

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 18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 19(2007)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・魚卵・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 ----- 13

2. 甲殻類 ELISA 検知法の開発および魚貝類アレルゲンの
特定・抗原交差性・一次構造解析

塩見 一雄 ----- 35

3. 豆類検知法の開発

穂山 浩 ----- 49

4. 果実類の検出法開発に関する研究

松田 りえ子 ----- 63

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 ----- 71

6. 甲殻類のアレルギー物質食品表示に関する提言

宇理須 厚雄 ----- 84

7. 食品衛生法 アレルギー物質を含む表示 特定原材料等への提案

海老澤 元宏 ----- 89

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 93

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、甲殻類・魚卵・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)

1) 甲殻類の交差抗原性

エビミックスならびにトロポミオシンと、他の甲殻類、トロポミオシン含有生物タンパク質との交差抗原性について患者血清 IgE に対する結合能で検討した。ヤケヒョウヒダニとは相関係数 0.23-0.25 で相関は見られなかった。ゴキブリとはそれぞれ相関係数 0.7、0.65 と弱い相関がみられ、アサリ、イカ、タコとは相関係数 0.7~0.88 で相関が見られた。また十脚目の「いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属するロブスターとイセエビについても同様に検討した結果、それぞれ相関係数 0.95、0.85 と高い相関が見られた。

2) 魚卵と魚肉との交差抗原性

イクラは魚卵間で共通抗原性をもち、サケとも部分的に共通抗原性を有する。その原因タンパク質として β' コンポーネントが考えられた。一方鶏卵とは共通抗原性を示唆するデータは得られなかった。

3) ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性

ナッツ類のアレルギーでは、臨床的・血清学的に交差抗原性をもつ組み合わせは限られており、ナッツ類全般に及ぶ交差抗原性は認められなかった。

4) 食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

Web サイトを利用して、食物アレルギーと自覚する主として成人の実態について、その生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向などに関する調査を行った。その結果、日常生活において何らかの支障があることがわかった。アレルギー表示の施行により、ある程度健康危機回避ができていていることが伺えた。正確な知識は未だ十分とはいえない状況であった。アレルゲンは、特定原材料等は上位38項目内に含まれていたが、多岐にわたる食品があがっており、食生活のバリエーションが広いことがわかった。表示方法では、一括表記の欄外に別途表記する方法が最も多く望まれていた。

2、甲殻類 ELISA 検知法の開発および魚貝類アレルゲンの特定・抗原交差性・一次構造解析 (塩見)

1) 甲殻類 ELISA 検知法

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を利用したサンドイッチ ELISA 法に基づく 2 種類の甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」)を開発した。各種食品で検討したところ、両キットとも甲殻類特異的で、加工食品にも適用できることが認められた。さらに甲殻類標準粉末を添加した 5 種類のモデル食品を用いた外部 10 機関によるバリデーションにおいても、両キットとも厚生労働省通知の基準(回収率 50-150%、室間精度 25%以下)を満たしていることが確認された。

2) 貝類のアレルゲン

11 種貝類(クロアワビ、サザエ、エゾボラ、エゾバイ、アカガイ、マガキ、トリガイ、ウバガイ、ミルクイ、マテガイ、アサリ)の主要アレルゲンは共通してトロポミオシンであることを確認するとともに、貝類トロポミオシンは貝類間のみならず甲殻類および頭足類のトロポミオシンと抗原交差性を示すことを明らかにした。平成 17 年度の成果と合わせてエゾバイを除く 10 種貝類のトロポミオシンの全アミノ酸配列を cDNA クローニングにより決定し、アミノ配列相同性は目(または科)レベルでのみ高いことを示した。

3) 魚卵の検知法

魚卵の主要な卵黄タンパク質は、リポビテリン(Lv)、フォスピチン(Pv)および β' コンポーネント(β)である。本試験では、魚卵検知法の対象タンパク質として β の利用可能性を検討した。その結果、イクラを含むサケ科魚卵、スケトウダラ卵(タラコ)、カペリン(輸入シシャモ)卵については、抗 β -ウサギポリクローナル抗体(α - β)と β の組み合わせでの検知法開発が妥当と判断した。

3、豆類検知法の開発 (稲山)

1) ダイズ ELISA 検知法

抽出液を改良することで、以前と同等の感度ならびに特異性を有しながら、肉類モデル加工食品への反応性を向上する

ことができた。

2) クルミ ELISA 検知法

160 品目におよぶ食品原材料と交差反応性を示さないことから、本測定法はクルミ特異的に測定可能であることが示唆された。プレのモデル加工食品での検討では通知(食安発 第 0622003 号)の規格(50~150%)におさまり良好であった。今後、標準品に用いている物と同一の処理を施したクルミ(脱脂処理したクルミ)を添加したモデル加工食品を作製し検証を行っていく。

3) ダイズ PCR 検知法

供試した市販およびモデル加工食品には焙煎、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。また、本研究で開発された PCR 法は市販の ELISA キットより高い感度で大豆を検出することが可能であった。

4) クルミ PCR 検知法

matK 遺伝子を標的にした PCR で食用のクルミ科ナッツの検出方法の開発に成功した。さらに、ピーカンナッツ matK 遺伝子を同定し、その遺伝子配列中の制限酵素部位を利用することで、クルミとピーカンナッツの分別法を確立した。供試したモデル加工食品には焙煎、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クルミ検知法として適用可能であることが示唆された。

5) エビ PCR 検知法

試験したエビ 12 種全てにおいて、2.5 pg の DNA から標的とした約 200bp の PCR 産物が得られた。また、クルマエビ蛋白質 10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する 5 種類すべての擬似混入試料からも、標的 PCR 産物が得られた。一方、試験したカニ 9 種と他の甲殻類 3 種のうち、上海ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニの 3 種からも、エビと同様に標的 PCR 産物が得られた。得られた PCR 産物を、エビに特徴的な配列を認識して切断する制限酵素で消化した結果、ダンジネスクラブとワタリガニ由来の PCR 産物は切断されず、上海ガニ由来の PCR 産物だけが、エビ由来産物と同様に切断された。

4. 果実類の検出法開発に関する研究 (松田)

1) キウイフルーツ定量検知法

① 生アクチニジンを認識するモノクローナル抗体を用いて、キウイフルーツのみ検出、あるいは同属のサルナシも検出可能なサンドイッチ ELISA ならびにイムノクロマトキットを構築した。構築したサンドイッチ ELISA およびイムノクロマトキットには 19 種類の食品、18 種類の果物で交差性が認められなかった。加熱による検出率の影響を確認したところ、63℃・30 分で 60%、80℃・30 分で 20%、100℃・30 分で 5%の検出率となり、加工食品の検知法としては適していないものと考えられた。加工食品検査用として、新たに変性アクチニジンを認識するモノクローナル抗体 18 種類確立し、サンドイッチ ELISA 系で 63 通りの有効な組み合わせが得られた。

② キウイフルーツ標準品の作製方法としては、アクチニジンがプロテアーゼであるため、抽出時のタンパク質の分解を防ぐには高濃度のプロテインインヒビターの添加、あるいは加熱処理が有効であった。

2) キウイフルーツ PCR 検知法

平成17年度までに開発してきたキウイフルーツ PCR 検知法が、擬似混入ヨーグルト中のキウイフルーツタンパク質 10 ppm(w/w)相当の未加熱キウイフルーツや、実際に市販されている製品中のキウイフルーツやサルナシを検出できる性能を有することを確認できた。今後は、バリデーション用の擬似混入試料を複数作製して、同キウイフルーツ PCR 検知法のバリデーションを進める。

3) バナナ抗原精製

バナナ検出ターゲット分子として 33-35 kDa のキチナーゼを精製するとともに、その IgE 結合性を確認した。

5. 食肉に含まれるアレルギー物質の検査法開発研究 (田辺)

1) 鶏肉、豚肉、牛肉 ELISA

ターゲットとして鶏肉では鶏トロポニン T および鶏肉抽出物を、豚肉では豚アルブミンおよび豚ミオグロビンを、牛肉では牛ミオグロビンおよびその部分ペプチドを選択し、それらを動物に免疫し、抗体作製を行った。得られた抗体価はいずれも高くなかったが、特に豚肉検出系においては発光基質を用いることにより感度が向上した。今後ポリクローナル・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と考えられた。

2) ゼラチン ELISA

畜肉ゼラチンとは反応するが、サカナゼラチンとは反応しない ELISA 系の開発に成功した。また、確認法としてウェスタンブロット法も開発した。

3) 豚肉、牛肉 PCR

豚肉および牛肉に含まれる DNA を検出するための PCR 系を確立し、高い特異性を有していることを明らかにした。豚肉については、モデル加工食品での検出系が 100ppb であり、極めて高感度であることから、本系の有用性が示された。

分担研究者

梶山 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

食物を食べて何らかの症状をきたした場合に、その人は食物アレルギーと自己診断をする。症状が重篤でない場合、また成人の場合は、食生活の自己管理がある程度可能であるため、医療機関において確定診断を受けないことも多いと思われる。しかし、自己診断であれ、食物アレルギーと自覚する人々は、食品によって過去なんらかの健康被害を受け、そして、アレルギー表示を利用し食生活の自己管理を行っていると思われる。

今回は、食物アレルギーと自覚している成人に対して、生活やアレルゲン(と思っているもの)、表示に関する知識などを明らかにすることを目的とし、Webサイトを利用した調査を実施した。

A.研究目的

1、甲殻類・魚卵・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)

1) 甲殻類の交差抗原性の検討

エビと甲殻類以外の(クモ綱ダニ目のヤケヒョウヒダニ、昆虫綱ゴキブリ目のゴキブリ、頭足綱(タコ、イカ)、二枚貝綱(アサリ))との交差反応性について検討した。

また現行のアレルギー物質食品表示の対象となっていない「7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属する十脚目のロブスター(ザリガニ目)とイセエビ(イセエビ目)との IgE 結合能との相関性について検討した。

2) 魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラの交差反応性の原因について、鶏卵および魚卵、サケ魚肉などと RAST による IgE 抗体の相関および ELISA inhibition を行い検討した。

3) ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

ナッツ類のアレルギー患者は、他のナッツに対する交差反応を懸念して、あらゆる種類のナッツ類を除去している場合が多い。

本研究では、ピーナッツに限らず他のナッツアレルギー患者を含めて、ナッツ類アレルギー患者における臨床的・血清学的な交差反応性を、多くのナッツ・豆類にわたって網羅的に検討することを目的とした。

4) 食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

2、甲殻類 ELISA 検知法の開発および魚貝類アレルゲンの特定・抗原交差性・一次構造解析(塩見)

サンドイッチ ELISA 法に基づいて開発した 2 種類の甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」)について、その特異性を確認するとともに、外部機関による性能評価を行うことを目的とした。

軟体動物(イカ、アワビ)検知法に関しては、その基本情報として知見が乏しい各種貝類トロポミオシンの抗原交差性と一次構造解析を目指した。魚卵(イクラ)検知法については、主要な卵黄タンパク質に対するポリクローナル抗体の反応性および患者血中 IgE と各種魚類の卵黄タンパク質との反応性を明らかにし、最適な検出系を決めることを目的とした。

3、豆類検知法の開発(梶山)

ダイズ及びクルミの ELISA 法の開発の検討と、ダイズ、クルミ及びエビの遺伝子増幅法(PCR 法)についての確立を行った。またアレルゲンの新規簡易法の検討についても実施した。

4、果実類の検出法開発に関する研究(松田)

表示が推奨されている 20 品目に含まれる果実類のキウイフルーツ及びバナナの検知法の開発を目的とした。

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)

食肉類、即ち、鶏肉、豚肉、牛肉、ゼラチンに関して ELISA 系の構築を試みた。また、遺伝子増幅法(PCR法)について、昨年度設計したプライマーをもとに、豚肉および牛肉測定系の確立を試みた。

B. 研究方法

1、甲殻類・魚卵・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)

1) 甲殻類の交差抗原性の検討

今回使用した血清は平成 17 年度の本研究と同じ検体を使用した。つまり甲殻類に対してアレルギー既往を持つ患者及び甲殻類に対して IgE 抗体を有する患者血清 87 検体である。

2) 魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラ摂取によりアナフィラキシーを生じた患者 A と B とコントロールとしてイクラ特異的 IgE 抗体の高い魚アレルギー患者 C の血清を用いた。交差抗原性は ELISA inhibition で検討した。

また、魚、魚卵及び鶏卵アレルギーで受診した患者(n=27)の血清を用いて、各抗原に対す特異的 IgE 抗体を RAST で測定し、その値を比較した。

3) ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

ピーナッツを含めてその他のナッツ類にアレルギー症状が疑われた患者を複数の施設から集積し、ナッツ類及び豆類に対する IgE 抗体価を、CAP-FEIA 法を用いて網羅的に測定した。

測定を行った項目は、次の通りである。

ピーナッツ、大豆、アーモンド、ハシバミ、ココナッツ、インゲン、カカオ、エンドウ、ブラジルナッツ、クルミ、ゴマ、カシューナッツ、ピスタチオ、マカダミアナッツ、クリ、松の実、ペカン、MUXF3(ブロメライン由来のオリゴ糖で、Cross-reactive Carbohydrate Determinant を代表する)

全種類のナッツを測定できた 42 検体について、IgE 抗体価の相関係数を算出した。

4) 食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

調査は、全て Web サイトを利用した。この Web サイトは、Yahoo リサーチ(登録モニター数約 53 万人)を利用した。

①生活状況等調査

Yahoo リサーチモニター約 2 万人に対して「えび」「かに」によるアレルギー症状の有無を聞き、回答が得られた者のうち 20 歳台から 30 歳台の男女約 10 名を抽出し、オンラインによる 3 日間のディスカッションを実施した。

②アレルゲンと表示に関する知識

Yahoo モニターのうち 16 歳以上 50 歳台で食物アレルギーがあると自覚している約 3000 人を対象サンプルとして抽出し、そのうち回答のあった約 2256 名について分析を行った。

アレルゲンについては特定原材料等について、そして別途「その他」として自由項目にて複数回答を求めた。

アレルギー表示では、代替表記や省略表記そして特定加工食品などが認められている。どの程度、認知できるのか、○×形式で回答を求めた。

③好ましいアレルギー表示方法について

②の調査において食物アレルギーがあると自覚しているとして抽出できた者に対して、調査を実施し、回答の得られた 1848 名を対象に分析を行った。

表記の方法は厚生労働省アレルギーパンフレットを参考に、ポテトサラダについて 4 種類を示した。また、表示についての理解がどの程度がわからないため、特定原材料等及び代替表記や省略表記について説明した上で、選択してもらった。

2、甲殻類 ELISA 検知法の開発および魚貝類アレルゲンの特定・抗原交差性・一次構造解析(塩見)

1) 甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」)の性能

2) 甲殻類検知キット(甲殻類キット「マルハ」)の性能

3) 甲殻類検知キットのバリデーション

試験室:以下の 10 機関により試験室間バリデーションを実施した。

① 株式会社日清製粉グループ本社 R&D・品質管理本部 QE センター

- ② 株式会社ファスマック遺伝子検査事業部
- ③ 東京都健康安全研究センター食品化学部
食品成分研究科中毒化学研究室
- ④ 財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験
センター微生物試験課
- ⑤ 株式会社ニッポンジーン研究試薬部開発課
製品開発グループ
- ⑥ 昭和産業株式会社総合研究所分析センタ
ー
- ⑦ 財団法人食品環境検査協会東京事業所
- ⑧ 財団法人日本食品分析センター千歳研究
所生物科学課
- ⑨ ロート製薬株式会社製品開発部技術研究グ
ループ
- ⑩ 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社品質保証部
検査課

- 4) 貝類のアレルゲン分析
- 5) 魚卵のアレルゲン分析

3、豆類検知法の開発(穂山)

- 1) ダイズ ELISA 検知法の開発の検討
- 2) クルミ ELISA 検知法開発の検討
- 3) ダイズ PCR 検知法の開発の検討
- 4) クルミ PCR 検知法の開発の検討
- 5) エビ PCR 検知法の開発の検討

4、果実類の検出法開発に関する研究(松田)

- 1) キウイフルーツ定量検知法
- 2) キウイフルーツ定性検知法

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)

- 1) 鶏肉 ELISA
- 2) 豚肉 ELISA
- 3) 牛肉 ELISA
- 4) 豚肉 PCR
- 5) 牛肉 PCR

C、結果・考察・結論

1、甲殻類・魚卵・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)

1) 甲殻類の交差抗原性の検討

エビミックスやリコンビナントトロポミオシンは昆
虫類や、頭足類(タコ、イカ)、二枚貝類(アサリ)
に対しても IgE 抗体に対する結合能において相関

がみられた。これらの相関はこれらの抗原に含ま
れるトロポミオシンによるものと考えられた。ダニと
の相関はみられなかった。

「7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属
する十脚目であるロブスターやイセエビに対して
高い相関性がみられ、これらの交差抗原性にお
いてもトロポミオシンの重要性が示唆された。

2) 魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラは魚卵間で共通抗原性をもち、サケとも部
分的に共通抗原性を有する。それに関与するタン
パク質として β' コンポーネントが考えられた。一
方、鶏卵とはいずれの症例でも共通抗原性を示
唆するデータは得られなかった。

3) ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交反 応性の検討

ナッツ類アレルギーにおいて、カシューナッツと
ピスタチオ、クルミとペカンの間に強い交差抗原
性が示唆されたが、ピーナッツを含めてナッツ類
全体としては、臨床的・血清学的な交差抗原性は
認められなかった。

4) 食物アレルギーと自覚する主として成人の実 態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に 関する知識・意向-

1) 生活状況等調査

男性 20 歳台 1 名 30 歳代 3 名からなる 1 グル
ープと、女性 20 歳台 1 名 30 歳代 4 名からなる 1
グループの合計 2 グループがグループピングされ
た。

ラーメンなどの出汁によってもアレルギー症状
が惹起しており、重篤な人も見られた。健康危機
回避のためには、積極的に尋ねていたり、表示を
見てわからない場合には避けるなどがみられた。
また、男性はさまざまな意見・態度を示していた。
そのなかで、「患者として声をあげたほうがよいの
かもしれない」との意見が聞かれ、成人男性から
の声が今後多く聞かれることを望む。また「同じア
レルギーの人がいることがわかり安心した」との声
もあり、アレルギーの患者がお互いに情報交換な
どができる場が必要と思われた。

2) アレルゲンと表示に関する知識

全対象者のアレルゲンで最も多かったのは「さ
ば」で 21.1%、次いで「卵」20.3%「えび」15.2%
「かに」13.5%であった。上位 34 品目中に特定原
材料等がすべて含まれていた。

食物アレルギーとの確定診断を得られているかは不明であるが、食物アレルギーがあると自覚している者はその健康被害防止のためには食物回避を図っていた。アレルギー表示によって、ある程度の回避ができると思われた。また、さまざまな食品によって食物アレルギーと自覚できる症状を惹起していた。

「魚介類」との表現では「タコ」や「イカ」「エビ」について含まれるか否か正解率が 80%以下であった。またマーガリンについても同様の結果であった。オンラインディスカッションでも「魚介類」の表記に注意をしているとあった。今後この表記については注意が必要と思われた。

3) 好ましいアレルギー表示方法について

最も好ましいとされたのは、一括欄外に別途欄を設けて特定原材料等について表記をするものであった(62.7%)。次いで一括表示内に別途アレルギー物質として記載したもの(16.8%)、これまでの個別表記(16.6%)であった。

健康危機回避のためには表示方法の改善が望ましいと考えられた。

2. 甲殻類 ELISA 検知法の開発および魚貝類アレルゲンの特定・抗原交差性・一次構造解析(塩見)

1) 甲殻類 ELISA 検知キットの開発と性能評価:

ELISA 法に基づく 2 種類の甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」)を開発した。両キットとも甲殻類特異的で、外部機関によるバリデーションにおいても回収率、室間精度は良好であったので、加工食品における甲殻類の検知法として使用可能であると考えられた。

2) 貝類のアレルゲン:

貝類の主要アレルゲンはトロポミオシンで、甲殻類および頭足類トロポミオシンと抗原交差性を示すことを確認した。また、貝類トロポミオシンは、アミノ酸配列から目(または科)レベルのグループに分けられることを示した。

3) 魚卵のアレルゲン:

すべての魚卵に α - β と反応するタンパク質(β -like)が存在したが、その抗原性の強さは魚種によって異なっていた。一方、サケ科魚類の β -like はすべてのイクラアレルギー患者血清と反応したが、他の魚種では反応性に個人差が見られた。魚卵検知法の対象タンパク質の第一候補として

β の利用が妥当である。

3. 豆類検知法の開発(穂山)

1) ダイズ ELISA 検知法

抽出液を改良することで、以前と同等の感度、特異性を有しながら、肉類モデル加工食品への反応性を向上することができた。

2) クルミ ELISA 検知法

160 品目におよぶ食品原材料と交差反応性を示さないことから、本測定法はクルミ特異的に測定可能であることが示唆された。プレのモデル加工食品での検討では通知(食安発 第 0622003 号)の規格(50~150%)におさまり良好であった。今後、標準品に用いている物と同一の処理を施したクルミ(脱脂処理したクルミ)を添加したモデル加工食品を作製し検証を行っていく必要がある。

3) ダイズ PCR 検知法

供試した市販およびモデル加工食品には焙煎、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。また、本研究で開発された PCR 法は市販の ELISA キットより高い感度で大豆を検出することが可能であった。

4) クルミ PCR 検知法

我々は、matK 遺伝子を標的にした PCR で食用のクルミ科ナッツの検出方法の開発に成功した。さらに、ピーカンナッツ matK 遺伝子を同定し、その遺伝子配列中の制限酵素部位を利用することで、クルミとピーカンナッツの分別法を確立した。供試したモデル加工食品には焙煎、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クルミ検知法として適用可能であることが示唆された。

5) エビ PCR 検知法

クルマエビ蛋白質 10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する 5 種類の擬似混入試料を検知できたことから、同法がエビの確定試験法に必要な感度を有することを確認できた。特異性については、試験した 12 種類のエビすべてを検知できて、アミ、オキアミ、シャコや大多数のカニは検知しなかったが、上海ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニだけは偽陽性検出してしまうことが確認された。このうち上海ガニだけは、制限酵素処理によっても、エビとは区別できずに偽陽性となることが確認された。高級カニとして珍重される上海ガ

ニが加工食品に混入するリスクは比較的小さいと考えられるため、同法は、確定試験に必要なエビ特異性を有するものと考えている。以上、平成 19 年度に予定している同検知法のバリデーション準備を整えることができたため、今後は、エビ PCR 検知法のバリデーションを行なうとともに、カニだけを検知する PCR 法、またはエビとカニを一括して検知する PCR 法の開発を進める。

4、の検出法開発に関する研究(松田)

1) キウイフルーツ定量検知法

N-ACT 認識 MAb を用いて、キウイフルーツのみ検出、あるいは同属のサルナシも検出可能なサンドイッチ ELISA ならびにイムノクロマトキットを構築した。構築したサンドイッチ ELISA およびイムノクロマトキットには 19 種類の食品、18 種類の果物で交差性が認められなかった。

加熱による検出率の影響を確認したところ、63℃・30 分で 60%、80℃・30 分で 20%、100℃・30 分で 5%の検出率となり、加工食品の検知法としては適していないものと考えられた。

加工食品検査用として、新たに D-ACT 認識 MAb を 18 種類確立し、サンドイッチ ELISA 系で 63 通りの有効な組み合わせが得られた。

キウイフルーツ標準品の作製方法としては、アクチニジンがプロテアーゼであるため、抽出時のタンパク質の分解を防ぐには高濃度のプロテインインヒビターの添加、あるいは加熱処理が有効であった。

2、キウイフルーツPCR検知法

平成17年度までに開発してきたキウイフルーツPCR検知法が、疑似混入ヨーグルト中のキウイフルーツタンパク質10 ppm(w/w)相当の未加熱キウイフルーツや、実際に市販されている製品中のキウイフルーツやサルナシを検知できる性能を有することを確認できた。今後は、バリデーション用の疑似混入試料を複数作製して、同キウイフルーツPCR検知法のバリデーションを進める。

3、バナナ抗原精製

バナナ検知ターゲット分子として 33-35 kDa のキチナーゼを精製するとともに、その IgE 結合性を確認した。

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)

鶏肉、豚肉、牛肉 ELISA

ターゲットとして鶏肉では鶏トロポニンTおよび鶏肉抽出物を、豚肉では豚アルブミンおよび豚ミオグロビンを、牛肉では牛ミオグロビンおよびその部分ペプチドを選択し、それらを動物に免疫し、抗体作製を行った。得られた抗体価はいずれも高くなかったが、特に豚肉検出系においては発光基質を用いることにより感度が向上した。今後ポリクローナル・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。

ゼラチン ELISA

畜肉ゼラチンとは反応するが、サカナゼラチンとは反応しない ELISA 系の開発に成功した。また、確認法としてウエスタンブロット法の開発にも成功した。

豚肉、牛肉 PCR

豚肉および牛肉に含まれる DNA を検出するための PCR 系を確立し、高い特異性を有していることを明らかにした。豚肉については、モデル加工食品での検出系が 100ppb であり、極めて高感度であることから、本系の有用性が示された。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1.論文発表

1) Koyama H, Kakami M, Kawamura M, Tokuda R, Kondo Y, Tsugel, Yamada K, Yasuda T, Urisu A; Grades of 43 Fish Species in Japan Based on IgE-binding Activity Allergology International.55,311-316,2006.

Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Moriyama T, Urisu A, Maitani TA, A Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction, Biosci Biotechnol Biochem,2006 71, 269-272, 2007.

2) Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Yamada K, Urisu A. Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy:

Simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Clin Exp Allergy*. 36:1538-45. 2006.

3) 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.

4) Kondo Y, Komatsubara R, Nakajima Y, Yasuda T, Kakami M, Tsuge I, Urisu A. Parvalbumin is not responsible for cross-reactivity between tuna and marlin: A case report. *J Allergy Clin Immunol*. 118:1382-1383.2006.

5) K. Motoyama, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem. Toxicol*. 44, 1997-2002, 2006.

6) 山口詢子、猪又直子、広門未知子、嶋倉邦嘉、塩見一雄、池澤善郎:シーフードによる職業性の接触蕁麻疹と口腔アレルギー症候群の1例. *アレルギー* 56, 49-53, 2007.

7) Y. Lu, T. Ohshima, H. Ushio, Y. Hamada and K. Shiomi: Immunological characteristics of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. *Food Chem*. 100, 1093-1099, 2007.

8) Y. Kobayashi, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi: Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* (in press)

9) K. Motoyama, Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. *J. Agric. Food Chem.* (in press)

10) Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y. Lu, H. Ushio and K. Shiomi: Comparative analysis of

barnacle tropomyosin: divergence from decapod tropomyosins and role as a potential allergen. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* (in press)

11) K. Motoyama, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Allergenicity and allergens of amphipods, crustaceans belonging to the order Amphipoda, mixing in nori (dried laver). *Food Addit. Contam.* (in press)

12) 柴原裕亮、岡道弘、富永桂、猪井俊敬、梅田衛、畝尾規子、阿部晃久、大橋英治、潮秀樹、塩見一雄:サンドイッチ ELISA法を用いた食品中の甲殻類アレルギーの検出. *食科工* (投稿中)

12) Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Soheila Maleki, Hirohito Yamakawa, Ken Iijima, Fuminori Yamazaki, Takashi Matsumoto, Satoshi Futo, Fumihito Arakawa, Masatoshi Watai, and Tamio Maitani, A Specific Qualitative Detection Method for Peanut (*Arachis hypogaea*) in Foods using Polymerase Chain Reaction, *J Food Biochemistry*, **30**, 215-233, 2006.

13) 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 Allergy Immunology*, **140**, 36-42, 2006.

14) 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イムノクロマトキットの評価” *食品衛生学雑誌*, **47**, 66-75, 2006.

15) Kazumi Kitta, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Tetsuya Moriyama, Tadashi Ogawa, and Shinichi Kawamoto. Detection of low molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem.*, **351**, 290-297, 2006.

16) Hirohito Yamakawa, Hiroshi Akiyama, Yumi Endo, Kiyoko Miyatake, Kozue Sakata, Shinobu Sakai, Tatsuya Moriyama, Atsuo Urisu, and Tamio Maitani A Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 269-272, 2007.

17) 穂山浩、佐伯宏樹、渡辺一彦、宇理須厚雄、食物アレルギー(ピーナッツ、魚卵)、臨床免疫・アレルギー科、食物アレルギー、**46**, 588-595, 2006.

18) Takeo Yano, Yumiko Sakai, Kohji Uchida, Yoshiki Nakao, Kimie Ishihata, Shigeru Nakano, Toshihiro Yamada, Shinobu Sakai, Atsuo Urisu, Hiroshi Akiyama, and Tamio Maitani Detection of Walnuts Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction (submitted)

19) R. Matsuda, Y. Yoshioka, H. Akiyama, K. Aburatani, Y. Watanabe, T. Matsumoto, N. Morishita, H. Sato, T. Mishima, R. Gamo, Y. Kihira, and T. Maitani. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. *JAOC*, **89**, 1600-1608, 2006.

20) H. Taguchi, S. Watanabe, T. Hirao, H. Akiyama, S. Sakai, T. Watanabe, R. Matsuda, A. Urisu, and T. Maitani. Specific Detection of Potentially Allergenic Kiwifruit in Foods Using Polymerase Chain Reaction, *J. Agric. Food Chem.*, in press.

21) Tanabe S., Miyauchi E., Muneshige A., Mio K., Sato C., and Sato M. PCR Method of Detecting Pork in Foods for Verification of Allergen Labeling and for Identification of Hidden Pork Ingredient in Processed Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press, 2007.

22) Tanabe S. Epitope peptides and immunotherapy. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **8**, 109-118, 2007.

23) Kobayashi S., and Tanabe S. Evaluation of the anti-allergic activity of Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen, *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 511-515, 2006.

24) 渡辺純、田辺創一. アレルギー対応食品の開発, , 化学と生物, 45, 3, 152-160, 2007.

25) 田辺創一. 食物アレルギーとアレルギー対応食品, アレルギーの臨床, 26, 6, 445-449, 2006.

2.学会発表

1) Urisu A, Nakajima Y, Komatsubara R, Hirata N, Kawamura M, Matsuyama H, Kakami M, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Kimura M, Seki Aoral immunotherapy by heated and ovomucoid-depleted egg white to children with hen's egg hypersensitivity, X X V Congress of the European Academy of allergology and Clinical Immunology, 2006.Vienna, Austria, 10-14 June

2) Nakajima,Y 、 Tsuge,I 、 Komatsubara,R 、 Hirata,N 、 Kawamura,M 、 Kakami,M 、 Matsuyama,H、Kondo,Y、Urisu,A : Transcriptome analysis of allergen specific T cells in hen's egg allergy, X X V Congress of the European Academy of allergology and Clinical Immunology、2006.Vienna、Austria、10-14 June

3) 江本 愛、石崎松一郎、長島裕二、嶋倉邦嘉、塩見一雄: 貝類トロポミオシンのアレルギー性評価および一次構造解析. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)

4) 小林征洋、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ギーの同定および組換えアレルギーのIgE結合能. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)

5) 小林征洋、池田 薫、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: アニサキス主要アレルギーAni s 1のIgE結合エピトープ解析. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)

6) 中村 央、濱田友貴、橘 勝康、塩見一雄:パ
ルブアルブミンに着目した軟骨および硬骨魚類
のアレルゲン性. 平成18年度日本水産学会大会
(2006年4月、高知)

7) 板垣康治、伊藤正也、望月 篤、塩見一雄:水
産食品の低アレルゲン化に関する検討. 第1報
酵素処理によるアレルゲンの分解. 平成18年度
日本水産学会大会(2006年4月、高知)

8) 板垣康治、伊藤正也、望月 篤、塩見一雄:水
産食品の低アレルゲン化に関する検討. 第1報
物理化学的方法によるアレルゲンの除去. 平成
18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)

9) 小池修一郎、清水 裕、中村 厚、渡辺一彦、
原 彰彦、佐伯宏樹:魚卵アレルギーにおけるイク
ラと他魚種卵との免疫学的交差性. 平成 18 年度
日本水産学会大会(2006年4月、高知)

10) 穂山浩、吉岡靖雄、松田りえ子、佐伯宏樹 2、
宇理須厚雄、米谷民雄:食物アレルギー(ピーナ
ッツ、魚卵). 平成 18 年度日本アレルギー学会シ
ンポジウム

11) 柴原裕亮、岡 道弘、梅田 衛、畝尾規子、
阿部晃久、大橋英治、潮 秀樹、塩見一雄:
ELISA法を用いた甲殻類検出試薬の開発. 日本
食品衛生学会第92回学術講演会(2006年10月、
愛知)

12) 清木興介、織田浩司、酒井信夫、穂山 浩、
米谷民雄:加工食品中の甲殻類たんぱく質検出
法の開発について. 日本食品衛生学会第92回学
術講演会(2006年10月、愛知)

13) 小林征洋、嶋倉邦嘉、石崎松一郎、長島裕
二、塩見一雄:アニサキス新規アレルゲン
SXP/RAL-2 protein様タンパク質の精製および
cDNAクローニング. 第56回日本アレルギー学会
秋季学術大会(2006年11月、横浜)

14) 戸村聡子、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕
二、塩見一雄:マサバパルブアルブミンのIgE反応
性に対するCa²⁺結合部位の重要性. 第56回日本

アレルギー学会秋季学術大会(2006年11月、横
浜)

15) 秋元政信、加藤重城、八木敬広、酒井信夫、
松田りえ子、穂山浩、米谷民雄. ELISA によるキ
ウイ検出方法について. 第 92 回 日本食品衛生
学会学術講演会, 愛知, 2006 年 10 月.

16) 田口大夢、渡辺 聡、平尾宜司、穂山浩、渡
邊敬浩、松田りえ子、米谷民雄. PCR 法を用いた
キウイの定性検知法について. 日本食品化学学
会第 12 回学術大会, 名古屋, 2006 年 6 月.

17) 谷内昇一郎、田辺創一、小島崇嗣、箕浦貴
則、須藤京子、木村彰宏、黒坂文武、笹井みさ、
西野昌光、伊藤典之、金子一成. 小麦アレルギー
一患者における低アレルゲン化小麦による減感
作療法の試み、第 56 回、日本アレルギー学会総
会、東京、2006、11月.

18) 田辺創一、中隈由樹、柴田瑠美子. 食肉ア
レルゲンとしての phosphoglucosylase の同定とそ
の IgE 結合エピトープ、第 18 回、日本アレルギー
学会春季臨床大会、東京、2006、6 月.

19) 田辺創一、岩谷飛鳥、宮内栄治、伊藤典之、
柴田瑠美子. 新規小麦アレルゲンとしてのプロテ
インZの同定、第 60 回、日本栄養・食糧学会大会、
静岡、2006、5月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1, 特願 2006-333567(発明の名称:食品中タン
パク質の高感度検出法)

2, 特願2006-258130(発明の名称 食品中の大
豆検出キット)

3, 特願 2007-4069 号(発明の名称 エビ検出用
プライマーセット)、

4, 特願 2006-4982 号、2006-146878 号の国内優
先権に基づく出願

5, 特願 2007-22175 (発明の名称 クルミとピーカ
ンナッツの分別検出方法)

6, 特願 2006-270089 号

7, 特願 2006-183458 号(発明の名称 キウイフルーツ検出用プライマーセット), 特願 2006-83585 号の国内優先権に基づく出願

表1; 平成18年度までの研究成果; 交差反応性の検討

	交差反応性		アミノ酸配列
	IgE結合能	臨床的交差反応性	
甲殻類	非常に強い交叉反応(相関係数0.85以上)がある。	エビアレルギー患者がカニアレルギーを示す比率は64.7%、シヤコ21.4%、オキアミ26.7%。	トロポミオシン; ミネフジツボを除く甲殻類の間では90%以上の相同性あり。
軟体動物(イカ、タコ、貝類)	イカ・タコ; エビと良い相関(相関係数0.75)があるが、甲殻類同士よりは低値。 アサリ; エビと良い相関(相関係数0.71)有るが、甲殻類同士よりは低値。	イカ・タコ; エビアレルギー患者のそれぞれ17.5%、20.3%が反応。	11種貝類(クロアワビ、サザエ、エゾボラ、エゾバイ、アカガイ、マガキ、トリガイ、ウバガイ、ミルクイ、マテガイ、アサリ)の主要アレルゲンは共通してトロポミオシンである。貝類トロポミオシンは貝類間のみならず甲殻類および頭足類のトロポミオシンと抗原交差性を示す。エゾバイを除く10種貝類のトロポミオシンの全アミノ酸配列をcDNAクローニングにより決定し、アミノ配列相同性は目(または科)レベルでのみ高いことを示した。
魚卵	イクラ、タラコとのIgE結合能交叉反応性有り。魚肉とも弱いながら交叉反応性あり。 鶏卵黄とはなし。		イクラのβ'-コンポーネントのアミノ酸配列 N-末端20残基はニジマス卵中のβ'-コンポーネントと95%の相同性を示す。
魚肉	相互に交叉反応性有るが、魚種間で差があり、その違いは生物学的分類とは一致しない。		
ナッツ類(クルミなど)	ナッツ類のアレルギーでは、臨床的・血清学的に交差抗原性を持つ組み合わせは限られており、ナッツ類全般に及ぶ交差抗原性は認めなかった。		

表2; 平成18年度までの研究成果 - アレルギー物質検査法の開発

	ELISA法						PCR法					
	標的抗原	抗体	交叉反応性	感度	定量性	モデル加工食品; 回収率	検証	検出	特異性	感度	交叉反応性	検証
甲殻類	エビトロポミオシン; 2種類確立	モノクロ	甲殻類内では交叉反応性あり	良好	良好	良好	完了	えび類、いせえび・うちわえび・ざりかに類	良好	良好	上海ガニを除くカニと区別可能 カニ検知法も開発中	未
イクラ	β'-コンポーネント	ポリクロ	検討中					未				
大豆	GlymBd30K.	ポリクロ	良好	良好	良好	未	大豆	良好				未
クルミ	2Sアルブミン	ポリクロ	良好	良好	良好	未	クルミ	良好			ビ-カンナツと交差性(制限酵素で区別可能)	未
キウイ	アクチニン	モノクロ	コーヒー豆、ブラックペーパーと交叉反応	良好	良好	良好	未	キウイ	良好			未
鶏肉	アルブミンおよび鶏肉可溶性画分	ポリクロ	卵と交叉、牛肉、豚肉、羊肉とは交叉なし	低い	良好	未	未	鶏肉	良好	良好	鶏、鴨、七面鳥と鑑別可能	未
豚肉	アルブミンとミオグロビン	ポリクロ	検討中	低い	良好	未	未	豚肉	良好	良好	猪肉とは反応。牛、鶏、羊、馬、兎の肉とは識別可能	未
牛肉	ミオグロビンとウシミオグロビンの部分配列を含むペプチド2種類	ポリクロ、モノクロ	検討中	低い	良好	未	未	作製中	未	未	未	未
ゼラチン	ゼラチン部分配列ペプチドあるいはウシゼラチン	ポリクロとモノクロ	ブタとウシゼラチンに対して反応。サカナゼラチンに対しては反応しない。加熱肉とは反応。	良好	良好	検討中(良好と思われる)	未	不可能	-	-	-	-

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・魚卵・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
	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
	今井孝成	国立病院機構相模原病院小児科
	堀口逸子	順天堂大学医学部公衆衛生学教室
	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

研究要旨

1、甲殻類の交差抗原性の検討

平成 17 年度に引き続き甲殻類の交差抗原性について患者血清を用いて検討した。平成 17 年度の検討でエビミックスおよびトロポミオシンに対するエビアレルギー患者の IgE 抗体価は、十脚目間だけではなく十脚目以外のシャコ(口脚目)、オキアミ(オキアミ目)、ミネフジツボ(フジツボ目)、カメノテ(フジツボ目)に対しても 0.83 以上の高い相関が見られた。本年度はトロポミオシンが構成成分として含まれる甲殻類以外の抗原(クモ綱ダニ目のヤケヒョウヒダニ、昆虫綱ゴキブリ目のゴキブリ、頭足綱(タコ、イカ)、二枚貝綱(アサリ)との交差反応性について検討した。エビミックスならびにトロポミオシンとヤケヒョウヒダニとは相関係数 0.23-0.25 で相関は見られなかった。ゴキブリとはそれぞれ 0.7、0.65 と弱い相関がみられ、アサリ、イカ、タコには 0.7~0.88 の相関が見られた。

また十脚目の「いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属するロブスターとイセエビについても同様に検討した結果、それぞれ 0.95、0.85 と高い相関が見られた。これらの IgE 結合能が特異的なものかどうかについて inhibition 試験を行った結果、固相化抗原と inhibitor 抗原とが同一である場合はいずれの組み合わせでも抑制がかかったことから IgE 結合は抗原特異的なものであると考えられた。

2、魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラは平成 17 年度即時型食物アレルギー全国モニタリング調査で、1-3 歳において初発症例の原因食物の第 2 位にランクされ最近急増している。また臨床の場合においても 1-3 歳でのアナフィラキシーの原因食品としても経験される。イクラは初回摂取でアレルギー症状をきたすため、他の食品との交差反応性が示唆されているが、原因はまだわかっていない。今回、鶏卵、サケ、その他の魚卵(数の子、タラコ)との共通抗原性について RAST や ELISA inhibition を行い検討した。

RAST で各抗原の IgE 抗体の相関性を検討したところ、イクラとその他の魚卵との間で相関が見られ、鶏卵やさけでは見られなかった。アナフィラキシーを呈した 2 名の患者血清で、ELISA inhibition を行った結果、数の子を inhibitor 抗原とした時にはほぼ 100% 近い抑制と、タラコおよびサケで用量依存性の 50% に近い抑制が得られたが、鶏卵黄ではまったく抑制は見られなかった。

イムノブロットにより、イクラアレルギー症例は β' コンポーネントに IgE が反応しており、これがアナフィラキシーなど過敏症状の原因と推測された。

3、ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

ナッツ類アレルギーにおける、ナッツ間の交差抗原性を検討した。ナッツアレルギーを疑われた 48 例から、ピーナッツ 16 例、クルミ 4 例、カシューナッツ 3 例の確定例を見いだした。また、42 例については、17 種のナッツ及び豆類、及び CCD 特異的 IgE 抗体を CAP-FEIA を用いて網羅的に測定した。クルミ・カシューナッツアレルギー症例については、過去に摂取歴のある他のナッツ類に対するアレルギー症状を認めなかった。IgE 抗体価は、カシューナッツとピスタチオ、クルミとペカンの間に強い相関関係を認めたが、他のナッツとの間の相関は強くなかった。従って、ナッツ類のアレ

ルギーでは、臨床的・血清学的に交差抗原性を持つ組み合わせは限られており、ナッツ類全般に及ぶ交差抗原性は認めなかった。

4、食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-
Web サイトを利用して、食物アレルギーと自覚する主として成人の実態について、その生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向などに関する調査を行った。その結果、日常生活において何らかの支障があることがわかった。アレルギー表示の施行により、ある程度健康危機回避ができていたことが伺えた。正確な知識は未だ十分とはいえない状況であった。アレルゲンは、特定原材料等は上位38項目内に含まれていたが、多岐にわたる食品があがっており、食生活のバリエーションが広いことがわかった。表示方法では、一括表記の欄外に別途表記する方法が最も多く望まれていた。

A.研究目的

1、甲殻類の交差抗原性の検討

甲殻類は食物アレルギー惹起食品としてよく知られており、しかもアナフィラキシーのような重篤なアレルギー症状を引き起こすため、甲殻類に対してアレルギーを引き起こす患者にとってこれらを含む食品の適切な表示が待ち望まれている。

平成 17 年度の甲殻類の交差反応性に関する検討で、エビアレルギー患者のエビミックスおよびトロポミオシンに対する IgE 抗体は、十脚目間だけではなく十脚目以外のシャコ(口脚目)、オキアミ(オキアミ目)、フジツボ(フジツボ目)、カメノテ(フジツボ目)に対しても 0.83 以上の高い相関が見られ、このことから、トロポミオシンがこれら甲殻類に広く分布し、交差反応性の主要なタンパク質であることが理由として推測された。その一方で、トロポミオシンは頭足類や昆虫類にも広く存在することが知られているため、これら甲殻類以外に含まれるトロポミオシンとの交差抗原性についての程度を明らかにする必要性が生じた。そこで今回、甲殻類以外の(クモ綱ダニ目のヤケヒョウヒダニ、昆虫綱ゴキブリ目のゴキブリ、頭足綱(タコ、イカ)、二枚貝綱(アサリ))との交差反応性について検討する。

またアレルギー物質食品表示の対象となっていない「7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属する十脚目のロブスター(ザリガニ下目)とイセエビ(イセエビ下目)から抗原を抽出しこれらの IgE 結合能との相関性について検討を行った。

さらに、これらの抗原に対する IgE 結合が特異的なものかどうかを検討するために CAP-inhibition による IgE 結合抑制試験を行った。

2、魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラは平成 17 年度即時型食物アレルギー全国モニタリング調査で、1-3 歳において初発症例の原因食物の第 2 位にランクされ最近急増している。また臨床の場合においても 1-3 歳でのアナフィラキシーの原因食品としてもしばしば経験される。このことからイクラはアレルギー物質食品として表示が推奨されるべき食品として挙げられている。

イクラアレルギーは前述したように急増している問題に加えて、初回摂取でアナフィラキシーを生じたり、発症前から特異的 IgE 抗体を有する乳幼児の存在から、何らかの交差反応性が推測されている。

今回は、イクラの交差反応性の原因について、鶏卵および魚卵、サケ魚肉などと RAST による IgE 抗体の相関および ELISA inhibition を行い検討した。

3、ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

ピーナッツ・ナッツ類のアレルギーは致死的なアナフィラキシーを誘発する危険の高い疾患であり、我が国でも患者数の増加が疑われている。ナッツ類のアレルギー患者は、他のナッツに対する交差反応を懸念して、あらゆる種類のナッツ類を除去している場合が多い。

我々は昨年度の研究で、ピーナッツアレルギーの患者では、同じ豆目豆科に属する大豆に対してすら、交差反応を起こすケースはごく稀であり、血清学的にも真のピーナッツアレルギー患者血清は他のナッツ類の IgE 抗体価が陰性又は低値である事を報告した。一方で、誘発症状を認めないピーナッツ IgE 抗体陽性血清は、むしろ多種のナッツに対する IgE 抗体価が一様に高値をとる傾

向を指摘した。

本研究では、ピーナッツに限らず他のナッツアレルギー患者を含めて、ナッツ類アレルギー患者における臨床的・血清学的な交差反応性を、多くのナッツ・豆類にわたって網羅的に検討することを目的とした。

4、食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

食物を食べて何らかの症状をきたした場合に、その人は食物アレルギーと自己診断をする。症状が重篤でない場合、また成人の場合は、食生活の自己管理がある程度可能であるため、医療機関において確定診断を受けないことも多いと思われる。しかし、自己診断であれ、食物アレルギーと自覚する人々は、食品によって過去なんらかの健康被害を受け、そして、アレルギー表示を利用し食生活の自己管理を行っていると思われる。

今回は、食物アレルギーと自覚している成人に対して、生活やアレルゲン(と思っているもの)、表示に関する知識などを明らかにすることを目的とし、Webサイトを利用した調査を実施した。

B.研究方法

1、甲殻類の交差抗原性の検討

今回使用した血清は平成17年度の本研究と同じ検体を使用した。つまり甲殻類に対してアレルギー既往を持つ患者及び甲殻類に対してIgE抗体を有する患者血清87検体で、前回すでに患者及びその保護者からの同意が得られたものである。

今回の抗原の抽出もCAP支持体への固相化はファディア社へ依頼した

2、魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

今回1歳—2歳でイクラによりアナフィラキシーを生じた患者AとBから血清を採取しELISA inhibitionを行った。コントロールにイクラ特異的IgE抗体の高い魚アレルギー患者Cの血清を用いた。患者AとBはいずれも1歳半のとき、イクラを摂取して10-30分にアナフィラキシーで受診し、患者Cは魚アレルギーのためイクラ特異的IgEを測定した結果、高値であったためイクラは摂取させていない。

また、魚、魚卵及び鶏卵アレルギーで受診した患者(n=27)の血清を用いて、各抗原に対す特異的IgE抗体をRASTで測定し、その値を比較した。

魚卵および魚肉からの抗原の抽出は1M-KClバッファーを用い、鶏卵に関しては凍結乾燥粉末を使用した。

3、ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

ピーナッツを含めてその他のナッツ類にアレルギー症状が疑われた患者を複数の施設から集積し、ナッツ類及び豆類に対するIgE抗体価を、CAP-FEIA法を用いて網羅的に測定した。

測定を行った項目は、次の通りである。

ピーナッツ、大豆、アーモンド、ハシバミ、ココナッツ、インゲン、カカオ、エンドウ、ブラジルナッツ、クルミ、ゴマ、カシューナッツ、ピスタチオ、マカダミアナッツ、クリ、松の実、ペカン、MUXF3(プロメライン由来のオリゴ糖で、Cross-reactive Carbohydrate Determinantを代表する)

ナッツアレルギーの診断は、詳細な摂取歴の問診と、同意の得られたものについては食物負荷試験を施行して確定診断に努めた。

食物負荷試験は、ピーナッツではピーナッツバター又はローストしたピーナッツを、アーモンドや他のナッツではナッツそのものを用いて、ごく微量から0.25g、0.5g、1g、2gまで(最大量5gまで)を20分毎に摂取するオープンチャレンジで施行した。

全種類のナッツを測定できた42検体について、IgE抗体価の相関係数を算出した。相関係数は、抗体価の高いデータの影響を少なくするために、抗体価(UA/ml)をLog換算した上で計算した。

4、食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

調査は、全てWebサイトを利用した。このWebサイトは、Yahooリサーチ(登録モニター数約53万人)を利用した。

1)生活状況等調査

平成18年10月に、Yahooリサーチモニター約2万人に対して「えび」「かに」によるアレルギー症状の有無を聞き、回答が得られた者のうち20歳台から30歳台の男女約10名を抽出し、オンラインによる3日間のディスカッションを実施した。

2)アレルゲンと表示に関する知識

平成18年12月にYahooモニターのうち16歳以上50歳台で食物アレルギーがあると自覚している約3000人を対象サンプルとして抽出し、そのうち回答のあった約2256名について分析を行っ

た。

アレルゲンについては特定原材料等について、そして別途「その他」として自由項目にて複数回答を求めた。

アレルギー表示では、代替表記や省略表記そして特定加工食品などが認められている。どの程度、認知できるのか、○×形式で回答を求めた。

3) 好ましいアレルギー表示方法について

2) の調査において食物アレルギーがあると自覚している者として抽出できた者に対して、平成 19 年 1 月再度調査を実施し、回答の得られた 1848 名を対象に分析を行った。

表記の方法は厚生労働省アレルギーパンフレットを参考に、ポテトサラダについて 4 種類を示した。また、表示についての理解がどの程度がわからないため、特定原材料等及び代替表記や省略表記について説明した上で、選択してもらった。

C. 研究結果

1. 甲殻類の交差抗原性の検討

今回抽出した各抗原とエビミックスならびにトロポミオシンに対する IgE 抗体結合能の相関性を表 1-1 に示す。ヤケヒョウヒダニに対する IgE 結合能との相関係数はそれぞれ 0.23 と 0.25 で相関はみられなかった。昆虫鋼ゴキブリ目ゴキブリに対しては 0.7 と 0.65 と相関がみられた。二枚貝、頭足類に対しては 0.71 から 0.84 の相関であった。一方十脚目であるロブスターやイセエビに対しては 0.85 以上の高い相関が見られた。

CAP-inhibition の結果を図 1-1 に示す。固相化抗原と inhibitor 抗原が同一である場合には抑制がかかり、同一抗原以外では抑制は見られなかった。

2. 魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラと鶏卵白、サケに対する患者 IgE 抗体の相関は両群において認められなかった(図 2-1)。イクラとその他の魚卵(数の子、タラコ)に対する IgE に関しては両群で相関がみられた(図 2-2)。

イクラアナフィラキシー児 A と B(図 2-3、2-4)においてイクラに対する IgE 結合能は同一抗原のイクラ以外に数の子で強く抑制され、タラコ、サケでも濃度依存性に抑制が見られた。一方、魚アレルギーでイクラが高値であった症例 C(図 2-5)においてはイクラの IgE 結合能は同一抗原であるイクラのみで抑制された。また、鶏卵黄による抑制はいずれの症例においても見られなかった。

これらの症例における違いを見るためイムノブロットを行った(図 2-6)。その結果、患児 A と B は低分子のたんぱく質(15, 17kDa)に反応し、患児 C はやや前者よりもやや高い分子のたんぱく質(21kDa)に反応していた。N 末端のアミノ酸のシーケンスを調べた結果、前者は β' コンポーネントで後者はリポビテリンであることが推測された。両者ともビテロジェニン由来のたんぱく質であることが知られている。

3. ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

1. 登録症例

ナッツアレルギーの疑われた 48 例を検討し、ピーナッツ 16 例、クルミ 4 例、カシューナッツ 3 例、アーモンド 1 例のアレルギー患者を登録した。また、疑い例として、ピスタチオ、マカデミアナッツ、杏仁寒天を各 1 例登録した。大豆、ゴマは今回症例集積の対象としなかったが、それぞれ 4 例ずつアレルギー症例を認めた。

ピーナッツアレルギー症例の臨床的特徴および他のナッツとの交差抗原性については昨年と同様の結果であったので、ここでは省略する。

2. カシューナッツアレルギー症例

カシューナッツアレルギー 3 例の臨床像は次の通りである。

症例 1; 4 歳男児。カシューナッツ 100% のスプレットを摂取して呼吸困難と意識障害を伴うアナフィラキシーショック。

症例 2; 7 歳女児。カシューナッツを含むお菓子を食べて嘔吐・腹痛・発赤の既往が 3 回。

症例 3; 5 歳男児。カシューナッツを含むナッツ詰め合わせで腹痛、喘鳴、全身の膨疹。カシューナッツの負荷試験で腹痛・嘔吐を確認。

3 例とも、ピーナッツをはじめとしてこれまで摂取した他の豆類・ナッツ類・チョコレート等でアレルギー症状を認めていない。

これら 3 例のナッツ類検査結果を表 3-1 に示す。症例 1 でピーナッツ、症例 3 ではクルミ・ピーカンが陽性であるが、問診上はクルミ摂取時の誘発症状は経験がない。一方、3 例ともピスタチオ IgE 抗体が陽性であった。

3. クルミアレルギー症例

クルミアレルギー確定症例 4 例と、疑い 2 例・既往 1 例の IgE 抗体価を表 3-2 にまとめた。確定症例 4 例はいずれも明らかな即時型症状の既往があり、症例 1 は負荷試験において微量摂取の