

食物アレルギー実験モデルにおける予防・寛解誘導に関する研究

分担研究者 大嶋 勇成 福井大学医学部病態制御医学講座小児科助手
研究協力者 眞弓 光文 福井大学医学部病態制御医学講座小児科教授

研究要旨

食物アレルギー患者において低アレルゲン化食品を用いての経口トレランス誘導の可能性を検討するため、トランスジェニックマウスを用いて抗原特異的 IgE 存在下での経口トレランス成立機序を解析した。その結果、抗原特異的 IgE の存在により低濃度の抗原によっても抗原特異的細胞増殖応答が生じやすいが、抗原の経口投与により抗原特異的 IgE 存在下でも T 細胞レベルでの経口トレランスを誘導することが出来ることが明らかとなった。また、そのトレランスの成立機序にはクローン除去に加え、TGF- β 産生細胞の誘導が関与していると考えられた。食物抗原特異的 IgE 抗体が陽性の食物アレルギー患者においても、大量の抗原の経口投与が可能であればトレランスを誘導しうると考えられた。

A.研究目的

乳幼児の食物アレルギー患者の多くの者は成長とともに原因食物を摂取しても症状が出なくなることが知られている。このアウトグロウの機序として消化能力の発達に加え、経口トレランスが関与していることが示唆されている。食物アレルギーの治療としては原因食物の除去が基本となるが、これに代わる治療手段として、食物アレルギー患者でも安全に摂取できるように食品を低アレルゲン化し、低アレルゲン化した食品を摂取することで積極的に経口トレランスを誘導する方法が期待される。しかしながら、従来の経口トレランスの実験モデルでは、大量の抗原を経口投与してあらかじめトレランスを誘導した後で抗原感作を行い、抗原特異的反応が誘導されないことを指標として解析している。そのため、実際の食物アレルギー患者の様に既に抗原特異的 T 細胞と抗原特異的 IgE が存在している状況下で抗原の経口投与によりトレランスが誘導することが可能か否かは明らかでない。また、経口トレランスが誘導されるとしても、これまでの実験モデルで報告されているものと同じ機序が関与しているかどうかは明らかでない。そこで、本研究では抗原特異的 IgE が既に生体に存在する状況で経口的に抗原投与を行った場合における抗原特異的 T 細胞の反応を解析することで、食物アレルギー患者のアウトグロウにおいて生じると推定される経口トレランスの機序を明らかにすることを目的とする。

B.研究方法

食物アレルギー患者で認められる様に長期にわたり抗原特異的 IgE 産生が持続する状態下での、抗原特異的 T 細胞の挙動を追跡し経口トレランスの誘導効果を解析するため、OVA 特異的 IgE 産生トランスジェニックマウス（東京医科歯科大学 烏山一先生より供与）と OVA 特異的 TCR のトランスジェニックマウス（京都大学発達小児科学講座 片村憲司先生より供与）を用い、抗原特異的 T 細胞の性状が OVA 抗原の経口投与によりどのように変化するかを検討した。2種類のトランスジェニックマウスを交配させて得られる OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 TCR のダブルトランスジェニックマウス（TCR/IgE-Tg）と OVA 特異的 IgE に関しては野生型で OVA 特異的 TCR がトランスジェニックであるマウス（TCR-Tg）に、Marth T ら（Eur J Immunol 2000）の方法に準じ 250mg の OVA またはコントロールとして PBS を 7回経口投与し、最終投与の 48 時間後に脾臓細胞と腸間膜リンパ節から単核細胞を分離した。分離した細胞中のクロノタイプ陽性細胞を測定しクローン除去が生じているかを検討すると共に、*in vitro* で OVA による再刺激を行い、細胞増殖とサイトカインを測定した。また、*in vitro* での再刺激時に抗 IL-10 抗体、抗 TGF- β 抗体を加え、経口トレランスの誘導に内因性の IL-10、TGF- β が関与しているかを検討した。

実験動物の取り扱い、実験方法に関しては、福井大学医学部動物実験委員会での審査を受け許可を受けた後実施している。

C. 研究結果

OVA の経口投与なしでは、TCR/IgE-Tg 群の脾細胞と TCR-Tg 群の脾細胞に占める OVA 特異的 TCR 発現 T 細胞の割合に差を認めなかった。しかし、*in vitro* での OVA 刺激による細胞増殖は、低濃度の OVA で刺激した場合、TCR/IgE-Tg 群が TCR-Tg 群より亢進していた。

OVA の経口投与により、TCR/IgE-Tg 群、TCR-Tg 群の両群とも脾細胞の OVA 特異的 T 細胞の割合の減少が認められた。また、脾細胞の OVA 再刺激による細胞増殖や、IL-4、IFN- γ 産生は OVA の経口投与により低下していたが、TGF- β 産生は逆に両群で増強していた。一方、IL-10 産生に関しては、コントロールの PBS 投与では TCR/IgE-Tg 群が TCR-Tg 群より高値を示し、OVA の経口投与により TCR/IgE-Tg 群では IL-10 産生が低下したのに対し、TCR-Tg 群では逆に増強していた。

Marth T ら (Eur J Immunol 2000) の報告では経口トレランスの機序に IL-10、TGF- β の関与が指摘されていることから、IL-10、TGF- β の中和抗体の影響を検討した。その結果、*in vitro* での OVA 再刺激時に抗 IL-10 中和抗体を加えると、PBS 投与の TCR/IgE-Tg 群の細胞増殖は増強したが、PBS 投与の IgE-Tg 群および OVA 経口投与後の TCR/IgE-Tg 群と IgE-Tg 群の両群では細胞増殖に変化を認めなかった。一方、抗 TGF- β 中和抗体の存在下での OVA 再刺激では OVA 経口投与をした両群で細胞増殖の増強を認めた。

D. 考察

抗原特異的 IgE は抗原提示細胞に発現される Fc ϵ R に結合し、抗原提示細胞の抗原取り込みを増強することが報告されている。OVA の経口投与が行われない場合、低濃度の OVA で刺激した場合に TCR/IgE-Tg 群が TCR-Tg 群より細胞増殖が亢進し、高濃度の OVA で刺激した場合に細胞増殖の差が認められなかったのは、脾細胞中の抗原提示細胞が IgE/Fc ϵ R を介して低能度の OVA を取り込み T 細胞に提示することが可能であったためと考えられる。この結果は、食物抗原特異的 IgE 陽性患者では少量の食物抗原によっても T 細胞活性化が生じることを示唆する。

抗原特異的 IgE の存在下においても抗原の経口大量投与により脾細胞のトレランスが誘導されると考えられる。また、この際の経口トレランスの成立には一部クローン除去が関与すると共に、TGF- β 産生細胞の誘導が関与していると考えられた。

今回の実験系には IL-10 は TCR/IgE-Tg 群の細胞増殖において内因性の細胞増殖抑制因子として作用していることが示唆された。抗原特異的 IgE の存在により抗原提示細胞からの IL-10 産生が亢進したのか、抗原特異的 T 細胞からの IL-10 産生が亢進したのかは同定することは出来なかったが、IL-10 の産生は経口トレランスの成立には重要とは考えられなかった。

E. 結論

食物抗原特異的 IgE 抗体が陽性の食物アレルギー患者においては、少量の抗原摂取によっても T 細胞反応が生じ易いと考えられるが、抗原の経口大量投与が可能であれば経口トレランスを誘導することが出来ると考えられた。また、経口トレランスの誘導にはクローン除去と TGF- β 産生細胞の誘導が重要と考えられた。

OVA 特異的 TCR/IgE-Tg マウスは低アレルギー食を用いての経口トレランス誘導による食物アレルギー治療法の解析に有用と考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishima S, Mayumi M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 72: 2509-2516 (2003)
- 2) Higa S, Hirano T, Mayumi M, Hiraoka M, Ohshima Y, Nambu M, Yamaguchi E, Hizawa N, Kondo N, Matsui E, Katada Y, Miyatake A, Kawase I, Tanaka T. Association between interleukin-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. *Clin Exp Allergy* 33:1097-1102 (2003)

- 3) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi M, Mayumi M. The role of dendritic cells in Th1/ Th2 balance: A novel therapeutic target of allergic diseases. *Allergology Int* (in press)
 - 4) 大嶋勇成, 眞弓光文 遺伝子多型とアレルギー 日本小児科学会誌 107:733-739 (2003)
 - 5) 大嶋勇成 皮膚症状とアレルギー性疾患の経過 日本小児アレルギー学会誌 17:32-37 (2003)
 - 6) 大嶋勇成 アレルギー性疾患の病態形成における樹状細胞の役割 現代医療 35: 1848-1852 (2003)
 - 7) 大嶋勇成, 眞弓光文 アレルギー性の気道炎症と細胞:樹状細胞 アレルギー・免疫 10: 982-987 (2003)
 - 8) 大嶋勇成 抗喘息薬の基礎と臨床 (小児): 吸入ステロイド アレルギーの臨床 23:518-523 (2003)
 - 9) 大嶋勇成, 眞弓光文 アレルギー疾患の免疫学: リンパ球の役割 小児内科 35:567-571 (2003)
 - 10) 大嶋勇成, 眞弓光文 アレルギー疾患の診断法と問題点 喘息 65:45-49 (2004)
 - 11) 大嶋勇成, 小俣合歓子, 安富素子 MCP-1 による DC2 の誘導 臨床免疫 41:(in press)(2004)
- 4) 大嶋勇成 シンポジウム: 喘息治療の新しい方向—小児期から成人期へ—新たな治療法の展望 第39回日本小児アレルギー学会 2003/ 10/ 3-4 岐阜
 - 5) 大嶋勇成 イブニングシンポジウム: アレルギー治療における Th2 細胞の制御: Th1/ Th2 バランスにおける樹状細胞の役割 第53回日本アレルギー学会 2003.10.23-25 岐阜
 - 6) 大嶋勇成, 小俣合歓子, 安富素子, 眞弓光文 樹状細胞に対するケモカインの作用: 喘息の治療標的の可能性 第2回アレルギー細胞ネットワーク研究会 2003.7.19 東京
 - 7) 大嶋勇成 シンポジウム: 小児気管支喘息治療—エビデンスと私の考え—: Hygiene 仮説と Th1/ Th2 パラダイム 第9回小児気道アレルギー研究会 2003.11.16 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

2. 学会発表

- 1) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi M, Mayumi M MCP-1 selectively inhibits the acquisition of CD40L-dependent IL-12 producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. 2003 Keystone symposia : Dendritic cells: Interfaces with immunobiology and medicine. 2003 March 3-8, 2003 Keystone, CO
- 2) Omata N, Yasutomi M, Ohshima Y, Mayumi M. MCP-1 selectively inhibits the acquisition of CD40L-dependent IL-12 producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. 2003 American Association of Immunologist meeting. 2003 May 6-10, 2003 Denver CO
- 3) Ohshima Y. Roles of dendritic cells in

食物等によるアナフィラキシーの原因物質・予後に関する研究

分担研究者 柴田 瑠美子 国立療養所南福岡病院小児科医長
研究協力者 高畑 能久 日本ハム中央研究所
森松 文毅 日本ハム中央研究所
田辺 創一 広島大学大学院生物圏科学研究科助教授

研究要旨

多種食物アレルギーの中で牛肉アレルギーは、他の肉より過敏症を呈する場合が多い。牛肉アレルギーおよび牛肉アレルギー陽性幼児 18 例について、臨床的な牛肉による誘発症状の有無と牛肉エキスの加熱・非加熱による反応性の変化をブリックテストで検討した。加熱後ブリック反応性は全体的に減弱したが、陰性化しない例では誘発陽性が続いた。血清を用いた牛肉蛋白の IgE 反応性 (イムノプロット) では、牛肉 BSA バンドの強度増加と 28 kDa、15 kDa の蛋白バンドがみられた。BSA アミノ酸合成ペプチドとの結合試験、阻害試験から、338-341 ペプチド EYAV が主な B 細胞エピトープと考えられた。

A. 研究目的

アナフィラキシー誘発食品によっては、食品加熱処理などによるアレルギー性の変化、減弱のみられるものがあり、食物アレルギー児の耐性化過程では、これらの食品から摂取できる場合がある。一方、このような加熱食品でも誘発を繰り返す症例があり、アナフィラキシーの耐性化に影響するアレルギーエピトープがあると思われる。本研究では食物アレルギーの耐性化に関与する食品のアレルギー性を明らかにするために、加熱、加工食品による食物アレルギーの誘発・非誘発例の IgE 結合性の差異、臨床背景との関連を検討を目的としている。本年度は、食肉の中でもアレルギー誘発率が高い牛肉アレルギー児における、アレルギー性の加熱による影響、血清 IgE 抗体反応性とアレルギー解析を行った。

B. 研究方法

牛肉アレルギーおよび牛肉アレルギー陽性幼児 18 例。臨床的な牛肉による誘発症状の有無と牛肉エキスの加熱・非加熱による反応性の変化をブリックテストで検討した。非加熱コマーシャルアレルギーエキス (トリイ) と牛肉の 120 度 C、30 分処理 (加熱処理)、加圧処理牛肉エキスを抽出し、滅菌処理後グリセリン液にて調整した。ブリックテストは、ヤヨイのランセットを用い、15 分後膨疹径を測定した。イムノプロットは、患者血清を用い、牛肉蛋白を SDS 展開後の IgE 反応性を検討した。BSA 反応の強い

12 症例については、BSA 合成ペプチドを用い、患者血清との IgE 反応性を ELISA および阻害 ELISA 試験で測定し、エピトープ解析を行った。

C. 研究結果

牛肉アレルギー児の IgE 値は 574~14258 U/ml で多種食物アレルギー、高 IgE 血症を示し、牛肉 RAST 値は CAP3~6 (平均 4) に増加していた。牛肉による誘発症状は、顔面発赤、蕁麻疹、掻痒で喘息誘発はみられなかった。2 回以上の症状既往、負荷試験と検査結果より牛肉アレルギーと診断した。全例、卵、牛乳のアレルギーがあり、他の食品にも同時にアレルギーを有するものが多かった。牛肉のブリックテストはトリイエキスで全例強陽性を示し、加圧エキスでも同様の強陽性であった。加熱エキスでは、全体に非加熱エキスより膨疹径が減弱していたが、陰性化した例は 3 例であり、牛肉による誘発症状のある例ではブリック反応の陰性化がみられず、BSA 以外に熱耐性のアレルギーがあると考えられた (図 1)。

イムノプロットによる牛肉蛋白に対する反応ではアレルギー児の有症状例で牛肉 BSA バンドの強度の増加がみられ、BSA バンド以外に 28 kDa、15 kDa の蛋白バンドがみられた (図 2)。IgE イムノプロットでの血清 BSA 反応の強い血清を用いた、BSA アミノ酸合成ペプチドとの結合試験から、338-341 ペプチド EYAV がほとんどの症例で IgE 結合性を有しており、B 細胞エピトープと考えられた。(B 細胞エピトープ

については Biochem Biophys Res Commun 293; 1348-1353, 2002 に Tanabe と報告している)。

D. 考案

牛肉アレルギーでは、おもに BSA がアレルゲンとなっているが、熱によって減弱しにくい他の低分子の蛋白が関与しており、BSA 自体も低抗原化が家庭で処理してきる熱では不十分であることも報告されている。また Sampson らは牛肉による即時重症例では、BSA より低分子のバンドが顕著であったことを報告しており、この分子量の蛋白解析も今後検討する必要がある。またアレルギー誘発と耐性化にこれらのアレルゲン蛋白がどのように関与しているかは、牛肉アレルギー児が、その後年齢とともに耐性化しやすいため、イムプロットの反応性の変化を追跡検討予定である。

小麦アナフィラキシーについては、アレルゲンの解析が十分でなく、最近の乳幼児の難治例も増加している。来年度はアナフィラキシー例での耐性化過程で低アレルゲン食品負荷陰性例と陽性例について、低アレルゲン化過程で残存するアレルゲンとこれらの症例の血清 IgE 抗体反応性の差異を検討し、低アレルゲン小麦の二次元電気泳動、患者血清を用いた Western blot による IgE 結合蛋白の反応性の差異についてアレルゲン解析を行う予定である。食品中のアナフィラキシー誘起アレルゲン蛋白の解析、耐性に関わるアレルゲン蛋白が明らかになれば、安全な低アレルゲン食品開発につながると考えられ、小麦の族種の違いによるアレルゲン性の検討も重要と思われる。

E. 結語

牛肉による誘発症状のある例では、牛肉エキス加熱によるブリック反応の陰性化がみられず、熱耐性のアレルゲンがあり、耐性化しにくい臨床背景に関連していると考えられた。アレルギー児の有症状例では牛肉 BSA 以外に 28 kDa、15 kDa の蛋白バンドがみられた。BSA のアレルゲン性については、アミノ酸合成ペプチドとの IgE 結合試験から、B 細胞エピトープと思われるペプチドが明らかになった。

F. 健康危険情報 介入群になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 柴田瑠美子：食物アレルギーの免疫病理 小児内科 35 : 729-733, 2003.
- 2) 柴田瑠美子：コントロールしにくい極めて頻度の多い食物アレルギー 小麦アレルギー アレルギー・免疫 10 : 33-37, 2003.
- 3) 柴田瑠美子：食物アレルゲン 総合臨床 52 : 500-506, 2003.
- 4) Hamada Y, Nagashima Y, shiomi K, Shimojyo N, Kohno Y, Shibata R, Nishima S, Ohsuna H, Ikezawa Z: Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. Allergol International 52:139-147, 2003.
- 5) Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishima S, Mayumi M.: Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. Life Sci. 72: 509-16, 2003.
- 6) 柴田瑠美子 アレルギーの考え方と栄養指導 助産雑誌 58 : 118-124, 2004.
- 7) Tanabe S, Kobayashi Y, Takahata Y, Morimatsu F, shibata R, Nishimura T.: Some human B and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef antigen. Biochem Biophys Res Commun 293; 1348-1353, 2002.
- 8) 柴田瑠美子：畜産食品（牛肉、鶏肉、豚肉、チーズ、ヨーグルト）. 中村晋、飯倉洋治編 食物アレルギー、永井書店、p258-264、2002.

2. 学会発表

- 1) 柴田瑠美子 久保田典里子 西間三馨；除去食療法の適用と解除のための低アレルゲン食品による負荷試験 第40回日本小児アレルギー学会 2003.
- 2) Shibata R, Nishima S et al; Severe anaphylaxis after ingestion of millet noodle contaminated wheat: evaluation of hidden antigens by ELISA. World Allergy Organization Congress- XVIII ICACI 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

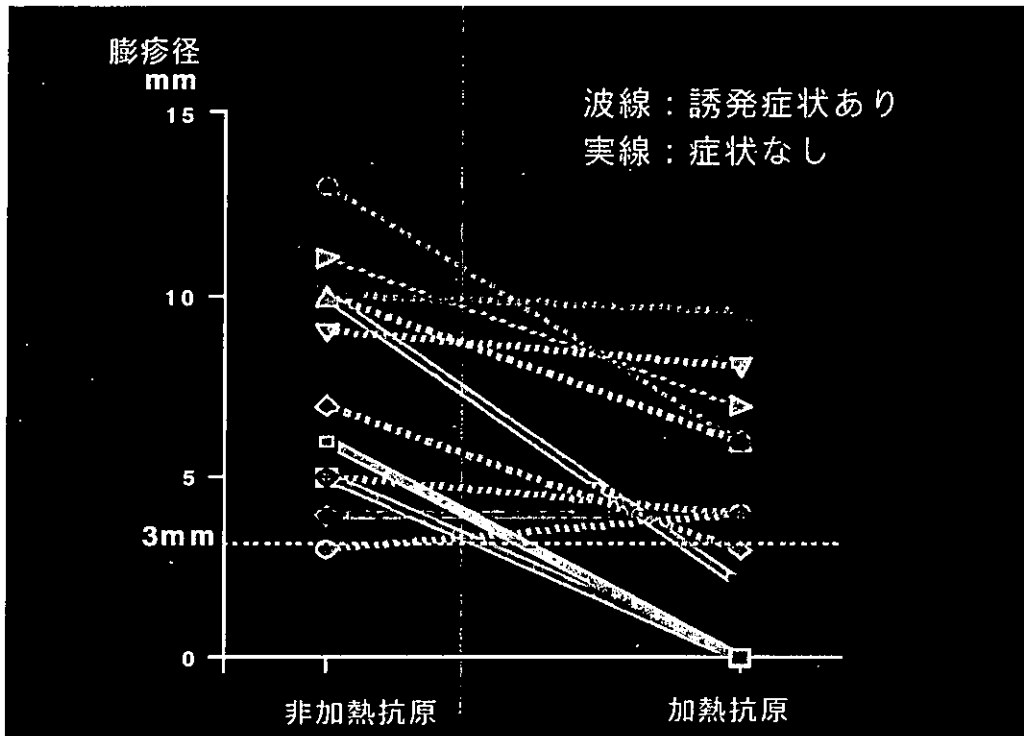


図1 牛肉アレルギー・感作児の牛肉非加熱、加熱抗原液によるプリックテスト膨疹径の変化

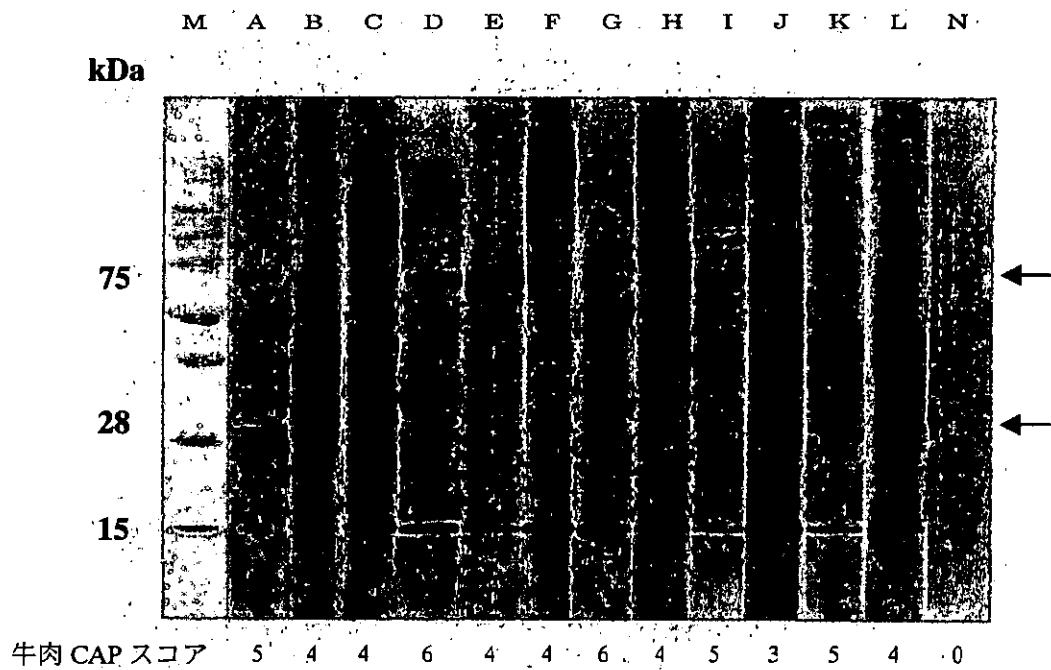


図2 Serum IgE-reactivity of 12 patients with beef extract

食物アレルギーの抗原解析及びその低減化に関する研究

分担研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部
研究協力者	高畑 能久	日本ハム株式会社中央研究所
	森松 文毅	日本ハム株式会社中央研究所
	田辺 創一	広島大学生物生産学部
	塩見 一雄	東京海洋大学海洋科学部食品科学科
	佐伯 宏樹	北海道大学大学院水産科学研究科
	小川 正	京都大学食糧科学研究所
	長岡 恵	国立医薬品食品衛生研究所食品部
	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部

研究要旨

食肉：鶏肉の主要アレルギーとして chicken serum albumin (N 末端 16 アミノ酸が欠失したものを含む) を見出し、その他数種のアレルギーを確認した。**魚類**：マサバリコンピナントパルプアルブミン(PA) は天然 PA と同等のアレルギー性を有すること、魚類血合筋のアレルギー性は普通筋より弱いこと、甲殻類および軟体動物の主要アレルギーはトロポミオシン(TM)であることを明らかにした。**貝類**：ホタテガイ TM を還元性単糖と混合してメイラード反応を進行させた結果、反応の進行に伴って、ホタテガイアレルギー患者血清中の特異 IgE に対する反応性が高まった。**果物**：スイカ、メロン、リンゴなどの抽出タンパク質に反応する抗体を保有する患者が認められ、特に 10kDa-30kDa の低分子量タンパク質が主要な成分として観察された。

A.研究目的

重篤なアナフィラキシー症状を呈した食品中のアレルギー誘発物質を特定するとともに、それらの誘発物質の低減化することを目的とする。

B.研究方法

- 1)食肉：食肉アレルギー患者血清を用い、Western blotting を行った。陽性バンドを切り取り、N 末端アミノ酸シーケンサーに供した。
- 2)魚類：マサバリコンピナントパルプアルブミン (PA) と 6 種魚類から精製した PA との抗原交差性を魚類アレルギー患者血清を用いた阻害 ELISA で調べた。マサバの血合筋、マアジの普通筋・血合筋の PA をコードする cDNA を、魚類 PA で保存性の高い領域をプライマーに用いた RACE 法でクローニングした。
- 3)貝類：ホタテガイのトロポミオシン(TM)を還元性単糖類(グルコース、リボース)と混合後、凍結乾燥した。これを 60℃、相対湿度 35%にて、TM と還元糖類の間でメイラード反応を進行させた。TM のアレルギー性に及ぼすメイラード反応の影響を、ホタテガイアレルギー患者の血清を用いた Western Blotting と競争 ELISA によって判断した。

- 4)果物： 2S Albumin subunits 領域 (M.W. 6,000-14,000) の成分を認識する患者を抽出した。さらに SDS-PAGE/Immunoblot 法で 2S Albumin (nAL3, rAL1, rAL3) に対して結合する IgE 抗体を保有する患者血清を選抜した。スイカ、メロン、リンゴ、モモ、バナナ、パイナップル、キウイを検索試料として選び、抽出したタンパク質について SDS-PAGE を行った後、患者血清にて Immunoblot を行い、IgE 抗体により認識される成分をアレルギーの候補として検索した。

本研究に供した患者血清は、本研究の目的と内容を提供者が理解した上で提供された。また文書によるインフォームドコンセントが得られている。研究遂行にあたっては個人情報の漏洩防止に配慮しており、したがって、倫理面の問題は無いもの考えられる。

C.研究結果

- 1)食肉：Western blotting の結果、最も強く反応を示したのは CSA (chicken serum albumin) であり、その他 GAPDH, FBPA をはじめとする数本のバンドが確認された。新規アレルギーの可能性のある 2 本のバンド (①お

よび②)についてN末端アミノ酸配列を解析し、①のN末端はDAEHKSEIAHRYNDL...であり、CSAアミノ酸配列の17-31であることを確認した。

2)魚類：マサバ rPA と各種魚類 PA との抗原交差性は阻害 ELISA で確認され、阻害効果はマサバ天然 PA と同等であった。cDNA クローニングの結果、マサバおよびマアジの血合筋に含まれる PA は普通筋の PA と同一で、血合筋の PA 含量は普通筋に比し著しく低かった。調べた甲殻類および軟体動物の加熱抽出液に共通して 35-40kDa にプロットがみられ、患者血清をイセエビおよびスルメイカの精製 TM とあらかじめ反応させるとプロットは消失または弱くなった。

3)貝類：患者血清中の特異 IgE に対する TM の反応性はグルコース、リボースのいずれの糖と反応させた場合でも高いことが Western Blotting の結果から示された。さらに、TM 中のリジン残基の 30%がこれら糖類とメイラード反応すると、競争 ELISA における 50%阻害濃度はいずれの糖の場合も有意に低下した。一方、メイラード反応させたいずれの TM も、健常者血清には反応を示さなかった。

4)果物：2S Albumin (rAL1, rAL3) は高分子量 (約 14,000) の α -subunit (2SAL1,3- α) と低分子量 (約 6,000) の β -subunit (2SAL1,3- β) に分離される。ほとんどの患者血清は高分子量 α -subunit のみを認識した。それぞれの果物において複数のタンパク質が IgE 抗体により認識された。スイカ及びメロンにおいて、38kDa, 25kDa および 18kDa 付近の3種、メロンでは 38kDa, 28kDa および 20kDa の強く反応するタンパク質の存在が観察された。キウイでは 25kDa、バナナでは 35kDa、オレンジでは 23kDa, 35kDa、パイナップルでは 26kDa 付近に IgE 抗体と反応する成分が観察された。

D.考察

1)食肉：本研究によって CSA は鶏肉の主要アレルゲンであること、「Chicken (meat) - egg yolk - bird feather」の交叉が明らかとなった。今後バンド②についても詳細に解析する予定である。

2)魚類：マサバ rPA は天然 PA と同等の IgE 反応性を示すと考えられた。血合筋と普通筋の PA

は同一であること、血合筋の PA 含量は普通筋より低いことから、血合筋のアレルゲン性は普通筋より弱いと判断された。調べた甲殻類および軟体動物の主要アレルゲンは TM と推定された。

3)貝類：競争 ELISA で 50%阻害濃度が低下したことから、患者血清中の IgE がアレルゲンである TM により多く結合することが示された。すなわちメイラード反応の進行によりホタテガイ TM のアレルゲン性が増大する可能性が示唆された。

4)果物：rAL1- α と rAL3- α は一次構造上約 80% の相同性があるため、その差の利用は B-cell Epitope の解析を行う上で有力な手がかりとなる。キウイ(アクチニジンの位置)、パイナップル(プロメラインの位置)以外の果物の IgE 認識タンパク質は、SDS-PAGE ゲル上の CBB タンパク質染色で検出限界付近のマイナーなタンパク質成分であった。

E.結論

1)食肉：鶏肉主要アレルゲンとして CSA (CSA の N 末端 16 アミノ酸が欠失したものを含む) を見出した。その他にも GAPDH, FBPA をはじめとする数本のアレルゲンを確認した。

2)魚類：マサバ rPA は魚類アレルギーの診断・治療に応用可能である。魚類アレルギーの研究では、少なくとも PA に関しては普通筋のみを対象として進めて問題ない。甲殻類および軟体動物の主要アレルゲンは、欧米の患者だけでなく日本の患者においてもトロポミオシンである。

3)貝類：ホタテガイ筋肉の主要アレルゲンである TM は、還元糖類とメイラード反応を起こすと、そのアレルゲン性が増大する可能性が見いだされた。

4)果物：スイカ、メロン、キウイ、バナナ、オレンジ、パイナップルから 18kDa からでは 38kDa 付近に IgE 抗体と反応する複数の成分が観察された。

F.健康危険情報 特になし

G.研究発表

1.論文発表

1) Y. Hamada, H. Tanaka, S. Ishizaki, M.

- Ishida, Y. Nagashima and K. Shiomi: Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1149-1156 (2003)
- 2) Y. Hamada, Y. Nagashima, K. Shiomi, N. Shimojo, Y. Kohno, R. Shibata, S. Nishima, H. Ohsuna and Z. Ikezawa: Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. *Allergol. Int.*, 52, 139-147 (2003).
 - 3) 濱田友貴, 塩見一雄: 魚類アレルギー患者血清のカエルパルブアルブミンに対する反応性. *食物アレルギー研究会会誌*, 3, 83-86 (2003).
 - 4) K. Shimakura, Y. Tonomura, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion. *Food Chem.* (in press).
 - 5) K. Shimakura, H. Miura, K. Ikeda, S. Ishizaki, Y. Nagashima, T. Shirai, S. Kasuya and K. Shiomi: Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (in press).
 - 6) T. Weangsripanaval, N Nomura, T. Moriyama, N. Ohta, T. Ogawa: Identification of suberization - associated anionic peroxidase as a possible allergenic protein from tomato, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67,1299-1304 (2003).
- 2.学会発表
- 1) 田辺創一, 柴田瑠美子, 高畑能久, 森松文毅, 西村敏英: BSAのエピトープEXXVを含むアナログペプチド, 日本農芸化学会 2003年度大会 (横浜, 2003年3月).
 - 2) 高畑能久, 宮澤いづみ, 森松文毅, 田辺創一, 西村敏英, 柴田瑠美子: 豚肉アレルギーの解析, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 (横浜, 2003年5月).
 - 3) 柴田瑠美子, 田辺創一, 高畑能久, 森松文毅, 西村敏英, 西間三馨: 牛肉アレルギー児における臨床所見と牛肉主要アレルギーおよびB細胞エピトープ, 第53回日本アレルギー学会総会 (岐阜, 2003年10月).
 - 4) 佐藤綾子, 濱田友貴, 田中洋行, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: 各種魚類パルブアルブミンのアレルゲン性および抗原交差性, 平成15年度日本水産学会 (東京, 2003年4月).
 - 5) 濱田友貴, 田中洋行, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: 数種魚類パルブアルブミンのcDNAクローニング, 日本水産学会 (東京, 2003年4月).
 - 6) 池田 薫, 嶋倉邦嘉, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: アニサキス主要アレルゲン Anis 1 のクローニングおよび発現, 日本水産学会 (東京, 2003年4月).
 - 7) 小林征洋, 池田 薫, 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄: アニサキス新規アレルゲンの精製と性状, 日本水産学会 (東京, 2003年4月).
 - 8) 濱田友貴, 田中洋行, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: マサバリコンビナントパルブアルブミンと天然パルブアルブミンのアレルゲン性, 第53回アレルギー学会総会 (岐阜, 2003年10月).
 - 9) 中村 厚, 尾島孝男, 佐伯宏樹: ホタテガイ・トロポミオシンのアレルゲン性およびすメイラード反応の影響, 日本水産学会 (東京, 2003年4月).
 - 10) T. Weangsripanaval, T. Moriyama, T. Ogawa: Occurrence of IgE antibodies recognizing glycan moiety of tomato 45 kDa allergen in patient's sera, 第42回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (大阪, 2003年10月).
 - 11) 穂山 浩: アレルゲンの抗原解析及びその低減化に関する研究, 食物アレルギー研究会 (東京, 2004年1月).
- H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

食物アレルギーの抗原解析・交叉反応性に関する研究

分担研究者	赤澤 晃	国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科医長
研究協力者	神谷太郎	国立成育医療センター 総合診療部医員
	大矢幸弘	国立成育医療センター 第一専門診療部アレルギー科医長
	田中和子	国立成育医療センター免疫アレルギー研究部アレルギー研究室 研究員
	松本健治	国立成育医療センター免疫アレルギー研究部アレルギー研究室長

研究要旨 法定5品目、奨励19品目の原材料表示がはじまったが、さまざまな問題があり解決していかななくてはならない。これまで、分担研究として食物間の交差抗原性について検討をおこなひ、鶏卵と魚卵、魚卵と魚肉、イモ類の交差抗原性に関して報告し、食物アレルギー患者が自らのアレルギーに対する交差反応性について認識して原材料表示を利用することの必要性を検討してきた。今年度は、牛乳と山羊およびめん羊乳に関する交差抗原性について検討した。

A. 研究目的

食品間には、その発生的近縁性からアレルギー蛋白質のアミノ酸配列の相同性が存在する。このため異なる食品間でも交差抗原性が存在している。食物アレルギーのある人が、特定の食品に関してアレルギーがあることがわかりそれを除去するように食生活に気をつけていてもその食品と交差抗原性を有する食品を摂取した場合にアレルギー反応を起こす可能性がある。食品間の交差抗原性を知ることにより交差反応によるアレルギー反応を防ぐことが可能である。

平成13年に施行された「遺伝子組み換え食品及びアレルギー物質を含む食品に関する表示」に関する法律において表示義務5品目と表示推奨19品目が定められた。これまでの研究で、鶏卵とイクラ、イクラと他の魚卵、魚肉、落花生と他の種実類、ヤマイモとジャガイモ、サツマイモの交差抗原性の症例を検討してきた。本研究では交差抗原性の頻度を明らかにすることで摂取者により安全な表示を提供できることを目的とする。

B. 研究方法

交差抗原性の有無の頻度を算出するために各調査項目別に一定数患者から研究実施の説明同意のもとに採血を実施する。各項目の予定数は以下のとおりである。

1. 対象患者数

(1) 鶏卵アレルギー患者

①イクラ IgE 抗体の陽性率の検討：鶏卵白、鶏卵黄 IgE 抗体測定と同時にイクラ IgE 抗体の測定を行う。対象患者数：100名

②イクラとの交差抗原性の検討：鶏卵とイクラ IgE 抗体が共に陽性の場合に、inhibition ELISA

試験で交差抗原性を測定する。対象患者数：20名以上

(2) イクラアレルギー患者

①タラコ、カズノコとの交差抗原性の検討：イクラ IgE 抗体陽性の人のタラコ、カズノコ IgE 抗体の陽性率を測定し、陽性血清での inhibition ELISA 試験での交差抗原性を測定する。対象患者数：20名以上

②サケとの交差抗原性の検討：イクラ IgE 抗体陽性の人のサケ IgE 抗体の陽性率を測定し、陽性血清での inhibition ELISA 試験での交差抗原性を測定する。対象患者数：20名以上

(3) 落花生アレルギー患者

①アーモンド、カシューナッツ特異 IgE 抗体陽性率の検討：落花生 IgE 抗体測定と同時に、アーモンド、カシューナッツ IgE 抗体の測定をおこなう。対象患者数：100名

②アーモンド、カシューナッツとの交差抗原性の検討：落花生とアーモンドあるいは、落花生とカシューナッツが共に陽性の患者血清で交差抗原性を検討する。対象患者数：それぞれ20名以上

(4) ヤマイモアレルギー患者

①ヤマイモ特異 IgE 抗体陽性率の検討：他の食物アレルギーを有する患者のなかでのヤマイモ IgE 抗体陽性率を測定する。対象患者数：100名

②ヤマイモとジャガイモ、サツマイモとの交差抗原性の検討：ヤマイモとジャガイモあるいはサツマイモが共に陽性の患者血清で交差抗原性を検討する。対象患者数：20名以上

(5) 牛乳と山羊乳

①牛乳と山羊乳、綿羊牛の乳の交叉抗原性の検討：対象患者：20名以上

2. 患者さんからの血清の採取

外来診療に必要なアレルギー血液検査実施時に、本研究の説明を行い任意に同意をもらい通常の採血と同時に必要血液を採取する。必要血液は、各項目で全血で3ml（血清2ml）である。検討項目が重複する場合は、採取量を年齢に応じて考慮する。最大採血量の目安として（この研究のために追加する採血量）①1歳まで全血3ml ②1歳から6歳まで全血5ml ③6歳以上全血10ml

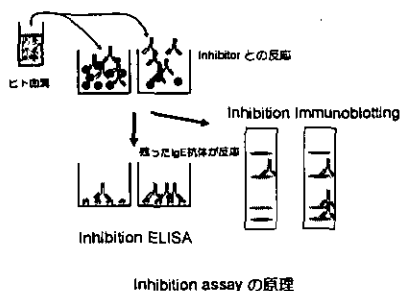
3. 特異 IgE 抗体測定方法

①ユニキャップで測定する項目：鶏卵白、鶏卵黄、イクラ、タラコ、サケ、落花生、ジャガイモ、サツマイモ

②ELISA法で測定する項目：カズノコ、カシューナッツ、ヤマイモ

4. 交差抗原性の測定方法

Inhibition ELISA とユニキャップを組み合わせ実施。必要に応じて確認のため、inhibition blotting 法をおこなう。



5. 患者さんへの説明・同意

①患者さんへの説明：食物アレルギーを有する患者さんに、説明文書と口頭で説明をおこなう（協力の任意性、研究の目的・必要性、検査項目、採血量、保険外検査の検査費用の負担の無いこと、結果を説明すること、検査結果は、統計的に処理され個人情報保護されていること、結果を厚生労働科学研究の報告書に報告すること、および関係学会等で公開すること）

②同意取得：同意書を作成し、電子カルテとして病院で保存する。

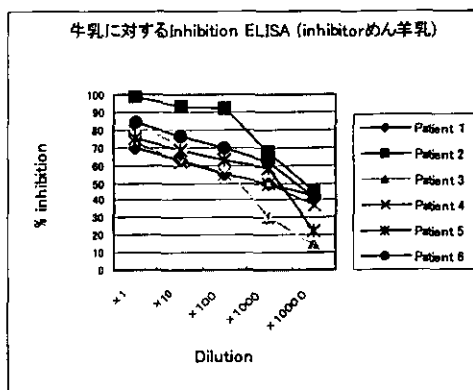
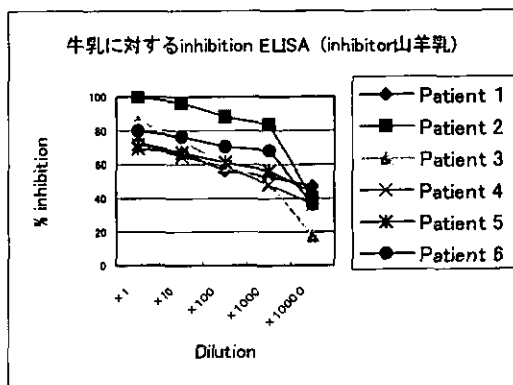
③結果の説明：個人の検査結果を、患者さんが外来受診時に報告する。一部の検査は、時間がかかることを了解してもらう（年度内に報告予定）

（倫理面への配慮）患者からの血清提供に関して説明書、同意書を作成し国立成育医療センター倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1)患者血清の収集：現在患者血清およびその患者の特徴を収集中

(2)牛乳、山羊乳による IgE 抗体交叉抗原性の検討：6名の牛乳アレルギー患者血清（牛乳 IgE クラス 4 から 6）を用いて、山羊乳、めん羊乳との交差反応性を inhibition assay で検討した。全ての患者において、山羊乳、めん羊乳ともに牛乳と高い交差反応性を示した。



D. 考察

表示食品に関する、交差抗原性の検討を行ってきた。今年度は、先ず、牛乳と山羊乳との反応性について検討を行った。今年度、まだ症例が十分ではないが、inhibition assay を用いた交差反応性試験では高い交差反応性があることを示唆するものであった。羊乳は、脂肪の吸収が良い、アトピー性皮膚炎により、アレルギー性が低いなどと一部で宣伝されていることがあるが、その抗原性は、牛乳と高い IgE 抗体交差反応性を示している。こうした表示に注意を喚起する上にも重要な結果である。

E. 結論

交叉抗原性に関しては、IgE 抗体レベルでの阻止試験 (inhibition assay) により頻度を調査し

たものはない。日本人での交叉反応性の発現頻度を調査することは、適切な食品表示を行う上で重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa K, Hashida R, Miyagawa M, Kagaya S, Sugita Y, Matsumoto K, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Saito H.: Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis and in vitro cytokine-stimulated blood eosinophils. *Clin Exp Immunol*. 131(3):436-445, 2003.
- 2) Matsumoto K, Ogasawara T, Kato A, Homma T, Iida M, Akasawa A, Wakiguchi H, Saito H: Eosinophil Degranulation during pregnancy and after delivery by cesarean section. *Int Arch Allergy Immunol* 131(suppl 1):34-39, 2003.
- 3) Hashida R, Ogawa K, Miyagawa M, Sugita Y, Takahashi E, Nagasu T, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Matsumoto K, Saito H.: Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis by differential display. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Jun;131 Suppl 1:26-33.
- 4) Nagata N, Oshida T, Yoshida NL, Yuyama N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H: Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 132(2):156-167, 2003.
- 5) Koyano S, Kurose K, Saito Y, Ozawa S, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Nakajima T, Matsumoto K, Akasawa A, Saito H, Sawada J.: Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region. *Drug Metab Dispos*. 232(1):149-54, 2004.
- 6) 嶋倉邦嘉, 長島裕二, 塩見一雄, 久能昌朗, 海老澤元宏, 赤澤 晃, 飯倉洋治: 食物負荷試験

用に製造した乾燥食品粉末のアレルゲン性の in vitro による評価. *アレルギー*(52)6: 522-529, 2003.

- 7) 赤澤 晃: アトピー性皮膚炎と合併した諸病変の診断と治療 *食物アレルギー(解説/特集)アレルギー・免疫* (10)2:156-160, 2003.
 - 8) 赤澤 晃: 食物アレルギー. *アレルギー・免疫* 10(2): 20-24, 2003.
 - 9) 赤澤 晃, 田中和子, 松本健治: 食物アレルギーに対する新たな対策について— 食物抗原解析および抗原蛋白質の定量. *日本小児アレルギー学会誌* 17(1):18-22, 2003.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Akasawa A, Tanaka K, Akashi K, Kawahara H, Suda T, Nomra I, Ohya Y, Kamiya T, Saito H: To read food material labeling, it is important to understand cross-reactivity of IgE antibody. 60th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, San Francisco, USA. Mar. 19-23, 2004
 - 2) 松本美江子, 篠原示和, 須田友子, 赤司賢一, 渡辺博子, 赤澤 晃, 大矢幸弘: レスポンデント条件付けにより摂食困難に陥った食物アレルギー男児の一例. 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2003. 5.
 - 3) 赤澤 晃: 教育セミナー, 口腔アレルギーとラテックス・フルーツ症候群. 第40回日本小児アレルギー学会, 岐阜, 2003. 10. 3
 - 4) 河原秀俊, 石井徹仁, 須田友子, 大矢幸弘, 赤澤 晃, 高山ジョーン一郎: 卵白特異 IgE 陽性患児に対するインフルエンザワクチン接種—当院でのプロトコール試案—. 第40回日本小児アレルギー学会, 岐阜, 2003. 10. 4
 - 5) 松本美江子, 河原秀俊, 赤司賢一, 成田雅美, 須田友子, 野村伊知郎, 赤澤 晃, 大矢幸弘: 小児食物アレルギーの養育者不安に関する質的研究. 第53回日本アレルギー学会総会, 岐阜, 2003. 10. 24

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

アレルギー物質を含む食品表示制度の改正に関する提案

主任研究者 海老澤 元宏 国立相模原病院臨床研究センターアレルギー性疾患研究部
研究協力者 今井 孝成 昭和大学医学部小児科

【はじめに】

平成13年4月に食品衛生法を改正しアレルギー性物質を含む食品表示が改められてからより詳細な食物アレルギーに関する全国調査が平成13年と平成14年に行われた。そのことを受けて今回アレルギー物質を含む食品表示の改善案を提言する。

【背景】

平成13年4月の改正の際にもとになったデータは「厚生労働省食物アレルギー対策検討委員会（代表：故飯倉洋治昭和大学教授）」において平成10、11年度に調査した平成9年、10年の食物アレルギーに関する全国調査のデータである。その際に表示品目の24品目が決定されたいきさつは報告総症例数1538例中において4症例以上の報告があったものを当時の厚生省食品保健部においてリストアップした品目数であった。平成12年度から始まった「食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究（主任研究者：海老澤元宏）」（以下研究班と略す）において表示の詳細な検討を旧厚生省食品保健部と協力しながら開始した。平成12年度に「アレルギー物質を含む食品の表示に関する検討グループ」を設置し検討し、法令で規定する特定原材料5品目（卵、乳または乳製品、小麦、ソバ、ピーナッツ）と表示を奨励する特定原材料19品目（あわび、イカ、いくら、エビ、オレンジ、カニ、キウイフルーツ、牛肉、クルミ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、リンゴ、ゼラチン）を定めるように提言した。その結果平成13年4月の食品衛生法の改正、さらに平成14年4月からの制度の実質的運用となった。

【平成13年・14年全国モニタリング調査に関して】

研究班においてアレルギー物質を含む食品表示の妥当性を検討することを主たる目的とし食物アレルギーモニタリング調査を全国2000名以上の医師の協力のもと行われ症例数384

0例が集積した。今回の調査は前回の全国調査の2つの大きな反省点を改善して行われた。すなわち、1)食物アレルギーの症例のほとんどが外来診療で帰結するためにレトロスペクティブに調査することよりもプロスペクティブにモニターした方が精度の高い調査ができること、2)前回200床以上の有床病院を対象として調査したが患者さんが診療所レベルで対応されている例も多いので開業医を含め調査したことの2点である。

今回の調査結果は平成14年度の研究班の総合研究報告書に報告されているとおりであるが、今回表示検討会において検討する為の資料としてまとめ直したものを表に示す。

【アレルギー物質を含む食品表示に関する提案】

アレルギー物質を含む食品表示は、1)食物アレルギーを起こす頻度、と、2)食物アレルギーの重篤度、により決められているものである。

まず1)食物アレルギーを起こす頻度に関して検討してみると前回の調査での総症例数が1538例で今回の総症例数が3840例であることを考えると前回の24品目を決めた「4症例以上という基準」は今回の調査では「10症例以上」におおよそ該当する。表に示すように10症例以上の報告があった品目は29品目になる。前回調査での上位3品目を頻度により法令で規定する特定原材料とした訳であるが、今回の調査でも1)卵、2)牛乳および乳製品、3)小麦の順位は変わらず前回の妥当性が確認された。

次に2)食物アレルギーの重篤度に関して検討したところショック症状を誘発した上位3品目は表に示すように頻度の上位3品目と同一であった。4番目がソバ、5番目にピーナッツが認められ重篤度による基準でも前回の法令で規定する原材料5品目の妥当性が支持された。

今回の調査結果で頻度的にもピーナッツを上回り、重篤度でもピーナッツに次いで多くショ

ックが認められた「エビ」に関しては非常に重要な食物抗原であると考えられた。今後エビの生物学的分類、交差抗原性に関する検討、検知法などの整備がなされたなら法令で規定する特定原材料にするべきであると考えられた。

前回の調査結果から推奨19品目に上がっていたマツタケに関しては報告例が無く、またオレンジ、あわびに関しても10症例未満であった。

前回の調査結果では推奨されなかったが、今回の調査で頻度的に10症例以上認められたものが、バナナ(40症例)、メロン(13症例)、マグロ(13症例)、タコ(12症例)、ゴマ(11症例)、タラ(11症例)、アジ(10症例)、ホタテ貝(10症例)の8品目であった。

【結論】

以上の解析結果より法令で規定する5品目に関しては現行通りとし、表示を推奨する品目に関しては頻度から勘案するとマツタケ、オレンジ、あわびを外し、バナナ、メロン、マグロ、タコ、ゴマ、タラ、アジ、ホタテ貝を新たに加えることが望ましいのではないかと思われた。

将来的に諸般の環境が整えばエビに関して推奨レベルから法令で規定する特定原材料に加える必要があると思われる。

【追記】

食品表示規定は加工食品などに適応されるので、生で食する時以外比較的症状の出にくい「果物類」と生で食べることがほとんどの「いくら」に関しては議論のあるところであるが、食品表示は弁当などにも適応されるため表示を推奨すべきであると考えた。

順位	食物アレルギー例	例数	パーセント	順位	ショック例	パーセント	現行表示	今回の案	将来的な案
1	鶏卵	1486	38.3	1	109	25.8	◎	◎	◎
2	牛乳・乳製品	616	15.9	2	93	22.0	◎	◎	◎
3	小麦	311	8.0	3	70	16.5	◎	◎	◎
4	ソバ	179	4.6	4	28	6.6	◎	◎	◎
5	エビ	161	4.1	6	14	3.3	○	○	◎
6	ピーナッツ	110	2.8	5	18	4.3	◎	◎	◎
7	イクラ	87	2.2	7	8	1.9	○	○	○
8	大豆	76	2.0	9	7	1.7	○	○	○
9	キウイ	75	1.9	9	7	1.7	○	○	○
10	バナナ	40	1.0		4	0.9		○	○
11	カニ	40	1.0		3	0.7	○	○	○
12	鶏肉	32	0.8			0.0	○	○	○
12	クルミ	32	0.8		2	0.5	○	○	○
14	イカ	30	0.8		3	0.7	○	○	○
15	サバ	24	0.6		1	0.2	○	○	○
16	豚肉	23	0.6		2	0.5	○	○	○
17	サケ	22	0.6		3	0.7	○	○	○
18	ゼラチン	18	0.5		1	0.2	○	○	○
19	ヤマイモ	15	0.4		4	0.9	○	○	○
20	モモ	14	0.4	7	8	1.9	○	○	○
21	メロン	13	0.3			0.0		○	○
22	マグロ	13	0.3		1	0.2		○	○
23	タコ	12	0.3		2	0.5		○	○
23	牛肉	11	0.3		1	0.2	○	○	○
25	ゴマ	11	0.3		1	0.2		○	○
26	タラ	11	0.3			0.0		○	○
26	リンゴ	10	0.3			0.0	○	○	○
26	アジ	10	0.3			0.0		○	○
26	ホタテガイ	10	0.3		1	0.2		○	○
番外	ブリ	6	0.2		3	0.7			
	オレンジ	4	0.1			0.0	○		
	アワビ	3	0.1		1	0.2	○		
	マツタケ	0	0.0			0.0	○		

合計	24品目	29品目	29品目
◎：義務	5	5	6
○：推奨	19	24	23