

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中に含まれるアレルギー物質の  
検査法開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書  
(H17-食品-011)

主任研究者 宇理須 厚雄

平成18(2006)年4月

# 目次

## I. 総括研究報告書

食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究 宇理須 厚雄 .....	1
---	---

## II. 分担研究報告書

1. 甲殻類・ナッツ類の交差抗原性とエビ・カニの食品表示の方法の検討  宇理須 厚雄 .....	12
2. 豆類検知法の開発 穂山 浩 .....	23
3. 魚貝類アレルギーの特定、抗原交差性・一次構造の解明および検知キットの開発 塩見 一雄 .....	33
4. 果実類の検出法開発に関する研究 松田 りえ子 .....	47
5. 食肉中に含まれるアレルギー物質の検査法開発研究 田辺 創一 .....	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	60

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 宇理須厚雄

藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科

研究要旨

1) アレルギー物質検査法の開発

①エビ ELISA 法: 2つの研究グループでそれぞれ別個に作製されたブラックタイガートロポミオシンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、甲殻類のトロポミオシンに高い反応性と特異性を示すことが確認された。サンドイッチ ELISA 法による検出系を構築し、試作モデル加工食品に適用した結果、一部食品で回収率などに問題があり原因を究明中である。

②エビ PCR 法; 甲殻類のエビとカニのうち、エビの確定試験法に必要とされる性能を有する PCR 検知法を開発した。今後は、エビ PCR 法のバリデーションを行なう必要がある。

③大豆 ELISA 法; 大豆アレルゲンのひとつである GlymBd30K をターゲットとした抗体を調製し、サンドイッチ ELISA 法を構築した。

④大豆 PCR 法; 穀類 7 種、ナタネ、種実類 8 種および大豆以外の豆類 10 種では PCR による増幅は認められず、大豆 9 品種でのみ増幅が確認され、特異性の高さが証明された。

⑤クルミ ELISA 法; クルミの 2S アルブミンに対するアフィニティ精製抗体(ウサギ)を用いてサンドイッチ ELISA 法を開発した。

⑥キウイ ELISA 法; キウイの主要アレルゲンであるアクチニジンに対する 8 種類のモノクローナル抗体を得た。これらを組み合わせることによって、サンドイッチ ELISA によってアクチニジンを高感度で検出可能となった。さらに、簡易測定法としてイムノクロマトキットも構築した。

⑦キウイ PCR 法; キウイ類を検知できる特異性と感度を有していた。

⑧食肉(鶏肉、牛肉、豚肉) ELISA 法; 鶏肉では 32kDa 蛋白質(おそらくトロポニン T)、豚肉ではアルブミン(あるいは豚肉混合蛋白質)を、牛肉ではミオグロビンを選択し抗体を作製した。

⑨鶏肉、豚肉 PCR; PCR 産物が良好に得られることを確認した。特に鶏肉用プライマーの特異性は高く、鶉、鴨、七面鳥との識別が可能であった。

⑩ゼラチン ELISA 法; ゼラチンの部分配列ペプチドあるいはウシゼラチンに対する抗体を作製した。抗ペプチド抗体は、ブタおよびウシゼラチンに対してはよく反応したが、サカナゼラチンに対する反応は極めて低かった。抗ウシゼラチン抗体はゼラチン含有食品の検出が可能であるが、加熱肉とも反応したことが課題である。

⑪水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルゲンの簡易測定法の開発; 基礎的検討を行った。

2) 甲殻類のアレルゲン解析; ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、カメノテおよびミネフジツボの主要アレルゲンは抗原交差性を示すトロポミオシンであった。cDNA クローニングによって全アミノ酸配列を決定した結果、ミネフジツボトロポミオシンのアミノ酸配列は甲殻類よりも軟体動物のアワビ類に近かったが、その他の甲殻類(ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ)のトロポミオシンは既知の甲殻類トロポミオシンと 90%以上のアミノ酸配列の相同性を示した。

3) 貝類のアレルゲン解析; アカガイ、アサリ、ウバガイ、トリガイ、マガキ、エゾバイ、クロアワビおよびサザエの主要アレルゲンも抗原交差性を示すトロポミオシンであった。アカガイとアサリのトロポミオシンはお互いに 77%の配列相同性を示し、既知の軟体動物トロポミオシンとの相同性も 70-80%であった。クロアワビとサザエのトロポミオシンの配列相同性は 97%と高く、他のアワビ類トロポミオシンとも 95%以上の相同性を有していた。

4) 甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性の検討;十脚目甲殻類だけではなく十脚目以外の甲殻類を含めて、いずれの組み合わせでも患者 IgE 抗体の相関は極めて高かった。十脚目に限らず十脚目以外の甲殻類でもトロポミオシンが主要なアレルゲンであることが示唆された。

5) カニ・エビ食品表示のためのエビアレルギー患者あるいはその保護者を対象としたアンケート調査;現在、質問紙の回収を終了し集計中である。

6) ピーナッツなどナッツ類の交差抗原性の検討;ピーナッツアレルギー症状を呈する患者の IgE 抗体はピーナッツ・ナッツ類抗原の比較的固有のアレルゲン成分を認識することが推測された。一方、ピーナッツ特異的 IgE 陽性にも係わらずピーナッツ摂取時の誘発症状を認めない患者の IgE 抗体は、ピーナッツとナッツ類との共通した部位を認識することが示唆された。その1つとして、植物間に共通して含まれる多糖体構造 Cross-reactive Carbohydrate Determinant を無症状患者 IgE 抗体は反応することが確認された。

7) 魚卵のアレルゲン:シロザケ成熟魚卵の卵黄タンパク質である  $\beta'$ -コンポーネントとリポビテリンについて、食品中に含まれるイクラ検出方法に関わる対象タンパク質としての妥当性を検討した。ウサギ抗血清を用いた実験によると、 $\beta'$ -コンポーネントは魚種間で強い交差性を有した。 $\beta'$ -コンポーネント抗体が反応する卵黄抽出成分は主に 14-20 kDa ( $\beta'$ -コンポーネント)であったが、魚種によって反応成分の数と分子量とが異なっていた。一方、リポビテリン抗体と反応するタンパク質はスケトウダラとホッケを除く魚卵抽出物中に存在した。イクラの検出検査に  $\beta'$ -コンポーネントを用いるのは、種間交差性の強さから難しさが伴う。リポビテリン重鎖部分を用いる検査系の検討が妥当であると思われた。

#### 分担研究者

穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長

塩見 一雄 東京海洋大学海洋食品科学科教授

松田 りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長

田辺 創一 広島大学大学院生物圏科学研究科助教授

#### A.研究目的

近年、乳幼児から成人に至るまで、食物が原因でアレルギー症状を起こす人が増えてきている。厚生労働省は食品衛生法等の改正を行い、平成 13 年 4 月からアレルギーを起こしやすい物質を加工食品に表示することとした。現在、5 品目(小麦、そば、卵、乳及び落花生(以下、特定原材料という。))については、表示が義務づけられているが、20 品目(あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン(以下、特定原材料に準ずるものという。))については表示が奨励されている。

現在、表示が義務づけられている特定原材料 5 品目については、検査法が確立され、厚生労働省から「アレルギー物質を含む食品の検査方法につい

て(食発第 1106001 号、平成 14 年 11 月 6 日付け厚生労働省医薬局食品保健部長通知。)」として通知され、含有の有無を検証することが可能となっている。しかし、表示が奨励されている特定原材料に準ずる 20 品目は、食品への表示が義務ではなく、検査法も確立していないため、表示に対する信頼性が十分に確保されているとはいえない。

本研究では、特定原材料に準ずる 20 品目の中で、症例数の多い品目やアナフィラキシーなど重篤な症状の報告がある品目を優先的に、健康被害防止の観点から、加工食品中の含まれるアレルギー物質の検査法を開発、評価さらに標準化することを目的とする。さらに、検査法開発に伴って得られる知見、特に交叉反応性に関する研究成果、消費者や企業からの意見等を参考にして、適切であり、かつ、アレルギー疾患を有する者にとってより分かりやすい表示方法を研究し提言する。

なお、総括報告書では研究全体の構成を分かり易くするために研究内容に従って並べ直した。下記に総括報告書に記した研究テーマがどの分担研究で行われたものかを示す。

#### 1、宇理須厚雄;甲殻類・ナッツ類の交差抗原性とエビ・カニの食品表示の方法の検討

・甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性の検討

(宇理須、近藤)

- ・カニ・エビ食品表示のための質問紙調査(堀口)
- ・ピーナッツおよびナッツ類間の交差抗原性(伊藤)

## 2、穂山浩;豆類検知法の開発

- ・エビ PCR 法(穂山、田口、正野、平尾)
- ・大豆 ELISA 法(穂山、森山、松本、神谷、森下)
- ・大豆 PCR 法(穂山、山川)
- ・クルミ ELISA 法(穂山、本庄)
- ・水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルギーの簡易測定法の開発(穂山、鈴木、中村)

## 3、塩見一雄;魚貝類アレルギーの特定、抗原交差性・一次構造の解明および検知キットの開発

- ・エビ ELISA 法(塩見、穂山、大橋、阿部、梅田、岡、織田、清水、石原)
- ・甲殻類アレルギー解析(塩見)
- ・貝類のアレルギー解析(塩見)
- ・魚卵のアレルギー解析(佐伯)

## 4、松田りえ子;果実類の検出法開発に関する研究

- ・キウイ ELISA 法(松田、プリマハム?)
- ・キウイPCR法(松田、田口、正野、平尾)

## 5、田辺創一;食肉中に含まれるアレルギー物質の検査法開発研究

- ・食肉(鶏肉、豚肉、牛肉)ELISA 法(田辺、松本、藤村、佐藤、琴浦)
- ・鶏肉、豚肉 PCR 反応(田辺、松本、藤村、佐藤)
- ・ゼラチン ELISA 法(田辺、本庄)

## B.研究方法

### 1)アレルギー物質検査法の開発

- ①エビ ELISA 法
- ②エビ PCR 法
- ③大豆 ELISA 法
- ④大豆 PCR 法
- ⑤クルミ ELISA 法
- ⑥キウイ ELISA 法
- ⑦キウイPCR法
- ⑧食肉(鶏肉、豚肉、牛肉)ELISA 法
- ⑨鶏肉、豚肉 PCR 反応
- ⑩ゼラチン ELISA 法
- ⑪水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルギーの簡易測定法の開発

### 2)甲殻類アレルギー解析

- ①抽出抗原;軟甲亜綱十脚目長尾亜目のウシエビ(ブラックタイガー)とホッコクアカエビ(甘エビ)、短尾

亜目のケガニ、オキアミ目のナンキョクオキアミ、蔓脚亜綱有柄目のカメノテ、無柄目のミネフジツボの筋肉、ケガニ脚肉と胴肉から抽出液を調製した。

②イムノブロッティングと阻害イムノブロッティング;エビアレルギー患者血清。

③交差反応性確認用トロポミオシンの精製:クロアワビ、マダコ、スルメイカ、ホタテガイ、アサリ、カキ、バイガイを材料としてトロポミオシンの精製を行った。

④ブラックタイガー由来精製トロポミオシンに対するアフィニティー精製ポリクローナル抗体(ウサギ)とモノクローナル抗体の作製。

⑤トロポミオシンをコードする cDNA のクローニング;ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミおよびミネフジツボの筋肉、ケガニについては脚肉と胴肉から total RNA を抽出した。

### 3)貝類のアレルギー解析

①抽出抗原;アカガイの足筋、アサリの可食部、ウバガイ(ホッキガイ)の足筋、トリガイの足筋、マガキの貝柱、エゾバイの足筋、クロアワビの貝殻筋およびサザエの足筋から加熱抽出液を調製した。

②SDS-PAGE とイムノブロッティング;

③トロポミオシンをコードする cDNA のクローニング;アカガイの足筋、アサリの可食部、ウバガイの足筋、トリガイの足筋、マガキの貝柱、エゾバイの足筋、クロアワビの貝殻筋およびサザエの足筋から total RNA を抽出した。

4)甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性の検討

①対象;甲殻類に対してアレルギーの既往をもつ患者と甲殻類に対して IgE 抗体が陽性を示す患者血清(87 検体)。

②特異的 IgE 抗体(CAP-FEIA);

非加熱抽出抗原;十脚目甲殻類(ホッコクアカエビ(アマエビ)、大正エビ、ブラックタイガー、シバエビ、アカエビ(ムキエビ)、エビミックス(ホッコクアカエビ、ブラックタイガー、アカエビ(ムキエビ)のミックス)、タラバガニ、ケガニ)

加熱処理後抽出抗原;十脚目甲殻類(ホッコクアカエビ、ヨーロッパイチョウガニ)、十脚目以外の甲殻類(シャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテ)

上記抽出物の CAP 支持体への固相化はスエーデンダイアグノスティック社へ依頼した。

大腸菌で作製したブラウンシュリンプのリコンビナントトロポミオシンも同様に固相化した。

#### 5) カニ・エビ食品表示のための質問紙調査

小児アレルギー学会会員(2942名)に受診したエビ・カニアレルギー患者あるいはその保護者1名に対し、会員を通して質問紙を配布し、郵送にて回収した。調査項目は、エビ・カニの表示方法、それに対する意見、食品の購買行動などである。

#### 6) ピーナッツおよびナッツ類間の交差抗原性

①対象;ピーナッツによる明らかな即時型アレルギー反応が確認されている患者(14名)の血清。ナッツ類アレルギー患者(6名)の血清。ピーナッツIgE抗体陽性でアレルギー症状を有さない患者(8例)血清。

②CAP-FEIAとRAST inhibition;ピーナッツ、大豆、クルミ、カシューナッツ、ピスタチオ、栗、マカデミアナッツ、アーモンド、松の実、Horseradish peroxidase(HRP)、パイナップル由来のBromelainを抗原とした。

#### 7) 魚卵のアレルゲン解析

①抽出抗原;魚卵を生シロサケ、イトウ、ニジマス、スケトウダラ、アサバガレイ、ババカレイ、ホッケ、カペリンの卵から抽出物を作製した。

②ウェスタンブロッティング;魚卵アレルギー患者血清とシロサケ主要アレルゲンであるB<sup>2</sup>-コンポーネントおよびリポビテリンに対する抗血清を用いた。

### C. 研究結果、考察、結論

#### 1) アレルギー物質検査法の開発

##### ①エビELISA法

(マルハグループ):甲殻類(エビ・カニ)に特異性の高いサンドイッチELISA測定系を構築した。試作したモデル加工食品の本測定系での回収率および希釈直線性は概ね良好であった。しかし、バリデーションに向けては一部食品に対する反応性を改善する必要がある。

(日本水産、日水製薬):エビとカニのトロポミオシンを特異的に検出可能な抗体を作製し、サンドイッチELISAを試作した。また5種類のモデル食品を試作し反応性を確認した結果、原料段階で添加された甲殻類を検出可能であることが確認された。しかし、一部の食品で回収率が低い傾向が認められたことから、さらなる検討が必要であると考えられた。甲殻類エキスは煮出しエキスに対しては強い反応性が認められたが、酵素処理エキスは反応が弱かった。

##### ②エビPCR法

設計したプライマーで、代表的な「エビ(4種)、ザリガニ(2種)、イセエビ(1種)」から標的とした約200bpのPCR産物が得られた。一方、カニ(3種)、シャコ、オキアミ、アミからは、標的サイズのPCR産物は得られなかった。検知限界は、エビ等のDNA量として2.5pg(鋳型DNA量50ngで検査した場合に50ppm(w/w)相当量(可食部の蛋白質含量から計算されるエビ蛋白質濃度としては10 $\mu$ g/g相当量)であった。

以上、エビの確定試験法に必要とされる性能を有するPCR検知法を開発できた。今後は、さらに幅広い範囲での甲殻類や甲殻類以外の動植物での感度と特異性の確認、エビ由来の標的サイズのシークエンス確認、エキス原料等に使用される殻部分での検知確認、実際の食品を想定した既知濃度のエビを添加した擬似混入試料の分析などにより、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。

##### ②大豆ELISA法

ダイズアレルゲンのひとつであるGlymBd30Kをターゲットとした抗体を調製し、サンドイッチELISA系を構築した。検量線の形状、バックグラウンドの値、トップの吸光値ともに良好であった。感度は、0.78125ng/mLであった。特定原材料5品目をはじめとし、調査したほとんどの食品原材料に対して反応しなかった。また、ダイズとして検出されるべき品目である黒豆、枝豆、もやしなどにも十分に反応した。

ダイズ以外の豆類との反応性も少なく、調べた10種類の豆類中では、ささげ豆のみが反応した。モデル加工食品での回収率も良好で、未加熱食品のみならず、100 $^{\circ}$ C加熱処理した食品からでも、ほぼ100%の回収率を示した。

しかし、モデル加工食品の種類によっては、回収率が良くないものがあつたため、更なる改良が必要と考えられた。

##### ④大豆PCR法

ダイズの特異的検出が可能で、かつ検出感度の高いプライマーを構築し、この方法が幅広い食品に適用できることを確認した。

検出限界およびダイズ特異性の検証によって1対のダイズ検知プライマー;Gym81/82が選抜された。このプライマーはGlycine max repetitive sequence(Accession No.:L06326)を検知するもの

で、検出限界は小麦粉中のダイズ粉の混入量として 10ppm(ダイズタンパク質として 3.5ppm)が確認された。また特異性の点においては、穀類 7 種(コムギ、ライムギ、オオムギ、オーツムギ、トモロコシ、コムソバ)、ナタネ、種実類 8 種(アーモンド、カシュー、マカダミア、ピスタチオ、ヘーゼル、ブラジル、ピーカン、クルミ)およびダイズ以外の豆類 10 種(虎豆、手亡、あずき、ささげ、そら豆、えんどう、レンズ豆、ルーピン、ガルバンゾー、落花生)では PCR による増幅は認められず、ダイズ 9 品種(とよこまち、とよむすめ、りゅほう、たちはがな、えんれい、ふくゆたか、むらゆたか、Vinton、Navy)でのみ増幅(増幅産物サイズ: 118bp)が確認された。Gym81/82 を用いた PCR 法により、ダイズ由来原料を含む市販加工食品、調味料および食品素材を分析した結果、醤油、ダイズタンパクを除く食品でダイズの混入が認められた。

供試した市販加工食品には焙煎、焼成およびレトルトなど加工度の高い食品も含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のダイズ検知法として適用可能であることが示唆された。ダイズタンパクには様々な加工形態があるため、今後更に例数を増やして検証を行う必要がある。

#### ⑤クルミ ELISA 法

クルミの 2S アルブミンに対するアフィニティー精製ウサギ抗血清を用いたサンドイッチ ELISA 法を開発した。測定可能な検量線は 0.78 ng/ml から 50 ng/ml の範囲であった。

他のナッツ類(ピーカン、ブラジルナッツ、マカダミア、ピーナッツ、アーモンド、カシュー、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ)の反応性を調べたところ、ピーカンナッツ以外は測定感度以下であったが、ピーカンナッツとは 1/100 程度の反応性を示した。そこで、ピーカンナッツとの反応性を減少させるための処理を施し、1/10000 程度に低減させることに成功した。

豆類(ダイズ、小豆、空豆、黒豆、黒ごま、白ごま、ぎんなん、カカオ)穀類(玄米、ヒエ、アワ、キビ、大麦、小麦、ライ麦、そば)もすべて測定感度以下であった。

#### ⑥キウイアクチニジンに対する ELISA 法

未変性アクチニジンを検出するためのモノクローナル抗体 8 株を作製し、アクチニジンを検出できる組み合わせが得られ、キウイアクチニジンサンドイッチ ELISA 系を構築することができた。さらに、加工工程中で簡易にアクチニジンを検出可能なイムノクロ

マトキットも構築することができた。しかし、得られた組み合わせでは、コーヒー豆、ブラックペッパーに交差性を示した。また、キウイから抽出後のアクチニジンは 4℃保管であれば、48 時間後でも 5% 程度の検出率の低下を示しただけであった。

今後は加工過程で変性したアクチニジンを認識できる抗体を作成すると共に、標準品を作成することが課題である。

#### ⑦キウイの PCR 法

キウイの確定試験法に必要とされる性能を有する PCR 検知法を開発した。今後は、市販食品の分析や、実際の食品を想定した既知濃度のキウイを添加した擬似混入試料の分析により、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。また、併せて、果物果肉や加工品からの DNA 抽出法の検討も必要となる。

#### ⑧食肉(鶏肉、豚肉、牛肉) ELISA 法

食品に含まれる食肉蛋白質を検出するためのターゲット蛋白質として、鶏肉では 32kDa 蛋白質(おそらくトロポニン T)を、豚肉ではアルブミン(あるいは豚肉混合蛋白質)を、牛肉ではミオグロビンを選択し、抗体作製を行った。今後得られるポリクローナル・モノクローナル抗体や抗ペプチド抗体を適宜組み合わせることによって、特異的な測定系を構築できるものと考えられた。なお、鶏肉・豚肉・牛肉エキスに残存する蛋白質の検討を行ったが、かなり分解を受けていることが明らかとなり、エキス中からの検出は困難であると予想された。

#### ⑨鶏肉、豚肉 PCR 反応

鶏肉および豚肉に含まれる DNA を検出するためのプライマー対を設計し、PCR 産物が良好に得られることを確認した。特に鶏肉用プライマーの特異性は高く、鶉、鴨、七面鳥との識別が可能であった。なお、鶏肉・豚肉・牛肉エキスに残存する蛋白質の検討を行ったが、かなり分解を受けていることが明らかとなり、エキス中からの検出は困難であると予想された。

#### ⑩ゼラチン ELISA 法

ゼラチンの部分配列ペプチドあるいはウシゼラチンを免疫して得られた抗体について性質解明を行った。抗ペプチド抗体は、ブタおよびウシゼラチンに対してはよく反応したが、サカナに対する反応は極めて低かった。抗ウシゼラチン抗体を用いて、ゼラチン



含有食品の検出が可能であることが確認されたが、加熱肉とも反応したことが課題として挙げられた。

#### ①水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルギーの簡易測定法の開発

水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルギーの簡易測定法の開発の基礎的検討を行い、オボアルブミン標準品の半定量が可能となった。

この方法が実現可能になれば、食品中の食物アレルギーを、簡便な操作により低コストで精度良く検出することができ、水晶板チャンネルを複数設置することが可能になれば、同一抽出液から多項目のアレルギーを同時に測定することが可能になると考えられる。

#### 2) 甲殻類アレルギー解析

甲殻類アレルギー:6種甲殻類(ウシエビ、ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、カメノテ、ミネフジツボ、)は分類上の位置が異なっても、主要アレルギーはお互いに抗原交差性を示すトロポミオシンである。アメリカンロブスター精製トロポミオシンとも交叉反応性が示された。ミネフジツボ以外の3種甲殻類(ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ)のトロポミオシンは、既知の甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列と非常に類似していた。

甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列は、蔓脚綱を除外くと相溶性が非常に高く、抗原交差性を裏付けている。ナンキョクオキアミやカメノテ、ミネフジツボは一部で食用にされているので、アレルギーの発症には警戒が必要である。とくにカメノテとミネフジツボは、外見上は甲殻類というより貝類に近いので、甲殻類アレルギー患者ならびにこれらを食品として提供している業者に対して甲殻類であることを周知することが望まれる。

ミネフジツボトロポミオシンのアミノ酸配列は、甲殻類より軟体動物のアワビ類のトロポミオシンに近いというトロポミオシンの分子進化を考える上で非常に興味深い事実が判明した。食物アレルギーの点では、フジツボ類は甲殻類ではなく軟体動物として扱った方がいいかもしれない。エビだけあるいはカニだけにアレルギーを起こす患者の違いは、fast タイプとslow タイプのトロポミオシンの変異によって説明できると思われる。今後のこれら患者血清を用いた IgE 結合エピトープ解析が望まれる。

#### 3) 貝類のアレルギー

貝類の主要アレルギーは互いに抗原交差性を示すトロポミオシンである。cDNA クローニング法により、4種貝類(アカガイ、アサリ、クロアワビ、サザエ)のトロポミオシンについては全アミノ酸配列を、3種貝類(ウバガイ、トリガイ、マガキ)のトロポミオシンについては部分アミノ酸配列を決定し、既知の軟体動物トロポミオシンのアミノ酸配列と比較した。アカガイとアサリのトロポミオシンはお互いに77%の配列相溶性を示し、既知の軟体動物トロポミオシンとの相溶性も70-80%であった。クロアワビとサザエのトロポミオシンの配列相溶性は97%と高く、他のアワビ類トロポミオシンとも95%以上の相溶性を有していた。貝類を含めた軟体動物のトロポミオシンのアミノ酸配列はお互いに変異が大きく、今後さらにアミノ酸配列解析を継続する必要がある。

#### 4) 甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性の検討

十脚目甲殻類同士だけではなく十脚目以外の甲殻類とも相関係数は0.84以上と非常に良い相関関係にあった。また、十脚目以外の甲殻類とトロポミオシンとは0.96から0.99という極めて良い相関係数を示した。これは、十脚目以外の甲殻類であるシャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテなどでもトロポミオシンが主要なアレルギーである可能性を示唆している。トロポミオシンとエビミックス(ホッコクアカエビ、ブラックタイガー、アカエビ(ムキエビ)の非加熱抗原)に対するIgE抗体の比較をすると、相関は0.89と高く、トロポミオシンは非加熱エビ抗原においても主要な抗原であることが示唆された。しかし、少数の患者はトロポミオシン以外のエビ抗原に対してIgE結合能を示していることも判明した。

エビ摂取で過敏症状陽性者のどのくらいがカニに対して過敏症状陽性なのかを主治医が記載した患者情報から検討した。その結果、エビアレルギー患者15例中11例(73.3%)がカニに対しても過敏症状を呈した。

#### 5) カニ・エビ食品表示のための質問紙調査

3月17日現在、質問紙を回収し、集計中である。

#### 6) ピーナッツおよびナッツ類間の交差抗原性

ピーナッツアレルギー患者のピーナッツ特異IgE抗体価は、最も近縁な豆類である大豆だけではなく他のナッツ類に対する特異的IgE抗体価と関連しな

い。一方、ピーナッツ特異的 IgE 抗体が陽性にも係わらず無症状である患者血清では高い相関が認められた。クルミ、松の実については、いずれの血清でも交差反応しない事が示唆された。

ピーナッツアレルギー患者は、ピーナッツアレルゲンに特異的なエピトープを認識しているが、無症状血清はナッツ類に共通するエピトープを認識する事が示唆された。

そこで、植物に共通して含まれる多糖体抗原 CCD に対する抗体の存在を確認するために、ピーナッツアレルギー血清 4 例と無症状血清 4 例で HRP 及び Bromelain に対する IgE 抗体を測定した。その結果、ピーナッツアレルギー血清では全例陰性であったのに対し、無症状血清は Bromelain で全例陽性、HRP でも 3 例で陽性であった。

ピーナッツ IgE 抗体測定系における CCD の関与を検討するために、上記の 4 検体を用いてピーナッツ CAP-FEIA に対して HRP を用いた inhibition を行った。その結果、ピーナッツアレルギー血清は 1 例も抑制が見られなかったのに対し、無症状血清では 4 例中 2 例で 50% 以上の抑制、1 例で 40% の抑制が認められた。

その共通抗原成分のひとつは、植物間に共通して存在する多糖体成分(CCD)であることが確認された。

ピーナッツアレルギー血清では CCD を認識する抗体が検出されず、無症状血清の一部では CCD を認識する抗体の存在がピーナッツ IgE 抗体の偽陽性をもたらしていると考えられた。

ピーナッツの主要アレルゲン成分である Ara h1 にも、CCD が存在することは確認されており、今後、ナッツ類の交差抗原性を検討する際には、こうした成分の関与を考慮に入れた検討が重要であろう。

ピーナッツ・ナッツ類アレルギー患者の IgE 抗体は、各ナッツに固有のアレルゲン成分を認識する事が示唆された。今後アレルゲン食品表示を検討する際には、ナッツ毎に固有のアレルゲン成分を研究対象とする事が望ましいと考えられる。

#### 7) 魚卵のアレルゲン解析

シロサケ  $\beta'$ -コンポーネント( $\beta$ )に対するウサギ抗血清を用いた実験によると、 $\beta$  は魚種間で強い交差性を有した。またイクラ  $\beta$  に強く反応する患者血清は、イトウ、ニジマス の  $\beta$  に相当する成分と強く反応した。一方、ウサギ抗 Lv 血清( $\alpha$ -Lv)はイトウやニジマスなどサケ科魚類の Lv 重鎖または軽鎖と反応したが、そ

の反応性は  $\beta$  の場合よりも弱かった。また、スケトウダラ卵のタンパク質は  $\alpha$ -Lv と反応しなかった。イクラの検出検査に  $\beta$  を用いるのは、種間交差性の強さから適していないと考えられた。リボビテリン重鎖部分を用いる検査系の検討が妥当であると思われた。

食品表示がより適切なものとなれば、食品によるアレルギー発症を減少させることができ、国民医療費の支出削減化、適切な表示がされた安全で安心できる食品の供給を通し広く国民の食への信頼、安心に寄与することが期待される。またアレルギー物質を含む食品の表示制度に関して、我が国は先駆的な役割を担っており、検査法を開発する本研究も世界に先駆けた研究であることから、CODEX(国際食品規格委員会)のような国際的機関における安全性管理に技術的側面から寄与できる。

#### F.健康危険情報

特になし

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

1) Kondo Y, Kakami M, Koyama H, Yasuda T, Nakajima Y, Kawamura M, Tokuda R, Tsuge I, Urisu A. IgE Cross-reactivity between Fish Roe (Salmon, Herring and Pollock) and Chicken Egg in Patients Anaphylactic to Salmon Roe. *Allergology International*.54:317-323, 2005.

2) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int Arch Allergy Immunol*, 136, 1, 23-32, 2005.

3) 宇理須厚雄;食物アレルギー;食物アレルギーの免疫療法、最新医学、新しい診断と治療の ABC, 免疫4, 26, 167-173, 2005.

4) 宇理須厚雄;食物アレルギーに対する免疫療法:経口減感作療法、感染・炎症・免疫、医薬の門社 35, 2, 167-169, 2005.

5) 宇理須厚雄、低アレルゲン化療法、*Current Therapy*, 23, 11, 50-54, 2005.

6) Komei Ito, Masashi Morishita, Mihoko Ohshima, Tatsuo Sakamoto, Akira Tanaka, Cross-reactive carbohydrate determinant contributes to the false positive IgE antibody

to peanut, *Allergology International* 54,387-392,2005.

7) 伊藤浩明、ピーナッツアレルギーの臨床像と診断、*小児科* 46, 1008-1015, 2005.

8) Takahiro Watanabe and Hiroshi Akiyama et al., A Specific Qualitative Detection Method for Peanut (*Arachis hypogaea*) in Foods using Polymerase Chain Reaction, *J Food Biochemistry*, in press.

9) Hiroshi Akiyama, Kozue Sakata, Yasuo Yoshioka, Yoshifumi Murata, Yoshihiro Ishihara, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada and Tamio Maitani, Profile analysis and allergenicity of wheat protein hydrolysates *International Archives of Allergy Immunology*, in press.

10) Teshima, R., Okunuki, H., Sato, Y., Akiyama, H., Maitani, T., Sawada J., Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice. *Allergology International*, 55, 43-48 (2006)

11) Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Takahiro Watanabe, Megumi H. Nagaoka, Yasuo Yoshioka, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Kiyoshi Yamada, Mamoru Totsuka, Reiko Teshima, Yukihiro Goda, Jun-ichi Sawada, Tamio Maitani Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergy in murine model. *FEBS Lett.*, 579, 4485-4491 (2005).

12) Akiyama H, Amano H, Bienenstock J. Rat tracheal epithelial responses to water avoidance stress. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 318-324 (2005)

13) 橋本裕一郎、古林万木夫、宮澤いづみ、高畑能久、田辺創一、谷内昇一朗 “特異的抗体を用いた醤油原料(ダイズ、小麦)の分解機構の検討” 醤油の研究と技術 Vol.31 No.4 217-222 2005

14) 橋本裕一郎、吉田多恵子、古林万木夫、宮澤いづみ、高畑能久、森松文毅、田辺創一、谷内昇一朗 “醤油醸造における小麦アレルギーおよびダイズアレルギーの分解・除去機構の解明” 醤油の研究と技術 Vol.31 No.6 347-351 2005

15) 森下直樹、松本貴之、高畑能久、森松文毅、上條茂徳、秋山恵利、有川奈津実、飯田知美、多勢加奈子、浜路麻衣、平岡里海、白柳利江子、豊田

正武 “調理加工モデル食品を用いたアレルギー検査用免疫クロマトキットの評価” *食品衛生学雑誌* in press

16) Yumiko Watanabe, Kenichi Aburatani, Tasuku Mizumura, Masatoshi Sakai, Shiroo Muraoka, Shinichi Mamegoshi, Tsutomu Honjoh, Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent; *Journal of Immunological Methods* 300 (2005) 115-123

17) Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, and Kawada T. Dietary Fat and an Exogenous Emulsifier Increase the Gastrointestinal Absorption of a Major Soybean Allergen, Gly m Bd 30K, in Mice. *J Nutr.* 135, 1738-1744 (2005).

18) Moriyama T, Machidori M, Ozasa S, Maebuchi M, Urade R, Takahashi K, Ogawa T, and Maruyama N. A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Soybean  $\beta$ -Conglycinin, a Major Soybean Storage Protein, in Soybean and Soybean Food Products. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51, 34-39 (2005).

19) Iijima S, Moriyama T, Ogawa T. A case of anaphylaxis due to soy milk; Trial of detection of IgE-binding soybean proteins. *J Environmental Dermatology.* 12, 184-191 (2005).

20) Kitta K, Ohnishi-Kameyama M, Moriyama T, Ogawa T, and Kawamoto S. Detection of low molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* (in press)

21) K. Shimakura, Y. Tonomura, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion. *Food Chem.* 91, 247-253 (2005)

22) 塩見一雄: 魚介類アレルギーの現状と表示の課題. *食品と開発* 40, 7-10 (2005)

久保友和、渡辺一彦、原 彰彦、清水 裕、佐伯宏樹: シロサケ卵中に含まれる主要アレルギーの探索. *北大水産彙報* 56, 55-59 (2005)

- 23) A. Kobayashi, H. Tanaka, Y. Hamada, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 61, 357-363 (2006)
- 24) 塩見一雄:水産物によるアレルギー. *食品工業* 49, 32-41 (2006)  
塩見一雄:魚貝類のアレルゲン. *アレルギー・免疫* (印刷中)
- 25) Y. Lu, T. Ohshima, H. Ushio, Y. Hamada and K. Shiomi: Immunological characteristics of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. *Food Chem.* (in press)
- 26) K. Motoyama, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem. Toxicol.* (in submission)
- 27) Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Aburatani K, Watanabe Y, Matsumoto T, Morishita N, H.Sato, Mishima T, Gamo R, Kihira Y, Maitani T, Interlaboratory evaluation of two kinds of ELISA kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods, *JAOAC*, in press
- 28) Tanabe S. and Nishimura T., Meat allergy, in "Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease", Eds. Shahidi F. and Mine Y., Marcel Dekker (New York), p.p. 481-491 (2005).

## 2.学会発表

- 1) 河村牧子、中島陽一、近藤康人、柘植郁哉、各務美智子、松山温子、徳田玲子、宇理須厚雄、山田一恵、浅野喜造;鶏卵アレルギーお加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法、第108回、日本小児科学会学術集会、東京、2005、4月。
- 2) 宇理須厚雄、平田典子、松山温子、各務美智子、徳田玲子、中島陽一、河村牧子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、木村 守、食物アレルギーの新しい治療の試み、第 17 回、日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005、6月。
- 3) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村 守、柳原行義、鳥居新平、加熱脱オボムコイド卵白を用いた免疫療法の末梢血単核球の IL-4・IL-13・IFN- $\gamma$  産生能への影響、第 17 回、日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005、6月。
- 4) 関亜希子、木村守、宇理須厚雄、卵白感作マウスに対する加熱脱オボムコイド卵白の影響、第 55 回、日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005、10月 20日、221日、22日、
- 5) 中島陽一、柘植郁哉、河村牧子、近藤康人、小松原亮 平田典子、各務美智子、宇理須厚雄;鶏卵アレルギー児におけるアレルゲン特異的 T 細胞応答のトランスクリプトーム解析、第 55 回 日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡 2005、10月
- 6) 柘植郁哉、中島陽一、河村牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、各務美智子、宇理須厚雄、Forkhead box p3(FOXP3) 遺伝子多型と食物アレルギーとの関連、第 55 回、日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005、10月。
- 7) 森下直樹、宮澤いづみ、奥村朋之、松本貴之、高畑能久、森松文毅第,モノクローナル抗体を用いたグリアジン検出ウエスタンブロットキットの開発,50回日本農芸化学会 (2006.3)
- 8) 森下直樹,新規複合抗原認識抗体を用いた加工食品中のアレルゲンの測定,第 10 回免疫化学測定法研究会学術シンポジウム (2005.11)
- 9) 森下直樹、宮澤いづみ、奥村朋之、松本貴之、高畑能久、森松文毅、桑原慶考、石田由加、入江勉、モノクローナル抗体を用いたアレルゲン検査用ウエスタンブロットキットの開発、第 90 回日本食品衛生学会 (2005.10)
- 10) 神奈川芳行、伊藤節子、太田裕、本庄勉、森松文毅、高畑能久、今村知明、店頭販売品に含まれるアレルギー物質含有調査結果、第 55 回日本アレルギー学会 (2005.10)
- 11) 神奈川芳行、伊藤節子、明石真美、太田裕、本庄勉、森松文毅、高畑能久、今村知明、店頭販売品に含まれるアレルギー物質含有調査結果(第 2 報)、第 42 回日本小児アレルギー学会 (2005.11)
- 12) 油谷賢一・渡邊由美子、渡邊恵理子、本庄勉、橋爪秀一、渡邊敬浩・穠山浩、松田りえ子、米谷民雄、佐藤秀隆、高回収率を可能とした特定原材料測定キット(ELISA 法)の応用例、第 89 回日本食品衛生学会学術講演会
- 13) 油谷賢一、加工食品における前処理法と特定原材料の測定、免疫化学測定法研究会第10回(2005年)
- 14) Eriko Watanabe, Yumiko Watanabe,

Kenichi Aburatani, Masahiro Shoji, Tsutomu Honjoh, Shuichi Hashizume, Hema Shah, 2005.9.11-15, 119<sup>th</sup> AOAC Annual Meeting & Exposition. Novel ELISA System For Detecting Milk Protein (B-Lactoglobulin).

15) Yumiko Watanabe, Eriko Watanabe, Kenichi Aburatani, Masahiro Shoji, Tsutomu Honjoh, Shuichi Hashizume, Hema Shah, 2005.9.11-15, 119<sup>th</sup> AOAC Annual Meeting & Exposition Novel ELISA System for Detecting Wheat Protein,

16) Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Maitani T, Gamo R, Kihira Y, Honjoh T, Takahata Y, Sato Y. Preparation and specification of the calibration standards for the test kits for 5 allergenic foods. 119<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.

17) Akiyama H, Matsuda R, Maitani T. Issues and challenges of Japan NIHS validation protocols. 119<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.

18) Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Maitani T, Preparation and Specification of the Calibration Standards for the Test Kits for 5 Allergenic Foods. 119<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.

19) Watanabe T, Akiyama H, Kikuchi H, Maitani T; A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis Hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. 119<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.

20) 元山かん奈、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: 数種甲殻類の主要アレルゲン(トロポミオシン)の一次構造特性. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月、東京)

21) 須磨洋太、濱田友貴、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: アメリカンロブスターの速筋および遅筋に含まれるトロポミオシンのアレルゲン性評価. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月、東京)

22) 金森真紀、濱田友貴、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: 魚類アレルゲンのイムノプロット分析. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月、東京)

23) 小林綾子、濱田友貴、田中洋行、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: 魚類普通肉およ

び血合肉のアレルゲン性およびアレルゲンの比較. 平成17年度日本水産学会大会(2005年4月、東京)

24) 小林征洋、嶋倉邦嘉、石崎松一郎、長島裕二、塩見一雄: アニサキス新規16kDaアレルゲンのcDNAクローニングおよび大腸菌における発現. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(2005年6月、岡山)

25) 小林征洋、池田 薫、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: アニサキス新規アレルゲンDnaJ様タンパク質のcDNAクローニングおよび発現. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(2005年10月、盛岡)

26) 塩見一雄、元山かん奈、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二: 頭足類の主要アレルゲンとして同定されたトロポミオシンの一次構造解析. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(2005年10月、盛岡)

27) R.Matsuda, Y.Yoshioka, H.Akiyama, T.Maitani, R.Gamo, Y.Kihira, T.Honjoh, Y.Takahata, Y.Sato, Preparation and specification of the calibration standards for the test kits for 5 allergenic foods, 119<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition (USA)

28) H.Akiyama, R.Matsuda, T.Maitani, Issues and challenges of Japan NIHS validation protocols. 119<sup>th</sup> AOAC Annual meeting and exposition (USA)

29) 吉岡靖雄、穂山浩、庄司俊彦、滝田聖親、神田智正、松田りえ子、米谷民雄; プロシアニジンによる大腸炎発症予防効果とその作用メカニズムに関する検討; 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005年10月

30) 中野真孝、吉岡靖雄、穂山浩、庄司俊彦、神田智正、松田りえ子、滝田聖親、米谷民雄; リンゴ由来プロシアニジンによる大腸炎発症予防効果に関する検討; 第49回日本薬学会関東支部、東京、2005年10月

31) Tanabe S, Nakaguma Y, Takahata Y, Morimatsu F, and Nishimura T. Phosphoglucosyltransferase as a novel major meat allergen, 51st International Congress of Meat Science and Technology (Baltimore), Abstract p. 92., August 7-12, 2005.

#### H.知的財産権の出願・登録状況

1、特願2006-45187号

(発明の名称:試料中の鶏由来成分の検出方法)

2. 特願 2006-004982 号

(発明の名称 エビ検出用プライマーセット)

3. 特願2006-83585号

(発明の名称 キウイフルーツ検出用プライマー  
セット)

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究

分担研究報告書

### 甲殻類・ナッツ類の交差抗原性とエビ・カニの食品表示の方法の検討

分担研究者	宇理須厚雄	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
研究協力者	近藤康人	藤田保健衛生大学医学部小児科
	塩見一雄	東京海洋大学海洋食品科学科
	藤澤隆夫	国立病院機構三重病院小児科
	徳田玲子	国立病院機構三重病院小児科
	海老澤元宏	国立病院機構相模原病院臨床研究センターアレルギー性疾患研究部
	富川盛光	国立病院機構相模原病院小児科
	伊藤浩明	あいち小児保健医療総合センターアレルギー科
	堀口逸子	順天堂大学医学部公衆衛生学教室

研究要旨:甲殻類・ナッツ類の交差抗原性の検討を患者血清を用いて検討した。エビに対して過敏症状を有する患者とエビに対して特異的 IgE 抗体陽性の患者からの血清 (n=87) を用い、甲殻類から抽出した抗原 (13 種類) とブラウンシュリンプ由来リコンビナントトロポミオシンに対する IgE 抗体価を比較し相関性を検討した。十脚目甲殻類だけではなく十脚目以外の甲殻類を含めても、いずれの組み合わせでも IgE 抗体の相関係数は 0.83 以上あり、極めて高い相関性がみられた。またトロポミオシンと甲殻類との組み合わせで IgE 抗体の相関係数は 0.83 以上と極めて高く、十脚目に限らず十脚目以外の甲殻類においてもトロポミオシンが主要なアレルゲンであることを裏付けられた。非加熱エビから抽出した抗原は従来の加熱エビから抽出したものに比べ若干多くのエビ特異的抗原を有していた。またエビに対して過敏症状陽性群と過敏症状を起こさずエビが食べられるエビ過敏症状陰性群での IgE 抗体価の比較では両者間に有意な差がなく、今後エビ IgE 抗体価測定の意味について更なる検討が必要と思われた。

ピーナッツなどナッツ類に関しては、ピーナッツアレルギー患児 14 名とナッツ類アレルギー 6 例について、臨床的及び血清学的な交差抗原性を評価した。ナッツ類アレルギーの 5 例はクルミアレルギーであった。アレルギー症状を認める症例では、ピーナッツと各ナッツ類の IgE 抗体価に相関関係を認めず、ナッツ類アレルギーでは比較的固有のアレルゲン成分を認識する事が推測された。一方、摂取時の誘発症状を認めないピーナッツ IgE 抗体陽性血清は、ピーナッツ IgE 抗体価が他のナッツ類に強い相関を示し、共通した成分を認識していることが示唆された。そのひとつとして、植物間に共通して含まれる多糖体構造 Cross-reactive Carbohydrate Determinant (CCD) を認識する IgE 抗体の存在が確認された。

カニ・エビ食品表示のためのエビアレルギー患者あるいはその保護者を対象としたアンケート調査を実施し、現在、質問紙の回収を終了し集計中である。

#### A. 研究目的

食物アレルギーの実態調査では、特定原材料に準ずるものの中でエビは食物アレルギー惹起食品順位でも5位に入り義務品目と同等の発症件数である。さらに、アナフィラキシーショックのような重篤な症状の発症件数も義務品目に次ぐ6位の位置にあ

る。このような背景から、エビアレルギー患者の食の安全・安心のために、エビを特定原材料とすることを視野に入れた早急な対策が必要とされている。

甲殻類は大きくエビ類、カニ類、ヤドカリ類など十脚目とそれ以外の甲殻類に分類される。後者の中で食用とされる甲殻類にはシャコ類(口脚目)、オ



キアミ類(オキアミ目)、アミ類(アミ目)、フジツボ類(顎脚目)などがある。エビをアレルゲン物質食品表示の対象とする場合、これらの甲殻類の間の交差抗原性の程度を明らかにすることが重要である。

本研究では、甲殻類にアレルギー症状を来す患者および甲殻類に対して特異的 IgE が高値を示す患者血清を用いて、種々の食用甲殻類間の交差抗原性を検討した。

また、表示を見る側およびつくる側それぞれにとって有効な表示方法を明らかにすることを目的に、エビ・カニアレルギー患者あるいはその保護者を対象に質問紙調査を行った。

ピーナッツアレルギーは、欧米のみならずわが国でもアナフィラキシーをはじめとする重篤なアレルギー症状を引き起こす重要な健康障害である。欧米からの報告によると、ピーナッツアレルギー患者の約20%は、他のナッツ類にもアレルギー症状を認めるとされる。本邦で平成13年4月から食品衛生法等の改正を行い制度化されたアレルゲン物質食品表示でもピーナッツは表示義務食品に指定され、クルミは表示奨励食品になっている。

しかし、ピーナッツはマメ科の属し、分類学上最も近縁種である大豆との交差反応を認める患者はごく稀であり、複数のナッツ類にアレルギー症状を認めるケースでも、それがアレルゲンの交差抗原性を介するものであるかどうかは十分に検討が行われていない。また、ナッツ類相互の交差抗原性についても、十分な情報がないのが現状である。

その結果、ピーナッツアレルギー・ナッツ類アレルギー患者の多くは、全てのナッツ類を除去する事が多い。しかも、単に摂取を制限しているだけでなく、微量のコンタミネーションでも重篤なアレルギー症状が起こるかもしれないという恐怖心を持って、日常の食生活を行っていることが現実である。

ピーナッツ特異的IgE抗体は、ピーナッツ摂取でアレルギー症状を認めない症例でもしばしば陽性となる。IgE抗体陽性だけを根拠にピーナッツ・ナッツ類アレルギーと判断されて、摂取制限のみならず食生活に対する恐怖感を持っている患者も多い。

本研究では、臨床的にピーナッツあるいはナッツ類アレルギーと診断された患者を対象に、臨床的な交差反応の有無及びIgE抗体価からみた交差抗原性を検討した。さらに、臨床症状を伴わないIgE抗体陽性者における血清学的な特徴を検討し、特に多植物アレルゲンに共通して含有される多糖体抗原 Cross-reactive Carbohydrate Determinant(CCD)

の関与について解析した。

## B.研究方法

### 1) 甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性:

血清は、甲殻類に対してアレルギーの既往をもつ患者と、甲殻類に対してIgE抗体が陽性を示す血清を使用した。患者血清数は87検体で、男59、女29、男女の記載なし1でうち3検体が採血時期の異なる重複検体であった。血清使用に当たり患者あるいは保護者から同意を取得した。

各抗原(ホッコクアカエビ(アマエビ)、大正エビ、ブラックタイガー、シバエビ、アカエビ(ムキエビ)、エビミックス(ホッコクアカエビ、ブラックタイガー、アカエビ(ムキエビ)のミックス)、タラバガニ、ケガニ、以上は非加熱の食品から、ホッコクアカエビ、ヨーロッパイチョウガニ、シャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテは加熱後の食品から抽出した)抽出とCAP支持体へ固相化はスウェーデンダイアグノスティック社へ依頼した。

大腸菌で作製したブラウンシュリンプのリコンビナントトロポミオシンも同様に固相化した。

### 2) ピーナッツおよびナッツ類間の交差抗原性;

ピーナッツによる明らかな即時型アレルギー反応が確認されている14名の患者血清(1-8歳、平均 $4.17 \pm 2.0$ 歳、以下ピーナッツアレルギー血清)、及び6名のナッツ類アレルギー患児(2-6歳、平均 $4.6 \pm 1.7$ 歳、以下ナッツ類アレルギー血清)を対象とした。対象者の一覧を、表1に示す。

また、ピーナッツIgE抗体陽性でアレルギー症状を有さない8例の患者血清(以下、無症状血清)を同時に検討した。

これらの患者血清を用いて、ピーナッツ、大豆、クルミ、カシューナッツ、ピスタチオ、栗、マカデミアナッツ、アーモンド、松の実に対する特異的IgE抗体をCAP-FEIAで測定し、抗体価の相関を検討した。

また、ピーナッツアレルギー血清と無症状血清各4検体について、CCDを含有する代表的な糖タンパクであるHorseradish peroxidase(HRP)及びパイナップル由来のBromelainに対する特異IgE抗体を、CAP-FEIAで測定した。さらに、ピーナッツIgE抗体に対して、HRPを用いたRAST inhibitionを行い、ピーナッツIgE抗体測定系におけるCCD認識抗体の存在を検討した。

### 3) カニ・エビ食品表示のための質問紙調査;

小児アレルギー学会会員(2942名)のところに受診したカニ・エビアレルギー患者あるいはその保護

者1名に対し、会員を通して質問紙を配布し、郵送にて回収した。調査項目は、エビ・カニの表示方法、それに対する意見、食品の購買行動などである。

### C. 研究結果

#### 1) 甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性:

図1に $R=0.95$ 以上の相関は濃い暖色で示し、 $0.91\sim 0.94$ のものは薄い暖色で示した。非加熱、加熱を問わず、各甲殻類に対するIgE抗体の相関は $0.83$ 以上あり高かった。しかし、今回新しく抽出した非加熱のものと従来の加熱後のものからの抗原の比較では、非加熱抗原は非加熱のものと相関が高く、加熱後の抗原は加熱後抗原との相関が強い傾向があった。つまり従来の加熱エビからの抗原に対するIgE抗体価は非加熱エビからの抗原に対するIgE抗体価より、加熱シャコ、加熱カニなど加熱甲殻類からの抗原に対するIgE抗体価の方が相関係数は高かった。これに対し非加熱エビからの抗原に対するIgE抗体価はいずれの非加熱エビ抗原に対するIgE抗体価との相関係数は $0.95$ 以上と高かった。

十脚目甲殻類同士だけではなく十脚目以外の甲殻類とも相関係数は $0.84$ 以上と非常に良い相関関係にあった。また、十脚目以外の甲殻類とトロポミオシンとは $0.96$ から $0.99$ という極めて良い相関係数を示した。これは、シャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテなどでもトロポミオシンが主要なアレルゲンである可能性を示唆している。

図2にトロポミオシンとエビミックス(ホッコクアカエビ、ブラックタイガー、アカエビ(ムキエビ)の非加熱抗原)に対するIgE抗体の比較を示す。相関は $0.89$ と高く、トロポミオシンは非加熱エビ抗原においても主要な抗原であることが示唆された。しかし、少数の患者はトロポミオシン以外のエビ抗原に対してIgE結合能を示していることも判明した。

エビ摂取で過敏症状陽性者のどのくらいがカニに対して過敏症状陽性なのかを主治医が記載した患者情報から検討した。両者に対して過敏症状が陽性のものは87例中11例だった。両者が陰性のものは3例で、多くの例がエビまたはカニどちらか一方のみが陽性で、もう一方は摂取をしていない、あるいは、たまたま実施した検査で甲殻類に対するIgEが高いことがわかり両方とも摂取していないものが多かった。エビ症状陽性でカニ症状陰性の患者は4例、その逆は1例見られた。つまり、エビアレルギー患者15例中11例(73.3%)がカニに対しても過敏症状を呈したことになる(図3)。

エビアレルギー症状の有無でエビ特異的IgE抗体価の差について検討した(図4)。両者間ではIgE抗体価に有意差は見られなかった。

これはどのエビ抗原での検討でも同じ結果であった。

年齢によるIgE抗体価と過敏症状の有無での検討では、高齢者で過敏症状陽性のものはIgE抗体が低いものが多かった(図5)。

#### 2) ピーナッツおよびナッツ類間の交差抗原性;

ピーナッツアレルギー患者のピーナッツ特異的IgE抗体価は、 $1.0\sim 100$  UA/mlであり、臨床症状もアナフィラキシー5例を含んで概ね重篤なものであった。他の豆類・ナッツ類にアレルギー症状が確認されている患者は大豆3例とクルミ1例であった。しかし、大豆による反応は、痒痒感や湿疹の悪化、摂取数時間後に観察された蕁麻疹など、軽微で非即時型の症状であった。

ナッツ類アレルギー6例中5例はクルミであり、残る1例もクルミ・アーモンド・カシューナッツを含むミックスナッツの摂取によるアレルギー症状の既往であった。1例は、松の実によるアナフィラキシーを合併していた。ピーナッツアレルギーを合併する症例は1例であった。

ピーナッツアレルギー血清及び無症状血清について、ピーナッツと他のナッツ類に対するIgE抗体価の相関を図6に示す。ピーナッツアレルギー血清は、他のナッツ類に対するIgE抗体が陰性又は低値であり、抗体価の相関は認めなかった。一方無症状血清では、ピーナッツIgE抗体価との相関係数が大豆 $r=0.982$ 、カシューナッツ $r=0.674$ 、ピスタチオ $r=0.829$ 、クリ $r=0.870$ 、マカデミアナッツ $r=0.610$ 、アーモンド $r=0.999$ と、強い相関を認めた。クルミ、松の実は、無症状血清でもピーナッツIgE抗体価と相関を認めなかった。

以上の結果より、ピーナッツアレルギー患者は、ピーナッツアレルゲンに特異的なエピトープを認識しているが、無症状血清はナッツ類に共通するエピトープを認識する事が示唆された。クルミ、松の実については、いずれの血清でも交差反応しない事が示唆された。

そこで、植物に共通して含まれる多糖体抗原CCDに対する抗体の存在を確認するために、ピーナッツアレルギー血清4例と無症状血清4例でHRP及びBromelainに対するIgE抗体を測定した(図7)。その結果、ピーナッツアレルギー血清では全例陰性であったのに対し、無症状血清はBromelainで全例陽性、

HRPでも3例で陽性であった。

ピーナッツIgE抗体測定系におけるCCDの関与を検討するために、上記の4検体を用いてピーナッツCAP-FEIAに対してHRPを用いたinhibitionを行った(図8)。その結果、ピーナッツアレルギー血清は1例も抑制が見られなかったのに対し、無症状血清では4例中2例で50%以上の抑制、1例で40%の抑制が認められた。

以上の結果から、ピーナッツアレルギー血清ではCCDを認識する抗体が検出されず、無症状血清の一部ではCCDを認識する抗体の存在がピーナッツIgE抗体の偽陽性をもたらしていると考えられた。

### 3)カニ・エビ食品表示のためのアンケート調査;

3月17日現在、質問紙を回収し、集計中である。

## D.考察

### 1)甲殻類に属する食用生物間の交差抗原性:

患者血清を用いた各甲殻類抗原に対するIgE抗体価の比較で、どの抗原間に対してもIgEの相関は高く各抗原間で共通した抗原を認識していると考えられた。また、今回非加熱エビから抗原の抽出を試みた。従来の加熱エビからのものと比較しても、相関係数は高く両者には差がないと思われたが、従来の加熱エビが非加熱のエビに対するIgEの相関よりも加熱カニ、加熱シャコ、加熱オキアミに対するIgE相関の係数が高いのに比し、非加熱のものは非加熱のカニよりも各エビ抽出物に対するIgEの相関係数が高かった。よって非加熱の方が加熱のものよりエビ特異的な抗原を含んでいるものと思われた。これは、加熱エビと非加熱エビそれぞれのトロポミオシンに対する相関についての検討でもみられた。つまり、加熱の方はトロポミオシンとの相関がより高く、非加熱の方はトロポミオシン以外のエビ特異的抗原を若干多く含んでいることが推測された。

エビアレルギー症状とカニアレルギー症状における一致率に関して調べた結果は、ほとんどの患者がどちらか一方のアレルギー(症状またはIgE測定結果)を示した際にもう一方も避けていることが多いと分かった。エビとカニ両方にアレルギー症状を有している患者は80例中の11例で両方問題なく食べられる例が3例、エビのみが陽性が4例でカニのみアレルギー症状を有する例が1例あった。このことから、エビアレルギー患者の約7割はカニに対してもアレルギーであり、患者の多くは両者に対してアレルギー症状を有するが、一部の患者では一方のみの単独アレルギー

もあると考えられた。

十脚目以外の甲殻類はほとんどの患者が摂取経験がなく、エビアレルギー患者のどの位の患者が、これらの十脚目以外の甲殻類にアレルギーを呈するか検討できなかった。

エビアレルギー症状の有無で特異的IgE抗体価を比較したが、両者の抗体価に有意差は見られなかった。これはどのエビ抗原においても同じ結果であった。これに関して、今後RAST inhibitionを行い、IgE結合の特異性を検討したり、IgE以外の因子、例えばIgG4などの関与に関して好塩基球ヒスタミン遊離試験や、CD203を用いた好塩基球活性化の検討を行っていく予定である。またトロポミオシンのIgEエピトープによる差が症状の差を引き起こすのかどうかについても検討していく予定である。

最後に年齢別に症状陽性者と陰性者とのIgE抗体価の差を調べたが、高齢者の陽性者はIgE抗体価が低いものが多いことが分かった。

### 2)ピーナッツおよびナッツ類間の交差抗原性;

今回の対象患者は、あいち小児保健医療総合センターアレルギー科を受診した全患者から抽出したものであり、対象患者数が少ないとはいえわが国の小児におけるナッツ類アレルギーの頻度がある程度反映していると考えられる。

その点では、最も患者数の多い者はピーナッツであり、その患者数は当センターにおけるソバアレルギー患者の患者数と同等である。それに次いで多いのは、クルミアレルギーであった。これは、即時型食物アレルギーの全国調査において集計された患者数とも一致した傾向であり、わが国でピーナッツに次いで注目すべきナッツ類は、クルミであろうと結論づけられる。

ピーナッツアレルギー患者が他のナッツ類にもアレルギー症状を認める割合は、欧米からの報告と同様に約20%程度であり、ナッツ類アレルギーの交差反応性は比較的低いと考えられる。特にクルミに関しては、IgE抗体価が他のナッツ類と全く相関せず、アレルギー的な交差反応の存在は否定的である。

ピーナッツアレルギー患者のピーナッツ特異IgE抗体価は、最も近縁な豆類である大豆特異的IgE抗体価と相関しない。一方、無症状血清では高い相関が認められ、その共通抗原成分のひとつは、植物間に共通して存在する多糖体成分(CCD)であることが確認された。ピーナッツの主要アレルギー成分であるAra h1にも、CCDが存在することは確認されてお

り、今後、ナッツ類の交差抗原性を検討する際には、こうした成分の関与を考慮に入れた検討が重要であろう。

## E. 結論

甲殻類の間では、十脚目内だけではなく、十脚目以外の甲殻類とも高い相関性があることがわかった。これはトロポミオシンが共通した抗原であることが主な理由と思われた。今回新たに作製したエビミックスはこれまでの加熱抽出抗原より若干多くエビ特異抗原を含んでいることが示唆された。

ピーナッツ・ナッツ類アレルギー患者の IgE 抗体は、各ナッツに固有のアレルゲン成分を認識する事が示唆された。今後アレルゲン食品表示を検討する際には、ナッツ毎に固有のアレルゲン成分を研究対象とする事が望ましいと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kondo Y, Kakami M, Koyama H, Yasuda T, Nakajima Y, Kawamura M, Tokuda R, Tsuge I, Urisu A. IgE Cross-reactivity between Fish Roe (Salmon, Herring and Pollock) and Chicken Egg in Patients Anaphylactic to Salmon Roe. *Allergy International*.54:317-323, 2005.
- 2) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int Arch Allergy Immunol*,136,1,23-32.2005.
- 3) 宇理須厚雄; 食物アレルギー; 食物アレルギーの免疫療法、最新医学、新しい診断と治療の ABC、免疫4、26,167-173,2005.
- 4) 宇理須厚雄; 食物アレルギーに対する免疫療法: 経口減感作療法、感染・炎症・免疫、医薬の門社 35,2,167-169,2005.
- 5) 宇理須厚雄、低アレルゲン化療法、*Current Therapy*,23,11,50-54,2005.
- 6) Komei Ito, Masashi Morishita, Mihoko Ohshima, Tatsuo Sakamoto, Akira Tanaka,

Cross-reactive carbohydrate determinant contributes to the false positive IgE antibody to peanut, *Allergy International* 54,387-392,2005.

7) 伊藤浩明、ピーナッツアレルギーの臨床像と診断、*小児科* 46, 1008-1015, 2005.

## 2. 学会発表

- 1) 河村牧子、中島陽一、近藤康人、柘植郁哉、各務美智子、松山温子、徳田玲子、宇理須厚雄、山田一恵、浅野喜造; 鶏卵アレルギーお加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法、第108回、日本小児科学会学術集会、東京、2005、4月。
- 2) 宇理須厚雄、平田典子、松山温子、各務美智子、徳田玲子、中島陽一、河村牧子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、木村 守、食物アレルギーの新しい治療の試み、第17回、日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005、6月。
- 3) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村 守、柳原行義、鳥居新平、加熱脱オボムコイド卵白を用いた免疫療法の末梢血単核球の IL-4・IL-13・IFN- $\gamma$  産生能への影響、第17回、日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005、6月。
- 4) 関亜希子、木村守、宇理須厚雄、卵白感作マウスに対する加熱脱オボムコイド卵白の影響、第55回、日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005、10月20日、22日、22日、
- 5) 中島陽一、柘植郁哉、河村牧子、近藤康人、小松原亮 平田典子、各務美智子、宇理須厚雄; 鶏卵アレルギー児におけるアレルゲン特異的 T 細胞応答のトランスクリプトーム解析、第55回 日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡 2005、10月
- 6) 柘植郁哉、中島陽一、河村牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、各務美智子、宇理須厚雄、Forkhead box p3(FOXP3) 遺伝子多型と食物アレルギーとの関連、第55回、日本アレルギー学会総会、盛岡市、2005、10月。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし