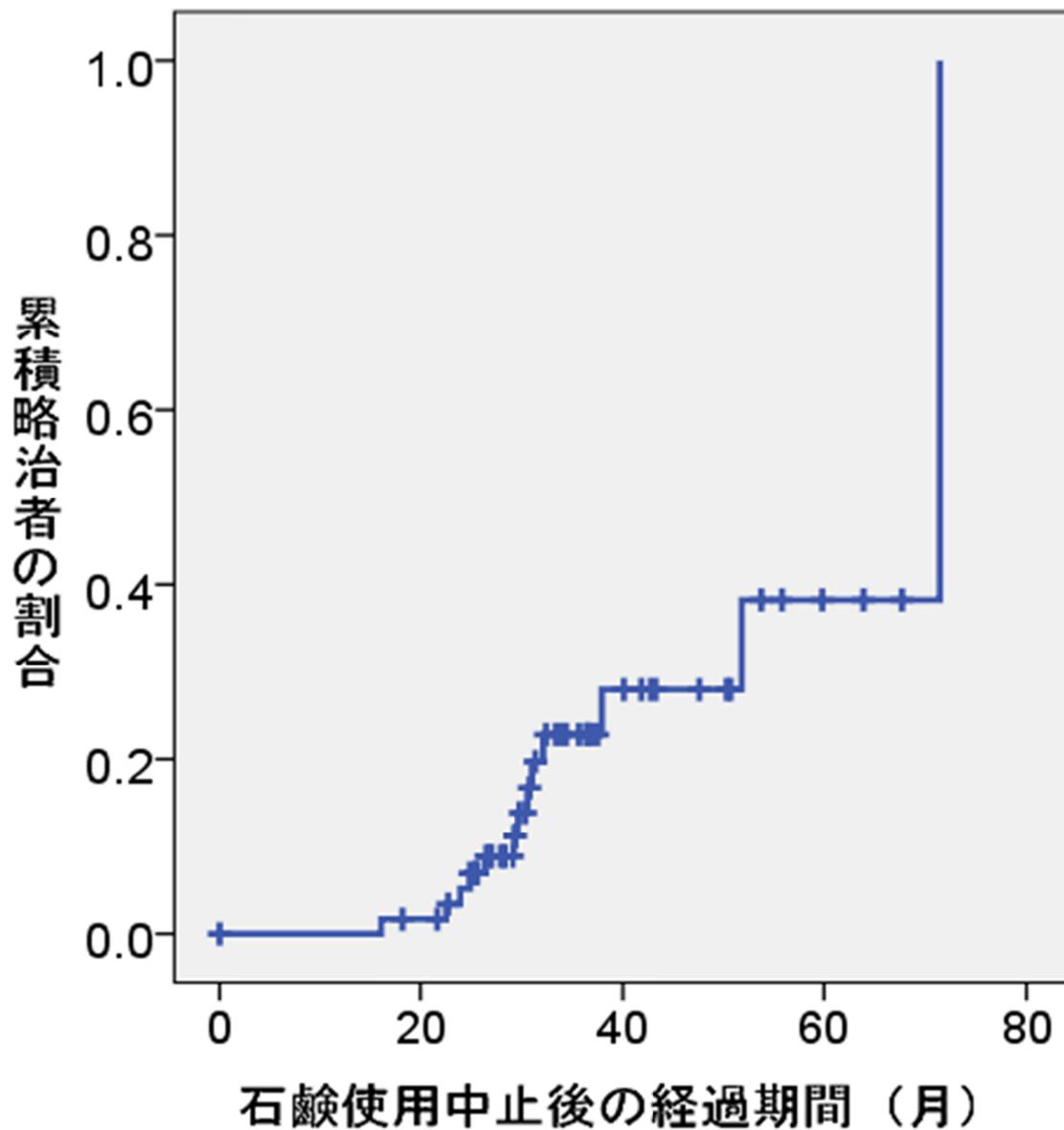


表3．略治の予測因子（調整されていないハザード比（95%信頼区間））

初診時の因子	Unadjusted HR (95%CI)	P value
初診時年齢 (per 1-year increase)	0.97 (0.92-1.03)	n.s.
喫煙習慣あり	0.62 (0.09-4.46)	n.s.
石鹸使用状況		
使用期間(per 1-month increase)	1.01 (0.97-1.04)	n.s.
使用開始から発症までの期間(per 1-month increase)	1.01 (0.97-1.06)	n.s.
使用中止から初診までの期間 (per 1-month increase)	0.96 (0.91-1.02)	n.s.
使用時の接触蕁麻疹症状あり	0.50 (0.16-1.64)	n.s.
合併症		
AR	0.70 (0.22-2.23)	n.s.
AD	0.04 (0.00-139.88)	n.s.
BA	0.04 (0.00-151.35)	n.s.
何らかの精神疾患	0.05 (0.00-44724.99)	n.s.
初診までの小麦アレルギー発作回数 が5回以上	0.32 (0.09-1.06)	0.061
運動誘発のエピソードあり	0.42 (0.09-1.92)	n.s.
安静時誘発のエピソードあり	<b>0.17 (0.05-0.64)</b>	<b>0.008</b>
小麦アレルギー症状（最も重篤な時）		
眼瞼・鼻症状	2.01 (0.26-15.60)	n.s.
全身性皮膚症状	<b>0.31 (0.10-0.99)</b>	<b>0.047</b>
呼吸器症状	<b>0.21 (0.05-0.81)</b>	<b>0.023</b>
消化器症状	0.31 (0.07-1.42)	n.s.
血圧低下とその関連症状	0.44 (0.12-1.65)	n.s.
Skin prick test 膨疹径		
小麦 (per 1-mm increase)	<b>0.56 (0.33-0.96)</b>	<b>0.033</b>
パン (per 1-mm increase)	<b>0.60 (0.37-0.98)</b>	<b>0.043</b>
グルパール 19S 0.01% (per 1-mm increase)	0.81 (0.61-1.08)	n.s.
血清総IgE値 (IU/mL, 対数変換値(底10))	0.38 (0.11-1.28)	n.s.
特異的IgE抗体価(IU/mL, 対数変換値(底10))		
コムギ	<b>0.10 (0.14-0.65)</b>	<b>0.017</b>
グルテン	<b>0.13 (0.03-0.65)</b>	<b>0.013</b>
グルパール 19S	<b>0.27 (0.08-0.91)</b>	<b>0.034</b>

HR; Hazard ratio

CI; Confidence interval

n.s.; not significant

表4 コックス回帰分析(ステップワイズ 変数増加法)による多変量解析の結果

	Adjusted HR (95% CI)	P value
Log グルテン特異的 IgE 抗体価	0.12 (0.02-0.58)	0.009
安静時誘発のエピソードあり	0.14 (0.03-0.60)	0.008

その他の因子はモデルから除外された。

## 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:

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示した。緊急疫学調査で GP19S 以外の加水分解コムギ末による健康被害が疑われた症例 34 例、コムギタンパク以外の化粧品に含まれる成分による健康被害が疑われた症例 33 例の報告を得た。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った。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。3) GP19S 以外の加水分解コムギ、ならびにその他のタンパク質による経皮感作食物アレルギーについて、その後の詳細な症例情報の現時点における登録数は、GP19S 以外の加水分解コムギ末における健康被害が疑われる症例は 3 例、コムギタンパク以外の化粧品に含まれる成分における健康被害が疑われる症例は 10 例であった。一方、日本化粧品工業連合会より、加水分解豆乳タンパクや加水分解コラーゲン等、17 種類の化粧品原料の提供を受け、リスト化し、希望する施設へ配布できる準備を整えた。

### 協力研究者

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 情報解析課  
生体分子解析室 室長

西嶋 桂子

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 情報解析課  
生体分子解析室 主査

安宅 花子

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 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。加水分解コムギは医薬部外品や化粧品の汎用原料として利用されてきたものの、これまでに大規模なアレルギー発症事例の報告はなかった。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こ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。

この事は、GP19S の抗原を明らかにすることが、医薬部外品・化粧品への使用を避けるべき加水分解コムギの規格設定に繋がることを示唆している。そこで、GP19S の製造工程中のどこで、どの様な変化があり当該副作用事例の抗原となり得たのか、その詳細について分析した。また、GP19S 以外の化粧品原料による経皮感作により誘発された食物アレルギーの存在を明らかにすることを目的に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後の詳細調査を継続して施行した。

## 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 (表 1) 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、5 に対する特異的 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 (表 2)。各製造工程サンプルと血清中 IgE 抗体の反応性を、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、 $\alpha$ -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。

3. GP19S 以外の加水分解コムギ、ならびにその他のタンパク質による経皮感作食物アレルギーの詳細調査

3-1) 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」の症例登録サイトに既に登録されている医療施設 (244 施設) および、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会会員 (1582 施設) を対象施設とし郵送によるアンケート調査を実施した。

3-2) 緊急調査期間は平成 25 年 1 月 31 日 ~ 2 月 15 日とした。グルパール 19S 以外の加水分解コムギ末による、接触蕁麻疹や摂取後の即時型アレルギーなどの健康被害が疑われる症例もしくはコムギタンパク以外の化粧品に含まれる成分による健康被害が疑

われる症例の有無について郵送による調査を行った。3-3)さらに、詳細な症例情報を収集するシステムをウェブサイトで(<https://jsall.sharepoint.com/化粧品アレルギー情報/kinkyuekigaku/SitePages/Home.aspx>)(図1,図2)上に確立し、個々の症例の詳細情報を収集した。3-4)同時に、日本化粧品工業連合会に化粧品中に含まれる成分のうちタンパク質を原料とする試料の提供を依頼した。

## 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) 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(図3)。

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(図4)。

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、陰性の比較を表

で示す。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(表3)。

1-4) GP19S、コムギ、グルテン、 $\gamma$ -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%、 $\gamma$ -グリアジンは6%であった(表4)。

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(図5)。

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(図6)。

### 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(図7)。

#### 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(図8)。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(図9)。

#### 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(表4)にて、高分子量側に新たなピークの誕生が確認された(図10)。

#### 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(図11)。

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(図12)。

### 3. GP19S 以外の加水分解コムギ、ならびにその他のタンパク質による経皮感作食物アレルギーの詳細調査

3-1) グルパール19S以外の加水分解コムギ末による健康被害が疑われた症例34例、コムギタンパク以外の化粧品に含まれる成分による健康被害が疑われた症例33例の報告を得た。

3-2) その後の詳細な症例情報の、現時点における登録数は、グルパール19S以外の加水分解コムギ末における健康被害が疑われる症例は3例、コムギタンパク以外の化粧品に含まれる成分における健康被害が疑われる症例は10例であった(表5)。

3-3) 一方、日本化粧品工業联合会より、加水分解豆乳タンパクや加水分解コラーゲン等、17種類の化粧品原料の提供を受け、リスト化し、希望する施設へ配布できる準備を整えた。

#### 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2102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%溶液にプリックテスト陽性であることを診断基準に明記した。このプリックテストが最も感度が高い。コムギを摂取できいてもプ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プ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・化粧品の汎用原料である。これまでにグルパール19S以外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、スミ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。

3. グルパール19Sの事例ほど症例数は多くないが、グルパール19S以外の成分が含まれた化粧品原料による経皮感作が疑われる食物アレルギーの症例が存在することを明らかにし、さらに、それらの症例の詳細情報を収集し得た。今後、皮膚テストや血清学的検討を実施することにより原因抗原および病態の解明が可能となることが予想される。また、得られた知見を公表することにより、化粧品等に含まれる原料による経皮感作による食物アレルギーの危険性、また、化粧品成分の安全性評価基準および新規有害事象発生時の迅速な症例情報収集システムの確立の必要性を広く啓発し得ると考える。

#### 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。

3. GP19S 以外の加水分解コムギ、ならびにその他のタンパク質による経皮感作食物アレルギーについて、その後の詳細な症例情報の現時点における登録数は、GP19S 以外の加水分解コムギ末における健康被害が疑われる症例は 3 例、コムギタンパク以外の化粧品に含まれる成分における健康被害が疑われる症例は 10 例であった。一方、日本化粧品工業連合会より、加水分解豆乳タンパクや加水分解コラーゲン等、17 種類の化粧品原料の提供を受け、リスト化し、希望する施設へ配布できる準備を整えた。

## F. 健康危険情報

化粧品に含まれた加水分解コムギにより 2102 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。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. M Thokin, N Kaniwa, Y Saito, E Sugiyama, K Kurose, J Nishikawa, R Hasegawa, M Aihara, K Matsunaga, M Abe, H Furuya, Y Takahashi, H Ikeda, M Muramatsu, M Ueta, C Sotozono, S Kinoshita, Z Ikezawa. A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *The Pharmacogenomics journal* 2013(13), 60-69.
2. Masayuki Takahashi, Hirohiko Akamatsu, Akiko Yagami, Seiji Hasegawa, Shiroh Ohgo, Masamichi Abe, Yohei Iwata, Masaru Arima, Hiroshi Mizutani, Satoru Nakata, Kayoko Matsunaga. Epithelial-mesenchymal transition of the eccrine glands is involved in skin fibrosis in morphea. *Journal of Dermatology* 2013; 40: 720-725

3. Morita Y, Suzuki K, Yagami A, Isami M, Sano A, Yokoyama Y, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by N,N-diethyl-p-phenylenediamine used in water quality analysis. *Contact Dermatitis*. 2013 .69(2):118-9.
4. Numata S, Akamatsu H, Akaza N, Yagami A, Nakata S, Matsunaga K. Analysis of Facial Skin-Resident Microbiota in Japanese Acne Patients. *Dermatology* 2014; 228:86-92.
5. Yokoyama Y, Akita H, Hasegawa S, Negishi K, Akamatsu H, Matsunaga K. Histologic Study of Collagen and Stem Cells After Radiofrequency Treatment for Aging Skin. *the American Society of Dermatologic Surgery*. 2014; 1-8.
6. 松永佳世子, 矢上晶子, 中村政志, 佐野晶代, 小林東. (旧)茶のしずくによる石鹸アレルギー. *公衆衛生* 2013. 77 巻, 10 号; 801-806.
7. 矢上晶子, 松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹸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. VOL.20, No.2.
8. 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. *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌*. 2013. Vol.7 No.1:34-43.
9. 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. *Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology*. 2013.7 巻 2 号 P.78-86.

### 2) 学会発表

#### 2-1) 国際学会

1. Kayoko Matsunaga; Occupational contact dermatoses in asia-pacific 12th ASIA-PASIFIC environmental and occupational dermatology symposium(APEODS). 2013.10.21-22 .Yogyakarta Indonesia.

## 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. 杉浦伸一、郷間宏史、浅野美香. クラウドコンピュータを利用した症例集積システムの構築-グルパール 19S によるコムギアレルギー症例の疫学調査 -第 51 回日本医療・病院管理学会. 2013.09.28. 京都
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 中村亮介、中村政志、矢上晶子、酒井信夫、中村里香、安達玲子、斎藤嘉朗、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.
14. 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
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. 矢上晶子、鈴木加余子、中村政志、佐野晶代、岩田洋平、小林東、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.

## 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

化粧品に含まれるたんぱく質(小麦タンパク以外)における健康被害の実態調査

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

**【調査例】**  
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鹸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鹸等を使用して数分後から30分以内に、痒み、眼輪浮腫、鼻汁、膨疹などが出現した。  
2-2) 小麦製品摂取後4時間以内に痒み、膨疹、眼輪浮腫、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あった。  
3. 以下の検査で少なくとも一つ陽性を示す(備考参照)。  
3-1) グルパール19S 0.1%溶液、あるいは、それより濃い溶液でブリックテストが陽性を示す。  
3-2) シットプロット、ELISA、ウエスタンブロットなどの免疫学的的方法により、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。

**【調査できる基準】**  
4. グルパール19S 0.1%溶液でブリックテスト陰性

**【問い合わせ】**  
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、2を満たすが3を満たさない場合でも、血液特異的IgE抗体種検査やブリックテストでコムギまたはグルテンに対する陽性が証明され、かつ、小麦グルテ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扱い。

グルパール19S含有化粧品の使用経緯

即時型小麦アレルギー症状

グルパール19Sへの特異性



図2. 症例登録サイト アンケート2

表1. 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

グルパール19Sの製造工程とID

ID	工程	概要
0	出発原料	生グルテン
1		塩酸投入後すぐ
2		40℃に加熱
3	酸分解	塩酸を追加しつつ50℃に加熱 (pH 0.7)
4		95℃に加熱 (pH 1.06)
5		95℃で40分間保持
6		50℃まで低下したらNaOHを添加 (pH 4.14)
7	等電点沈殿	冷却
8	中和	遠心し、上澄みを除去 NaOH添加 (pH 7)
GP19S	粉末化	フリーズドライ後、微細化

GP19S = グルパール19S



表2. 製造工程とサンプル ID

年齢・性別 確定症例数 2014.2.20

年齢	性別	確定症例数
9歳以下	男性	4
9歳以下	女性	7
10代	男性	23
10代	女性	77
20代	男性	148
20代	女性	166
30代	男性	421
30代	女性	426
40代	男性	617
40代	女性	626
50代	男性	382
50代	女性	387
60代	男性	286
60代	女性	287
70代	男性	100
70代	女性	103
80代	男性	12
80代	女性	12
90代	男性	1
90代	女性	1
合計		2107

男性 4.1%  
女性 95.9%

最少年齢 1歳(男性)  
最高年齢 93歳(女性)

平均 45.8歳

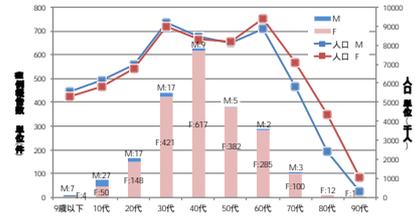


図3. 2014年2月現在の症例登録数・年齢・性別

グルパール19S以外の加水分解コムギ末における健康被害の実態調査



図1. 症例登録サイト アンケート

都道府県別の出荷石鹸個数と報告症例数 2014.2.20

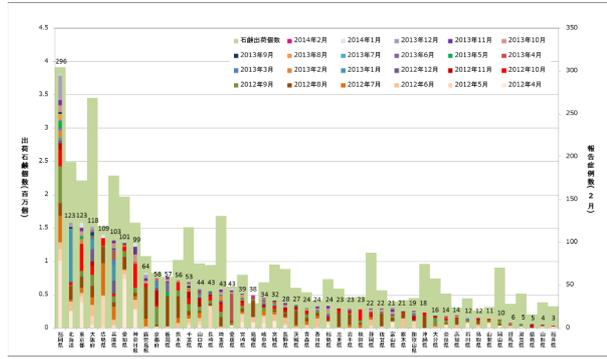


図4. 2014年2月現在の都道府県別石鹸販売個数と症例数

全体 2402検体		ブリックテスト				
		陽性	陰性	判定不能	未実施	計
ELISA	陽性	642	18	14	771	1445
	疑陽性	78	16	0	98	192
	陰性	166	146	12	441	765
	計	886	180	26	1310	2402

表3. グルパール 19S ELISA 法とブリックテストとの比較

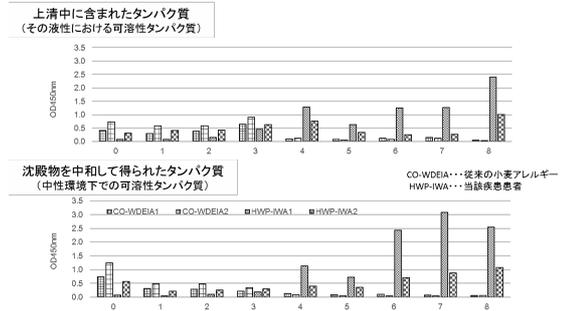


図7. ELISA 法による IgE 抗体の反応性評価

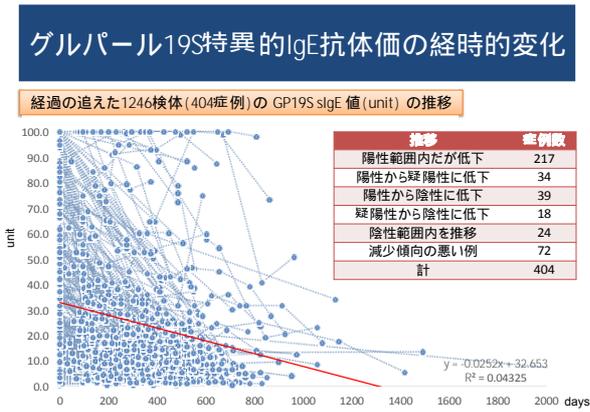


図5. GP19S 特異的 IgE 抗体価の経時的変化

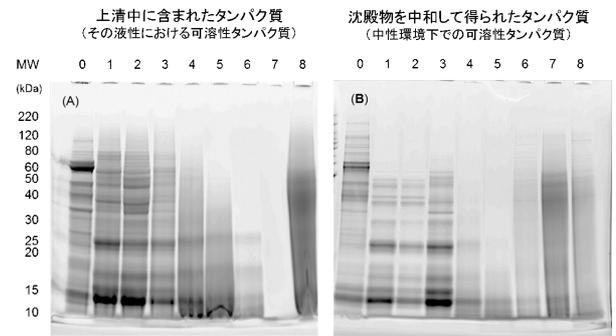


図8. SDS-PAGE の結果

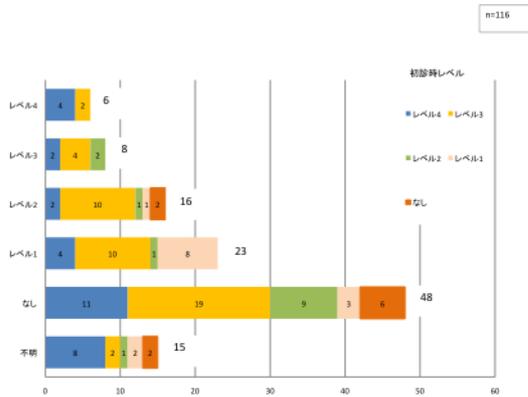


図6. 臨床症状重症度別再診時小麦摂取後臨床症状の変化

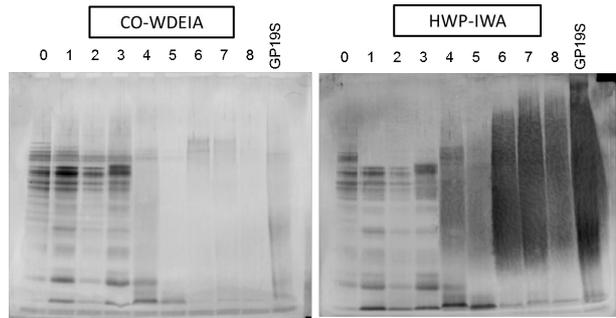


図9. 沈殿物の Western Blotting の結果



## 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：

特定の洗顔石けんの使用者に、小麦摂取による即時型アレルギーを発症する症例が増加し、大きな社会問題となった。本アレルギーは、石鹼に配合されていたグルパール19Sという成分によって引き起こされた事がわかった。グルパール19Sは、医薬部外品原料規格で加水分解コムギ末として収載されており、製品にもその名称で記載される。製造会社によると、現在の医薬部外品原料規格の試験法で規定される品質に関して逸脱はなかったという。他の分担研究者による昨年度までの研究で、加水分解コムギ末の製造法によって強いアレルギー性物質が生成するような物性変化が生じていることがわかった。小麦のような食品成分が経皮、経粘膜的に感作すること自体、想定されなかったことではあるが、現状の規格ではこのような健康障害を防止できなかったことが明らかになった。本研究では、加水分解コムギ末によるこのような健康被害の再発防止のため、これまでの研究班の結果をもとに、医薬部外品原料規格の改訂案を策定することとした。原材料グルテンの加水分解により短時間で一時的に分子量が増加し強い感作性を引き起こすこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し約10000以下になったものでは感作性が認められなかったことから、この分子量をもとにした品質規格とその試験法を追加することとした。サイズ排除クロマトグラフィーを試験法として、分子量約12000のチトクロムCを指標に、これ以下の分子量のものが一定量以上含まれることとした規格と試験法案を追加することを提案した。

### 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

化粧品に保湿などの効果を持たせるための医薬部外品成分としては、小麦、米、コラーゲン、果物エキスといった食品あるいはアロエ、イチヨウなどの植物由来成分が医薬部外品原料規格には収載されている。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であり、日常的に接触するような植物あるいは食品由来の成分が使われていることから、このような成分が原因となって人体に大きな健康被害を及ぼすことはないと考えられてきた。しかし、近年、洗顔石けんの使用者にアナフィラキシーショックのような

重大な健康被害が発生し、大きな問題となった。ある特定の加水分解コムギ末が原因物質とされているが、この成分自体は医薬部外品原料規格に収載されており、製造会社によると、現在の医薬部外品原料規格の試験法で規定される品質に関して逸脱はなかったという。

他の分担研究者による昨年度までの研究で、加水分解コムギ末の製造法によって強いアレルギー性物質が生成するような物性変化が生じていることがわかった。小麦のような食品成分が経皮、経粘膜的に感作すること自体、想定されなかったことではあるが、現状の規格ではこのような健康障害を防止できなかったことが明らかになった。

本研究では、加水分解コムギ末によるこのような健康被害の再発防止のため、これまでの研究班で明らかになった研究結果をもとにして、加水分

解コムギ末に関する医薬部外品原料規格の改訂案を策定した。

## B. 研究方法

昨年度の本研究事業報告書、及び今年度他の分担研究者によるグルテン加水分解物の物性変化と感受性に関する研究報告から、医薬部外品原料としての規格策定に必要な情報を取りまとめた。

医薬部外品原料規格 2006 及び第 16 改正日本薬局法から、タンパク質や分子量規定に関する成分を抽出し、その記載方法を参考にした。試薬試液、器具等については、研究に用いたもの、及び同等の市販製品について情報収集し、一般的かつ必要条件が満たされる収載文案を策定した。

分子量分布を指標として策定した規格案は、研究実施した分担研究者に回覧して、事実確認をとった。

## C. 研究結果

### 1. 現規格の調査

医薬部外品原料規格において、加水分解コムギ末（英名 Hydrolyzed Wheat Powder）は以下のように規定されている。

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。本品は、定量するとき、窒素 (N:14.01) 8.0~18.0% を含む。

**性状** 本品は、白色～淡褐色の粉末で、わずかに特異なおいがある。

**確認試験** (1) 本品の水溶液 (1→20) 1mL に水酸化ナトリウム溶液 (1→100) 5mL を加えて混和し、硫酸銅溶液 (1→20) 1 滴を加えるとき、液は、淡赤紫～赤紫色を呈する。

(2) 本品の水溶液 (1→20) 5mL にニンヒドリン試液 1mL を加えて混和し、水浴上で 3 分間加熱するとき、液は、青～青紫色を呈する。

**純度試験** (1) 重金属 本品 1.0g をとり、第 3 法により操作し、試験を行うとき、その限度は、20ppm 以下である。ただし、比較液には、鉛標

準液 2.0mL をとる。

(2) ヒ素 本品 1.0g をとり、第 3 法により試料溶液を調製し、試験を行うとき、その限度は、2ppm 以下である。

**乾燥減量** 10.0%以下 (1g, 105℃, 4 時間)

**強熱残分** 12.0%以下 (第 3 法, 2g)

**定量法** 本品の約 0.02g を精密に量り、窒素定量法 (第 1 法) により試験を行う。

0.005mol/L 硫酸 1mL = 0.1401mg N

確認試験 (1) はビウレット反応 (Biuret test) で、タンパク質や、ポリペプチドを検出する方法の 1 つである。アミノ酸が 3 つ以上つながった (トリペプチド以上の) ペプチドは、アルカリ性溶液中で銅 (II) イオンに配位し、赤紫色から青紫色に呈色する。確認試験 (2) は、ニンヒドリン水溶液と α-アミノ酸によって起きる呈色反応で、アブデルハルデン (Abderhalden) 反応とも呼ばれる。タンパク質やペプチドなどの検出に利用される。反応はアミノ酸とニンヒドリン 2 分子が縮合してルーヘマン紫 (Ruhemann's purple) という青紫色の色素とアミノ酸が還元されてできるアルデヒドが生成するものである。純度試験は、一般的な不純物として重金属やヒ素を規定しており、タンパク質に関するものはない。成分の定量は窒素含有量からタンパク質量として推定しているが、いずれも現規格では特定の分子量のタンパク質を定性定量するような試験法は収載されていない。

### 2. これまでの研究班の検討結果概要

昨年度研究班は、グルパール 19S の製造方法にならひ、小麦グルテンを 1N 塩酸で 0~48 時間加水分解し、そのうち 0、0.5 および 9 時間処理したグルテン酸加水分解物について、マウスを用いた経皮感受性試験を行った。0.5 時間加水分解したものでは抗原特異的抗体価が上昇し、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応が惹起されたが、9 時間処理したものではそうした反応は起こらなかった。この 0.5 時間酸加水分解物の SDS-PAGE 像は染色バンドがスメア状になり、

加水分解前より高分子量側に移行した。9時間酸分解処理したものは、分子量約 10000 以上の位置に染色バンドがほとんど認められなかった。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) では、短時間の酸加水分解では高分子量のものの分布が多くなるようなクロマトグラムが得られ、グルテンの 0.5 時間酸加水分解物はグルパール 19S と同等の分子量分布パターンを示した。3 時間以上処理すると分布パターンが大きく変化し、低分子量化していることがわかった。また、グルタミンの脱アミド化反応が進んでいることがわかった。

以上のことから、加水分解コムギ末の感作能の上昇要因は、酸加水分解による脱アミド化、部分加水分解によって生成した高分子量タンパク質の混在によるもので、タンパク質の分子量が 10000 以下になると感作性リスクがかなり低下するとしている。

### 3. 改訂規格案の策定

1 の記載内容及び 2 の研究結果より、同様のアナフィラキシー等の再発防止には、原料のタンパク質の分子量を定める規格と試験法の設定により品質管理することが重要である。ここでは 10000 の分子量を、分子量マーカーとしても使用されるチトクロム C (平均分子量約 12000) を基準に区別することにした。また、加水分解コムギ末は一定の分子量をもつものでなく、加水分解によって多様な分子量の混合物であることから、一定の分子量を規定するのではなく、分子量分布の割合を規定することにした。

SDS-PAGE は、分子量マーカーと比較することによって、試料の分子量分布を求める方法である。グルテン加水分解物の SDS-PAGE 像はスミア状で、染色の度合いによってバンドの見え方も変化することから、客観性に分子量の区別をすることが難しい。そこで、SEC を用い、分子量マーカーの保持時間から求めた検量線と比較し、得られたクロマトグラムから分子量分布を求めた。

カラムは高分子量のものから 10000 以下の

分子量のタンパク質を分離する性能が必要である。3 種のカラムを検討した結果、GE 社の Superdex 200 が最も良かった。これを一般化するため、カラム担体として高度架橋アガロース-デキストランゲルを充填するとし、カラム長等を示した。試料はトリス緩衝液に一晩放置して溶解させたが、一部溶解せず沈降したり、懸濁状態となったりした。ろ過では一定以上の大きさ、すなわち分子量を持つものが除去され、正確な分布が求められないことから、放置し上清を採取した。

加水分解コムギ末製造の原材料となるグルテンは、グルタミンを主とするタンパク質である。一般的にタンパク質の検出は 280nm で行うが、加水分解コムギに関してはこの波長での光吸収率が弱い。グルテン加水分解物の各波長の最大吸収率をプロットしたクロマトグラムは、280nm を検出波長としたクロマトグラムとは異なるが、210nm とほぼ一緒であった。280nm では試料中のタンパク質濃度に基づいた分子量分布を認めることは難しいこと、各波長での最大吸収率でクロマトグラムとする方法は一般的ではないことから、検出波長は 210nm とした。

設定した条件ではブロードのピークとなる吸収が 38 分まで続くことから、ピーク面積の測定範囲は 0 ~ 40 分間とした。グルパール 19S と 0.5 時間酸加水分解物では分子量 50 万程度のところに鋭いピークが認められるが、トリス緩衝液の添加に伴って凝集したペプチドであり、そのまま本成分として面積測定に含めることにした。

感作性の認められたグルテンの 0.5 時間酸加水分解処理試料のクロマトグラムにおいて、0 分から 24 分 (チトクロム C の保持時間) までの範囲のピーク面積と 24 分 ~ 40 分の範囲のピーク面積の比は 89 : 11、24 時間処理試料では 19 : 81 であった。感作性の弱かった 9 時間処理試料では 51 : 49 と、チトクロム C の前後のピーク面積は半量であった。ここでは安全側に

立ち、チトクロム C 以下の分子量の画分の割合が全体の 60%以上となるような規格とした。グルテンの加水分解はアルカリで行うこともある。本年度はこのグルテンのアルカリ加水分解物について感作性試験と分子量分布の分析を行っている。酸と同様に 0.5 時間処理した時には感作性が認められたが、12 時間処理したものではありません。チトクロム C 分子量以下の画分は全体の 62%を超えた、と報告を受けている。

以上の事から、基原には質量分子量 10000 という特定の数字を記載した。現規格によると、加水分解コムギ末は、コムギ種子を加水分解して得られる水溶性成分の乾燥粉末とあり、必ずしもタンパク質だけが含まれている必要はない。定量するとき、窒素(N:14.01)8.0~18.0%を含むとあるように、タンパク質含量約 50~100%のものが認められている。先の SEC クロマトグラムで認められたピークもタンパク質だけでなく、高分子のでんぷん等の可能性もあることから、基原では 60%以上が質量分子量 10000 以下である、とタンパク質に制限しなかった。

加水分解コムギ末はグルテンからの製造過程で生成した種々の分子量の混合成分であり、アレルギーを起こす高分子量タンパク質で基原の範囲外ではあるものの、不純物とは言えない。したがって、一定以上の分子量のタンパク質を項目とした純度試験で制限し規定するものではない。確認試験はあくまでも記載原料であることを定性するための試験であり、制限する試験ではない。第 17 改正日本薬局方原案作成要領では、「3.19 その他の試験」として、「消化力、制酸力、抗原性試験、異常毒性否定試験、チモール量、沈降試験、分子量、分子量分布、窒素含量、タンパク質量、比活性、異性体比、生化学的性能、生物学的性能など、品質評価や有効性及び安全性確保に直接関与する試験項目であって、ほかの項目の対象とならないものを規定するものであり、必要な場合に設

定する。」ことになっている。これに従って、本原料についても、純度試験や確認試験の中だけでなく、その他の試験として分子量分布を設定した。ここでは、第 16 改正日本薬局方収載の「パルナパリンナトリウム」を参考にして、規格案を作成した。「パルナパリンナトリウム」は一定の分子量を有する薬剤であることから、試験法としては分子量を測定し、これから分子量分布を求めることとしている。加水分解コムギ末は、先に述べたように加水分解によって生成させた様々な分子量のものであることから、分子量分布だけを測定し、分子量 10000 以下の相対的な割合を求めるよう規定した。

以下、加水分解コムギ末の現状規格からの変更部分を記す。なお、新たに設定する試薬、試液等は省略した。研究班で検討した試験条件や表現とは若干の違いがあること、今後の検討によって本案は修正されていくことを記しておく。

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、60%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 60%以上が分子量 10000 以下である。

本品 1.0g をとり、pH11.4 の加水分解コムギ末用 1mol/L トリス緩衝液 10mL を加えて振り混ぜた後、16 時間静置する。上澄液 1mL をとり、加水分解コムギ末用リン酸緩衝液 9mL を加え、試料溶液とする。別に、チトクロム C 1mg を移動相 1mL に溶かし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 $\mu$ L 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 60%以上である。

## 試験条件

検出器：紫外吸光度計(測定波長：210nm)

カラム：内径 10mm、長さ 30cm のガラス管に 13 $\mu$ m 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 2.424g 及び塩化ナトリウム 11.7g に水を加えて溶かし、塩酸で pH 7.4 に調整した後、1000mL とする。

流量：毎分 0.75mL

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 及びアデニル酸キナーゼそれぞれ 1mg を移動相 1mL 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  $\mu$ L につき、上記の条件で操作するとき、アデニル酸キナーゼ、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 以上であり、チトクロム C のピークの理論段数は 15000 以上である。

システムの再現性：標準溶液 20  $\mu$ L 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。

## D. 考察

規格及び試験法案は、加水分解コムギ末のうち高分子量のタンパク質を含む品質成分のものを排除する目的で策定した。チトクロム C (分子量約 12000) を指標に、SEC でチトクロム C よりも遅く出てくるものについて、質量分子量 10000 以下という数字を規定した。用いたチトクロム C の分子量を規定するのにも一案であるが、この数字の違いを示してもリスクの程度や区別に意味があるものか確認されていないことから、単純に切りのよい数字を示した。

原料の加水分解コムギ末は精製された成分ではない混合物であり、全てがタンパク質ではない

ことから、規格案の中にはタンパク質と制限をする記載をしなかった。アレルギーのリスク低減のためには理論的にはできるだけ分子量を小さくすることが望ましいとされている。しかし、分子量が極度に小さくなったとき、医薬部外品原料としての性能が発揮されるかどうか疑問である。また、動物実験での結果から考えると、必ずしも全てをチトクロム C 以下の分子量にすることはリスク回避としての必要性がないか、不可能である。よって、実験データを根拠に分子量 10000 以下の割合を全体の 60% 以上とした。今後、混在している分子量数万程度のタンパク質の動物試験等が進められるようになれば、区切りとした分子量の数値等は変更される可能性がある。

SEC で観察されている分子量分布は、必ずしも原料そのものの分子量分布を示しているのではないのかもしれない。原料をクロマトグラフィーに適用するため緩衝液で溶解するが、その際副次的に凝集して高分子量になっている懸念もある。あくまでも試験条件での相対的なもので感作の原因となったタンパク質の正確な分子量分布はわからない。SEC でそうした凝集ピークが出現したが、面積比の計算には影響なかった。一方で、この原料の凝集性が感作性強度に関連している可能性もある。分子量が大きなタンパク質、すなわち、分子サイズの大きな物質は皮膚透過しないとされている。しかし、加水分解コムギ末では高分子量の方が感作性を起こしやすかった。分子量だけでなく、タンパク質の化学修飾によって抗原性を発現したことも考えられている。特に、加水分解物ではグルタミン等の脱アミド化が進行しており、これも感作性獲得の原因となったのではないかとの見方もされている。脱アミド化を規定できるような標準的な試験方法は未だ確立したものはなく開発途上である。今後、脱アミド化率と症例との関係についてさらに検討が望まれる。いずれにしろ、医薬部外品原料規格の設定に当たっては、安全性確保に結び付く試験法が設定されることが望ましい。提示案は、今後医薬部外品原料規格策定に関する検討会で審議され、試験法の

実施可能性や市場調査を行った後、規格改訂するかどうか決定される。

## **E. 結論**

加水分解コムギ末による健康被害の再発防止のため、これまでの研究班の結果をもとにして、医薬部外品原料規格の改訂案を策定した。原材料グルテンの加水分解により短時間で一時的に分子量が増加し強い感作性を引き起こすこと、加水分解時間を長くすると分子量が減少し、感作性が認められなかったことから、分子量をもとにした品質規格とその試験法を追加することとした。定量性のあるサイズ排除クロマトグラフィーを試験法とし、分子量約 12000 のチトクロム C を指標に、これ以下の分子量のものが一定量以上含まれるとする規格及び試験法を追加することを提案ができた。

## **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

## H25研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R.	Tissue transglutaminase generates deamidated epitopes on gluten, increasing reactivity with hydrolyzed wheat protein-sensitized IgE.	Journal of Allergy and Clinical Immunology	132	1436-1438	2013
Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Teshima R.	Sen-sitization to Acid-Hydrolyzed Wheat Protein by Transdermal Administration.	Clinical Immunology & Allergology	59	598-602	2013
Muraoka, J., Kamiya, N. and Ito, Y.	Preparation and evaluation of cellulose-dissolving magnetic ionic liquid	Journal of Molecular Liquids	182	76-78	2013
Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y. and Taki, M.	Gp10 based-thioetherification (10NASEd-T) on a displaying library peptide of bacteriophage T7	Molecular BioSystems	9	2988-2991	2013
Inuo.C., Kondo,Y., Itagaki,Y., Kurihara,K., Tsuge,I., Yoshikawa,T., Urisu,A.	Anaphylactic reaction to dietary oats: The first case report.	Annals of Allergy, Asthma and Immunology.	110	305-306	2013
Nakagawara, R., Itagaki, Y., Kohno, M., Matsukura, S., Miyazawa, M., Kumasaka, K., Kojima, T., Ikezawa, Z., Aihara, M.	Analysis of Novel Soybean Allergens That Cause Food-Induced Anaphylaxis.	Food Sci. Technol. Res.	19	617-621	2013
Ebisawa M, Brostedt P, Sjölander S, Sato S, Borres MP, Ito K.	Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children.	J Allergy Clin Immunol.	132(4)	976-978	2013
Simons FE, Arduzzo LR, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, Lockey RF, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY, Worm M.	World allergy organization anaphylaxis guidelines: 2013 update of the evidence base.	Int Arch Allergy Immunol.	162(3)	193-204	2013
M Ebisawa, S Nishima, H Ohnishi, N Kondo.	Pediatric allergy and immunology in Japan.	Pediatric Allergy and Immunology	24(7)	704-14	2013
Ohta K, Jean Bousquet P, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Ni-shima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J.	Visual analog scale as a predictor of GINA-defined asthma control. The SACRA study in Japan.	J Asthma.	50(5)	514-21	2013
Shimizu Y, Kishimura H, Kanno G, Nakamura A, Adachi R, Akiyama H, Watanabe K, Hara A, Ebisawa M, Saeki H.	Molecular and immunological characterization of $\alpha$ -component (Onc k 5), a major IgE-binding protein in chum salmon roe.	Int Immunol.		[Epub ahead of print]	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
G W Canonica, I J Ansotegui, R Pawankar, P Schmid-Grendelmeier, M van Hage, C E Bae-na-Cagnani, G Melioli, C Nunes, G Passalacqua, L Rosenwasser, H Sampson, J Sastre, J Bousquet, T Zuberbier and WAO-ARIA-GA2LEN Task Force: K Allen, R Asero, B Bohle, L Cox, F de Blay, M Ebisawa, et al.	A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics .	World Allergy Organization Journal 2013		[Epub ahead of print]	2013
M Thokin, N Kaniwa, Y Saito, E Sugiyama, K Kurose, J Nishikawa, R Hasegawa, M Aihara, K Matsunaga, M Abe, H Furuya, Y Takahashi, H Ikeda, M Muramatsu, M Ueta, C Sotozono, S Kinoshita, Z Ikezawa.	A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients.	The Pharmacogenomics journal	2013(13)	60-69	2013
Masayuki Takahashi, Hirohiko Akamatsu, Akiko Yagami, Seiji Hasegawa, Shiroh Ohgo, Masamichi Abe, Yohei Iwata, Masaru Arima, Hiroshi Mizutani, Satoru Nakata, Kayoko Matsunaga.	Epithelial-mesenchymal transition of the eccrine glands is involved in skin fibrosis in morphea.	Journal of Dermatology	40	720-725	2013
Morita Y, Suzuki K, Yagami A, Isami M, Sano A, Yokoyama Y, Matsunaga K.	Allergic contact dermatitis caused by N,N-diethyl-p-phenylenediamine used in water quality analysis.	Contact Dermatitis	69(2)	118-119	2013
今井孝成, 海老澤元宏 .	全国経口食物負荷試験実施状況 -平成23年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査から-	アレルギー	62(6)	681-8	2013
手島玲子	食物アレルギーの話	日本小児アレルギー学会誌	27(1)	15-19	2013
海老澤元宏, 伊藤浩明 .	ピーナッツアレルギー診断におけるAra h 2 特異的IgE抗体測定の意義 .	日本小児アレルギー学会誌	27(4)	621-8	2013
今井孝成, 杉崎千鶴子, 海老澤元宏 .	アナフィラキシー症状におけるアドレナリン投与のタイミングに関する意識調査 .	アレルギー	62(11)	1515-21	2013
福富 友馬	(旧) 茶のしずく石鹸による小麦アレルギー問題からの教訓	職業・環境アレルギー誌	20(2)	1-11	2013
松永佳世子, 矢上晶子, 中村政志, 佐野晶代, 小林栄	(旧) 茶のしずくによる石鹸アレルギー	公衆衛生	77巻 10号	801-806	2013
矢上晶子, 松永佳世子.	加水分解コムギ含有石鹸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	20(2)	224-232	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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	日本皮膚アレルギー・接触皮膚 炎学会雑誌	Vol.7 No.1	34-43	2013
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	Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology	7巻 2号	78-86	2013
Teshima R	Food Allergen in Cosmetics	Yakugaku Zasshi	134(1)	33-38	2014
Muraoka, J., Ozawa, T., Enomoto, Y., Kiyose, N. Imamura, A., Arima, K. Nakayama, H. and Ito, Y.	Selection and characterization of human serum albumin-specific porcine scFv antibodies using a phage display library	Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	33	42-48	2014
Tokunaga, Y., Azetsu, Y., Fukunaga, Y., Hatanaka T., Ito, Y. and Taki, M.	Pharmacophore Generation from a Drug- like Core Molecule Surrounded by a Library Peptide via the 10BASEd-T on Bacteriophage T7	Molecules	19	2481- 2496	2014
Imamura, A., Hatanaka, T., Ichizu, K., Kikuta, Y., Himeno, A. and Ito, Y.	Identification of Chicken IgY-Specific Binding Peptide from Random Peptide Library and its application for IgY Affinity Purification	Peptide Science 2013		in press	2014
Imakiire, A., Nakashimada, Y., Hatanaka, T. and Ito, Y.	Characterizations and Applications of Small Affinity Peptides Isolated from Disulfide-containing Random Peptide Library	Peptide Science 2013		in press	2014
Fukunaga, K., Hatanaka, T., Ito, Y., Minami, M., and Taki M.,	Construction of a crown ether-like supramolecular library by conjugation of genetically-encoded peptide linkers displayed on bacteriophage T7	Chemical Communications		accep ted	2014
Numata S, Akamatsu H, Akaza N, Yagami A, Nakata S, Matsunaga K.	Analysis of Facial Skin-Resident Microbiota in Japanese Acne Patients.	Dermatology	228	86-92	2014
Yokoyama Y, Akita H, Hasegawa S, Negishi K, Akamatsu H, Matsunaga K.	Histologic Study of Collagen and Stem Cells After Radiofrequency Treatment for Aging Skin.	the American So-ciety of Dermatologic Surgery		[Epub ahead of print]	2014