

200734010A

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 19 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 20 (2008) 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. 魚類間の交差反応性、アレルギー物質食品表示、アレルギー閾値、

エビ抗原含有食品のアレルギー惹起性に関する検討

宇理須 厚雄 13

2. 魚貝類検知法の開発および魚貝類アレルギーの特定・性状解析

塩見 一雄 30

3. 豆類検知法の開発

穂山 浩 41

4. 果実類の検出法開発に関する研究

安達 玲子 51

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 64

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 75

IV. 研究成果の刊行物・別冊 77

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 教授

研究要旨

1、食品中のアレルギー物質検査法開発

①ELISA法の開発：イカ、サバ、イクラ、ダイズ、キウイフルーツ、クルミ、バナナ、豚肉、牛肉、ゼラチンのELISA法を開発した。エビ、ダイズ、クルミはバリデーションでも良好な結果を得た。

②PCR法の開発：エビ(カニと区別可能)、カニ、サケ、サバ、ダイズ、キウイ、クルミ、バナナ、牛肉、豚肉、鶏肉に対するPCR法を確立した。

2、健康被害防止のための科学的根拠に基づいた表示方法に関する研究

①各種水産加工食品中の甲殻類タンパク質の定量：甲殻類の混入が予想される各種水産加工食品について甲殻類検知キットを用いて分析した結果、305検体中137検体(海苔85検体中27検体、いわし稚魚52検体中48検体、すり身132検体中59検体、二枚貝36検体中3検体)より「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された。特にいわし稚魚製品とすり身においては、検出濃度および検出頻度が高く、アレルギー患者の健康危害防止の観点から表示等の注意喚起が必要と考えられた。

②エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

原材料に甲殻類を使わない食品(つみれ、しらす、味付のり、かまぼこ、魚肉ソーセージ、ちくわ、ちりめんじゃこ、佃煮)でも、甲殻類測定ELISAキットによってエビ抗原が検出される食品がある。これらを摂取することによって症状を呈するエビ・カニアレルギー症例があることが判明した。症状はナフィラキシー等の重篤な症状は認めず軽微であった。6例に関しては含有する甲殻類抗原で症状が出現している可能性があった。しかし、真に甲殻類抗原によって惹起された症状であるか今後の検討が必要である。エビ・カニの表示義務化に向け新たな課題となる。

③アレルギー分析(交叉反応性)

1)魚貝類のアレルゲン解析：パルプアルブミンのIgE反応性はCa²⁺除去により著しく低下した。パルプアルブミンのIgEエピトープとしては高次構造エピトープが重要であると考えられた。ブラックタイガーの新しいアレルゲンとして20kDaのSCPを同定した。また、クロアワビの100kDaのパラミオシンもアレルゲンであると同定した。

2)イクラ、タラコなど魚卵間にはIgE結合能で交叉反応性が存在するが、鶏卵黄とは交叉反応しない。魚卵β'-コンポーネントが交差反応性に関与している。

3)魚類；魚類相互の交叉反応性にはパルプアルブミンが関与しているが、高次構造エピトープが重要である。パルプアルブミン以外にトランスフェリンが魚類間の交差反応性に関与する症例が存在する。

④乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖には1g当たり約8μgの乳タンパク質が含まれる。牛乳アレルギー患者31人中1人が乳糖負荷試験陽性となった。今回の経口負荷試験では陽性となる最低量は36μg乳タンパク質量であった。また、90%の患者が陰性となる閾値は3.3mgであった。信頼性を増すためには、牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

⑤アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

32種類の食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量をFAST KIT エライザ Ver. IIで測定した。その中で、クッキー・ビスケットの牛乳タンパク質含有量をみると、0.01mgから3.4mgと約300倍の幅があった。経口負荷試験で陽性となった牛乳タンパク質量に基づき、どの含量の食品ならば摂取可能であると指導できるようにするためには、さらなる検証が必要である。アレルギー物質含有食品交換表が完成されれば、食物アレルギー患者は表示に自身のアレルギー物質が含まれていても、食べることができる加工食品を見つけることができる。日本の食品表示では表示義務食品は定量的検知法(ELISA法)が確立している。この検知法の応用範囲を拡げることになる。

3、消費者に分かりやすい表示に関する検討

①アレルギー物質食品表示に関するアンケート

アレルギー物質食品表示の認知度は91.7%と高く、その多く(86.2%)が有用性を認めている。今後、表示義務へ変更することを望まれる食品は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツの順位であり、エビとカニを足すと1位であった。しかし、40.9%の人が判りづらい表示があると回答していた。今後は、より判りやすいアレルギー物質食品表示の方法について検討する必要がある。

分担研究者

樺山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部室長
塩見 一雄	東京海洋大学海洋食品科学科教授
安達 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部室長
田辺 創一	広島大学大学院生物圏科学研究科准教授

荷試験を行うことによって、食物アレルギー惹起閾値決定の予備的研究を行う。また、乳糖のアレルゲン性を評価する。

④アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

牛乳たんぱく質の含量に基づきランク別に食品を分類する。負荷試験陽性抗原量を決定する経口負荷試験の結果で摂取できる食品の指導に使うアレルギー物質含有食品交換表作成の予備的研究とする。

A. 研究目的

1、食品中のアレルギー物質検査法開発

①ELISA法の開発；イカ(軟体動物)、サバ(魚類)、イクラ(魚卵)、ダイズ、クルミ、キウイフルーツ、バナナ、豚肉、牛肉、ゼラチン

②PCR法の開発；エビ、カニ、サバ、サケ、ダイズ、キウイフルーツ、クルミ、バナナ、牛肉、豚肉、鶏肉。

2、健康被害防止のための科学的根拠に基づいた表示方法に関する研究

①エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

シラス、チリメンジャコ、すり身製品、のりなどにはエビ抗原が微量含まれることが判明した。エビアレルギー患者がこれらを食してアレルギーが惹起されるか検討する。

②アレルゲン分析(交叉反応性)

魚類間の交叉反応性に関するパルブアルブミン以外の魚肉タンパク質

マグロアナフィラキシーの既往のある患者が、パルブアルブミンやコラーゲン以外のアレルゲンの交差反応性によって、クロカジキにアナフィラキシーを生じたと考えられたので、アレルゲンの同定を試みた。

③乳糖・微量牛乳経口負荷試験

マイクログラムオーダーの経口負荷試験負

3、消費者に分かりやすい表示に関する検討

①アレルギー物質食品表示に関するアンケート

消費者を対象にアレルギー物質食品表示に関するアンケート調査を行い、表示制度の有用性、問題点などを明らかにすることによって、表示の改善のための提言をする。

B. 研究方法

1、食品中のアレルギー物質検査法開発

①ELISA法の開発；

イカ(軟体動物)、サバ(魚類)、イクラ(魚卵)、ダイズ、クルミ、キウイフルーツ、バナナ、豚肉、牛肉、ゼラチン

②PCR法の開発；

エビ、カニ、サバ、サケ、ダイズ、キウイフルーツ、クルミ、バナナ、牛肉、豚肉リアルタイムPCR

2、健康被害防止のための科学的根拠に基づいた表示方法に関する研究

①エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に対するアンケート調査

エビ・カニアレルギー患者を対象に、シラス、チリメンジャコ、すり身製品、のりなどエビ抗原が微量含まれていることが判明している食

品による健康被害の実態をアンケート調査した。

②アレルゲン分析 (交叉反応性)

1) 魚類間の交叉反応性に関与するパルプアルブミン以外の魚肉タンパク質

症例; マグロ(スズキ目サバ科マグロ属)とカジキ(クロカワカジキ: クロカジキ) (スズキ目マカジキ科クロカジキ属) に対してアレルギー(アナフィラキシー)を呈する。同じスズキ目サバ科に属するマサバを食べても無症状。

魚抗原: ギンザケ(サケ目サケ科タイヘイヨウサケ属)、ヤマトカマス(スズキ目カマス科カマス属)、マサバ(スズキ目サバ科マサバ属)、ホンマグロ(スズキ目サバ科マグロ属)、クロカジキ(スズキ目マカジキ科クロカジキ属)、スケトウダラ(タラ目タラ科スケトウダラ属)からの抽出抗原。

ELISA inhibition および Immunoblot inhibition; アレルゲン性の共通抗原性の検討。

③乳糖・微量牛乳経口負荷試験

対象; 牛乳負荷試験陽性または牛乳摂取で過敏症状の既往を有する牛乳アレルギー患者 31 例。
経口負荷試験; 乳糖経口負荷試験 (乳糖 3g = 乳タンパク質約 24 μ g)、牛乳微量負荷試験 (乳タンパク質 1.7~333 μ g 漸増法)、牛乳普通量負荷試験 (乳タンパク質 3.3~2963mg 漸増法、投与全量; 牛乳 100mL)。

④アレルギー物質含有食品交換表作成の試み
32 食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量を FASTKIT エライザ Ver. II で測定した。

3、消費者に分かりやすい表示に関する検討

①アレルギー物質食品表示に関するアンケート

対象は 933 人 (食物アレルギー患児の保護者 366 人、栄養士 116 人、調理師 185 人、保育士 149 人、医師 17 人、その他 100 人。表 2-1 にアンケートの質問用紙を示す。

C、研究結果、考察、結論

1、食品中のアレルギー物質検査法開発

①ELISA 法の開発 (表 1, 2);

イカ (軟体動物) 検知法 (ELISA 法):

スルメイカ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取得し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。このサンドイッチ ELISA 系は 0.78 ng/mL 検出が可能であり、交差反応性は頭足類に特異的で、貝類 (13 種類)、甲殻類 (6 種類)、魚類 (8 種類)、鳥類 (1 種類)、哺乳類 (2 種類) とは反応しないことから、頭足類検知法として有用であると考えられた。

サバ (魚類) 検知法 (ELISA 法):

マサバパルプアルブミ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作製し、サバ検知法、魚類を測定できる検知法 (サンドイッチ ELISA 系) を構築した。サバ検知法は、交差が少ないと思われたモノクローナル抗体の組み合わせを用いたが、18 種類の魚類中 9 種類で交差反応が確認され検知法の確立は困難と考えられた。一方、魚類検知法は魚種によって反応性に差が認められたもののマサバ、サケ類には強い反応性であることから、サケ・サバを検知する測定系として有用であることが示唆された。

イクラ (魚卵) 検知法 (ELISA 法):

シロザケ卵黄タンパク質のポリクローナル抗体を用いた ELISA 検知系を構築し、イクラに対する選択性が高いことを確認した。本検知系は、特定原材料抽出用試薬の使用が可能であり、かつシロザケに対する特異性も高かった。

エビ、カニ、ダイズ、クルミはバリデーションでも良好な結果を得た。

ダイズ ELISA 法:

本検出法は食品原材料に対して交差反応を示さず、大豆特異的な検出法であることが確認された。また調理加工の影響を受けることなく、加工食品中の微量な大豆タンパク質を高感度に検出可能であった。

発酵食品については、加工段階における大豆タンパク質の分解の程度によって検出の有無が生じた。大豆油については、加工段階で大豆タンパク質が除去されるため検出不可能であった。

「大豆イソフラボン」, 「大豆ペプチド」を含む検体については、精製度の違いによって、測定値に差が生じる可能性が示唆された。

クルミ ELISA 法；

今回、脱脂クルミの重量を変化させ、2-D と ELISA を行ったところ、濃度依存性のある重量域は限られていることが判明した。もし、濃度依存性のない重量での抽出濃度からタンパク量を決めると、ELISA から得られる測定値は、実際のタンパク量とは乖離した数値を示すことが示唆された。

キウイフルーツELISA法；

定量検知法を確立した。

バナナELISA法；

バナナの定量検知法開発の基礎検討として、主要アレルゲンを精製した。

大豆検知ELISAキット及びくるみ検知ELISAキット；

5-7種類のモデル食品を用いた外部機関によるバリデーションにおいて、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。

豚肉、牛肉 ELISA 法；

他の動物種との交叉反応を低減するために吸収操作を行うなどの改良を行った。しかし、加熱肉への反応性が弱いことなどの問題点が明らかになった。

ゼラチン ELISA 法；

感度・特異性ともに良好な検出系が確立された。

②PCR 法の開発；

エビ(カニと区別可能)、カニ、大豆、キウイ、クルミ、バナナ、牛肉、豚肉、鶏肉に対する PCR 法を確立した。

大豆 PCR 法；

Gym81/82 を用いた PCR 法により、ELISA で数 ppm 程度の大豆の混入が認められた小麦粉からの大豆の検出が可能であった。一方、ELISA でダイズの混入が認められなかった小麦粉および市販加工食品からは、大豆が検出されなかった。

クルミ PCR 法；

今回の検討結果は、本研究で開発された方法が幅広い食品からの食用クルミ科遺伝子の検知法として適用可能であることが示唆された。また、その PCR 増幅産物の1塩基の相違を確認することで食用クルミ科ナッツのクルミとピーカンナッツの分別法として適用可能であることも示唆された。

カニ PCR 検知法；

試験したカニ 13 種全てから、5 pg の DNA から約 60 bp の標的 PCR 産物が得られた。また、カニ蛋白質 10 ppm(w/w)相当量のタラバガニ、あるいはベニズワイガニを含有するモデル加工食品の鶏肉団子より抽出した DNA から、標的 PCR 産物が得られた。一方、特異性の試験に供したエビ 14 種、他の甲殻類 3 種のうち、オマールエビ、スキャンピー、シャコの DNA から、カニと同様に標的 PCR 産物が得られた。

オマールエビとスキャンピーで得られた標的 PCR 産物は、鋳型 DNA 量 50 ng の時でも非常に薄く、5 ng では確認できないレベルであったが、シャコについては、鋳型 DNA 量 50 ng~5 pg の広い範囲で標的 PCR 産物が得られた。また、市販 27 製品についてのエビ PCR 検知法、カニ PCR 検知法による分析結果(エビ PCR 由来産物の塩基配列解析結果も含む)と、製品表示や甲殻類 ELISA キット測定値などを比較評価した結果、一部、検査不能や整合性の取れないものもあったが、25 製品で妥当な結果となった。

サケ・サバ検知法 (PCR 法)；

サケ PCR 法を開発し、幅広い食品に適用できることを確認した。今後、擬似混入試料での検証、ならびに擬似混入試料の分析を数機関で行い、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。サバ PCR 法に関しては、マサバ・ゴマサバ用プライマーと大西洋サバ用プライマーをミックスして用いることにより、サバ類をおおむね特異的に検出できることを明らかにした。交差が認められたナメタガレイについては遺伝子配列の同定などの実験的検証が必要と思われる。

バナナPCR法；
定性検知法を確立した。

鶏肉 PCR 法；

16s ミトコンドリア DNA 領域をターゲットとするプライマーを用いて検討した結果、さまざまな鶏品種由来 DNA を検出でき、かつ、鶏以外の食用鳥類や哺乳動物由来のものと識別できる測定系が確立された。

鶏肉・豚肉・牛肉・羊肉・馬肉を迅速かつ定量的に検出することが可能な Real-Time PCR 法；
チトクロム b 上に作成したプライマーおよび TaqMan プローブ配列を用いてを確立した。

2、健康被害防止のための科学的根拠に基づいた表示方法に関する研究

①各種水産加工食品中の甲殻類タンパク質の定量；

甲殻類の混入が予想される各種水産加工食品について甲殻類検知キットを用いて分析した結果、305 検体中 137 検体(海苔 85 検体中 27 検体、いわし稚魚 52 検体中 48 検体、すり身 132 検体中 59 検体、二枚貝 36 検体中 3 検体)より「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された。特にいわし稚魚製品とすり身においては、検出濃度および検出頻度が高く、アレルギー患者の健康危害防止の観点から表示等の注意喚起が必要と考えられた。

②エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

原材料に甲殻類を使わない食品(つみれ、しらす、味付のり、かまぼこ、魚肉ソーセージ、ちくわ、ちりめんじゃこ、佃煮)にも甲殻類測定キット(ELISA)によってエビ抗原が検出される食品がみつかった。今回のエビアレルギー患者を対象としたアンケート調査でこれらの食品によって過敏症状を呈する症例がいることが判明した。症状はアナフィラキシー等の重篤な症状は認めず、軽微であった。6例に関しては含有する甲殻類抗原で症状が出現した可能性があった。しかし、真に甲殻類抗原によって惹起された症状であるか今後の検討が必要である。エビ、カニの表示義務化に向け新たな課題となる。

③アレルギー分析(交叉反応性)

1) 魚貝類のアレルギー解析；

パルブアルブミンの IgE 反応性は Ca^{2+} 除去により著しく低下することが多くの魚種で確認され、パルブアルブミンの IgE エピトープとしては高次構造エピトープが重要であると考えられた。ブラックタイガーの新しいアレルギーとして 20 kDa の sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) を同定することができた。SCP はエビ類特有のアレルギーと推定され、エビのみを認識するアレルギー患者の存在を説明できる可能性がある。クロアワビの新しいアレルギーとして 100 kDa のパラミオシンを同定した。パラミオシンは無脊椎動物に普遍的な筋肉タンパク質で、クロアワビ以外の動物のパラミオシンの IgE 反応性や抗原交差性は今後の課題である。

2) イクラ、タラコなど魚卵間には IgE 結合能で交叉反応性が存在するが、鶏卵黄とは交叉反応しない。魚卵 β' -コンポーネントが交差反応性に関与している。

3) 魚類；魚類相互に交叉反応性にはパルブアルブミンが交差反応性に関与しているが、高次構造エピトープが重要である。

マグロ単独アナフィラキシーと考えていた患者が同日異科に属するクロカジキの摂食後に同様のアナフィラキシーを生じた。ELISA inhibition で両者お互いに強い抑制がみられたことから共通抗原性が証明された。両者の共通抗原性の原因タンパクを調べるため immunoblot inhibition を行い、互いに抑制するタンパクを取り出し N 末アミノ酸シーケンスを行った結果トランスフェリンと高い相同性が見られた。この結果、トランスフェリンがホンマグロとクロカジキの共通抗原性に関わっているタンパクであると考えられた。

④乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖には 1g 当たり約 $8\mu\text{g}$ の乳タンパク質が含まれる。牛乳アレルギー患者 31 人中 1 人が乳糖経口負荷試験陽性となった。今回の経口負荷試験では陽性となる乳タンパク質の最低量は $36\mu\text{g}$ であった。また、90% の患者が陰性となる閾値は 3.3mg であった。今後、対象牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

⑤アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

32 食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量をFASTKIT エライザ Ver. II で測定した。その中で、クッキー・ビスケットの牛乳タンパク質含有量をみると、0.01mg から 3.4mg と約 300 倍の幅があった。

アレルギー物質含有量に基づき食品を分類するアレルギー物質含有食品交換表が完成されれば、食物アレルギー患者は表示に自分のアレルギー物質が含まれていても、食べることができる加工食品を見つけることができる。

日本の食品表示では表示義務食品は定量的検知法（ELISA 法）が確立している。この検知法の応用範囲を拡げることになる。

3、消費者に分かりやすい表示に関する検討

①アレルギー物質食品表示に関するアンケート

アレルギー物質食品表示の認知度は 91.7% と高く、その多く（86.2%）が有用性を認めていた。今後、義務化を望む食品は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツの順位であり、エビとカニを足すと 1 位であった。しかし、40.9% の人が判りづらい表示（加水分解タンパク質、卵殻カルシウム、乳酸カルシウム、乳糖、デュラムセモリナ、乳酸菌、カカオバター、乳化剤、魚介類など）があると回答していた。今後、より判りやすいアレルギー物質食品表示の方法について検討する必要がある。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukoyama T, Nishima S, Arita M, Ito S, Urisu A, Ebisawa M, Ogura H, Kohno Y, Kondo N, Shibata R, Hurusho M, Mayumi M, Morikawa A. Guidelines for Diagnosis and Management of Pediatric Food Allergy in Japan. *Allergol Int.* 2007 ;56(4):349-361
- 2) Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Ohno Y. A Reliable and Sensitive Immunoassay for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods. *J Agric Food Chem.* 2007 14; 55(23):9345-9350.

- 3) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Toyoda M, Urisu A. Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007, ;71(10):2561-2564.
- 4) Yano T, Sakai Y, Uchida K, Nakao Y, Ishihata K, Nakano S, Yamada T, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Maitani T. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71:1793-1796.
- 5) Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. *Allergol Int.* 2007 ;56:149-155.
- 6) Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T. Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem.* 2007;55:1649-1655.
- 7) 宇理須厚雄；食物アレルギーの治療アレルギー，2007；56：541-548.
- 8) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Moriyama T, Urisu A, Maitani TA Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71,269-272.
- 9) 山田一恵、宇理須厚雄、低アレルギー化食品の選び方と使い方、小児内科、2007;39,613-617.
- 10) 柘植郁哉、宇理須厚雄、食物アレルギー、総合臨床、56,1915-1920,2007.
- 11) 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.*, 55, 985-991 (2007)
- 12) Y. Kobayashi, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi: Molecular cloning and expression of two new allergens from

- Anisakis simplex. *Parasitol. Res.*, 100, 1233-1241 (2007)
- 13) 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. B Biochem. Mol. Biol.*, 147, 230-236 (2007)
- 14) 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ゲンの検出。日本食品科学工学会誌, 54, 289-295, 2007.
- 15) 柴原裕亮：食品中の甲殻類アレルゲンの検出法。食品と技術, 436, 10-18, 2007.
- 16) 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.*, 24, 917-922, 2007.
- 17) Y. Kobayashi, K. Shimakura, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Purification and molecular cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 155, 138-145, 2007.
- 18) S. Tomura, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by mutations at Ca²⁺-binding sites. *Fish. Sci.*, 74, 411-417, 2008.
- 19) K. Shiomi, Y. Sato, S. Hamamoto, H. Mita and K. Shimakura: Sarcoplasmic calcium-binding protein: Identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 146, 91-98, 2008.
- 20) S. Sakai, R. Matsuda, R. Adachi, H. Akiyama, T. Maitani, Y. Ohno, M. Oka, A. Abe, K. Seiki, H. Oda, K. Shiomi and A. Urisu: Interlaboratory evaluation of two kinds of enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. AOAC Int.* (in press)
- 21) Y. Kobayashi, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Ani s 1, a major allergen of *Anisakis simplex*: purification by affinity chromatography and functional expression in *Escherichia coli*. *Parasitol. Int.* (accepted)
- 22) K. Motoyama, Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y. Lu, H. Ushio and K. Shiomi: Identification of tropomyosins as major allergens in Antarctic krill and mantis shrimp and their amino acid sequence characteristics. *Mar. Biotechnol.* (submitted)
- 23) S. Yoshida, A. Ichimura and K. Shiomi: Elucidation of a major IgE epitope of Pacific mackerel parvalbumin. *Food Chem.* (submitted)
- 24) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡道弘, 阿部晃久, 織田浩司, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穂山浩, 手島玲子: 食品原材料中に含まれる「えび」、「かに」等の甲殻類タンパク質の実態調査。日本食品化学会誌 (投稿中)
- 25) Yano, T., Sakai, Y., Uchida, K., Nakao, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection of walnuts residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 1793-1796, 2007.
- 26) 穂山浩, 酒井信夫, 安達玲子 “食物アレルギー表示における特定原材料等の検査法に関する最新動向と今後の展望について” *FFI ジャーナル*, 212, 1006-1015, 2007.
- 27) 穂山浩, 酒井信夫, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 赤澤晃, 宇理須厚雄, “アレルゲンの交差反応性” *小児内科*, 39, 558-563, 2007.
- 28) Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., Toyoda, M., Urisu, A., Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci, Biotechnol, and Biochem*, 71, 2561-2564, 2007.
- 29) Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., Urisu, A. Interlaboratory Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods, *Journal of AOAC International*, 2008, in press
- 30) Sakai, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Yano, T., Uchida, K., Nakao, Y., Sakai, S., Adachi, R., Urisu, A., Akiyama, H., Maitani, T. Specific detection of banana residues in processed foods using polymerase chain reaction (submitted)

- 31) 森山達哉, 光山英由, 矢野えりか, 大羽美香, 橘田和美, 川本伸一, 穂山浩, 宇理須厚雄, 高橋浩司, 羽鹿牧太, 小川正, 河村幸雄「食物アレルギータンパク質の近赤外蛍光標識プローブによる検出」日本食品科学工学会誌, 54巻, 11号 468-476, 2007.
- 32) 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.*, 71(7), 1663-1667, 2007.
- 33) Tanabe S., Hase M., Yano T., Sato M., Fujimura T., Akiyama H. A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(12), 3131-3135, 2007.
- 34) Fujimura T, Matsumoto T, Tanabe S, and Morimatsu F. Specific Discrimination of Chicken DNA from Other Poultry DNA in Processed Foods Using the Polymerase Chain Reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press, 2008.
- ## 2. 学会発表
- 1) 川田康介, 小松原亮, 平田典子, 各務美智子, 宇理須厚雄, 中島陽一, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, 食物経口負荷試験における負荷開始量の設定と意義, 第8回, 食物アレルギー研究会 (平成20年, 2月, 東京)
- 2) 近藤康人, 中島陽一, 小松原亮, 川田康介, 柘植郁哉, 宇理須厚雄: 交叉反応のメカニズム, 第57回, 日本小児アレルギー学会秋季学術大会 (平成19年, 11月, 横浜)
- 3) 近藤康人, 小松原亮, 中島陽一, 平田典子, 加藤牧子, 各務美智子, 川田康介, 柘植郁哉, 宇理須厚雄, アレルゲン分析と臨床応用, 第44回, 日本小児アレルギー学会 (平成19年, 平成19年12月, 名古屋)
- 4) 江本 愛, 村上夏菜子, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: ブラックタイガーおよびスルメイカの主要アレルゲン (トロポミオシン) のIgE結合エピトープ解析. 平成19年度日本水産学会春季大会 (平成19年3月, 東京)
- 5) 田中雄太, 江本 愛, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: 貝類の部位別アレルゲン性評価. 平成19年度日本水産学会春季大会 (平成19年3月, 東京)
- 6) 吉田沙織, 市村綾子, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: 魚類パルブアルブミンのIgE反応性に対するCa²⁺の影響および一次構造上のIgE結合エピトープ解析. 平成19年度日本水産学会春季大会 (平成19年3月, 東京)
- 7) 大崎賢一, 小林征洋, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: アニサキス新規アレルゲンの同定および組換えアレルゲンのアレルゲン性評価. 平成19年度日本水産学会春季大会 (平成19年3月, 東京)
- 8) 小林征洋, 嶋倉邦嘉, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: アニサキス主要アレルゲンAni s 1の簡易精製方法の確立および組換えアレルゲンの作製. 平成19年度日本水産学会春季大会 (平成19年3月, 東京)
- 9) 三田 大, 佐藤雄一郎, 濱本翔平, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: Sarcoplasmic calcium-binding protein: 甲殻類の新規アレルゲンとしての同定. 平成19年度日本水産学会秋季大会 (平成19年9月, 函館)
- 10) 鈴木 翠, 小林征洋, 仲田寛樹, 平城由美子, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: クロアワビ新規アレルゲンの精製. 平成19年度日本水産学会秋季大会 (平成19年9月, 函館)
- 11) 吉田沙織, 澤口貴仁, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: 魚類コラーゲン α 鎖の抗原交差性およびニジマスコラーゲン α 2鎖のIgE結合エピトープ解析. 平成19年度日本水産学会秋季大会 (平成19年9月, 函館)
- 12) 小林征洋, 嶋倉邦嘉, 石崎松一郎, 長島裕二, 塩見一雄: アニサキス主要アレルゲンAni s 1のIgE結合に重要なアミノ酸残基の特定. 平成19年度日本水産学会秋季大会 (平成19年9月, 函館)
- 13) 小林征洋, 田中雄太, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: マサバパルブアルブミンの立体構造IgE結合エピトープの解析. 平成20年度日本水産学会春季大会 (平成19年3月, 清水)
- 14) 田中雄太, 戸村聡子, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: マウスモデルにおける改変パルブアルブミンを用いた免疫寛容誘導効果.

- 平成20年度日本水産学会春季大会(平成20年3月、清水)
- 15) 魚住千聖、田中雄太、須磨洋太、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、塩見一雄：アメリカンロブスターの3種トロポミオシンのIgE反応性. 平成20年度日本水産学会春季大会(平成20年3月、清水)
- 16) 鈴木 翠、小林征洋、嶋倉邦嘉、塩見一雄：貝類パラミオシンのアレルゲン性および抗原交差性. 平成20年度日本水産学会春季大会(平成20年3月、清水)
- 17) Doi, H., Shibata, H., Shoji, M., Sakai, S., Akiyama, H. "Innovative ELISA system for the detection of walnut protein in processed foods" 121st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (平成 19 年 9 月)
- 18) 酒井裕美子, 矢野竹男, 内田浩二, 中尾義喜, 石畑公江, 仲野茂, 山田敏広, 酒井信夫, 穂山浩, 米谷民雄 「PCR 法を用いた食品中のクルミの検知法について」 日本食品化学学会第 13 回学術大会 (平成 19 年 6 月)
- 19) 鈴木友紀子, 水谷友海, 中村幹彦, 伊藤敦, 穂山浩, 酒井信夫, 近藤一成, 米谷民雄, 加藤重城, 秋元政信 「水晶発振子(QCM)によるオポアルブミンの検出について」 日本食品化学学会第 13 回学術大会 (平成 19 年 6 月)
- 20) Sakai, S., Matsuda, R., Sato, Y., Adachi, R., Akiyama, H., Shiomi, K., Urisu, A., Maitani, T., Ohno, Y. "Interlaboratory evaluation of two kinds of ELISA kits for the determination of crustacean protein in processed foods" 121st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (平成 19 年)
- 21) 穂山浩 「アレルゲン物質食品表示の現状と検知法」 第 44 回日本小児アレルギー学会総会(平成 19 年 12 月)
- 22) 藤村達也, 松本貴之, 森松文毅, 田辺創一. PCR 法を用いた食品中の鶏肉検知法について, 第 93 回日本食品衛生学会 (平成 19 年 5 月、東京)
- 23) Hasegawa T, Fujimura T, Matsumoto T, Morimatsu F, and Tanabe S. Detection Method of Chicken Contained in Processed Foods by Polymerase Chain Reaction. 53rd International Congress of Meat Science and Technology (平成 19 年 8 月、China)
- 24) 佐藤雅彦, 宗重明美, 沼田正寛, 田辺創一. ELISA 法を用いた食品中の豚肉タンパク質の検出法, 第 54 回日本食品科学工学会(平成 19 年 9 月、福岡)
- 25) 琴浦聡, 中村美幸, 村上友貴絵, 三明清隆, 杉山雅昭, 田辺創一, 成田宏史. ウシミオグロビンに反応する抗体を用いたサンドイッチ ELISA の構築, 第 54 回日本食品科学工学会 (平成 19 年 9 月、福岡)
- 26) 土井啓利, 渡邊恵理子, 柴田治樹, 田辺創一. ELISA 法による食品中のゼラチン検出法の開発について, 第 94 回日本食品衛生学会 (平成 19 年 10 月、静岡)
- 27) 中村美幸, 琴浦聡, 田辺創一, 成田宏史. 免疫学的手法によるウシ・ブタ・トリ肉の判別. 2008 年度日本農芸化学会 (平成 20 年 3 月、愛知)
- 28) 琴浦聡, 中村美幸, 村上友貴絵, 三明清隆, 杉山雅昭, 成田宏史. サンドイッチ ELISA を用いた食品中の牛肉タンパク質の検出. 第 49 回日本食肉研究会 (平成 20 年 3 月、茨城)
- 29) 藤村達也, 松本貴之, 森松文毅. PCR 法を用いた食品中の鶏肉および牛肉検知法について. 第 49 回日本食肉研究会(平成 20 年 3 月、茨城)

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特願 2007-259553；(発明の名称：検体希釈液)
- 2) 特願 2007-180919 号 (発明の名称 エビおよびカニ検出用プライマーセット)
- 3) 特願 2008-24192 (発明の名称 カニ検出用プライマーセット)
- 4) 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)
- 5) 優先権主張出願 特願 2007-256550 (発明の名称 キウイフルーツ定量検知法)
- 6) 特願 2007-219110. (発明の名称 試料中の牛由来成分の検出方法)
- 7) 特願 2007-223224. (発明の名称 ウシミオグロビン部分ペプチドに対する抗体、及び当該抗体を用いた検査方法並びに検査用キット)
- 8) 特願 2007-267550 (発明の名称 加工食品中のブタ肉の検出方法)

II . 分担研究報告

表1；甲殻類アレルギー物質表示比較一覧

ND;no data

日本標準商品分類 甲殻類の中で十脚目を表 示義務とすべき	現行	十脚目	臨床症状の交叉	IgE結合能に基づく交差反応性		RAST (IgE)抑制試験	トロポミオシン		ELISA	PCR法
				相関係数	RAST (IgE)抑制試験		IgE 阻害 Immunoblot	アミノ酸配列の相同性		
7133 えび類 (いせえび・ざりがに類を除く)	○	○	基準	0.94以上	相互に抑制	交差性あり	基準	検出	エビとカニ 二分別 検出可能	
7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類	×	○	ND	0.95 0.85	ND	交差性あり	約90%以上	検出		
7135 かに類	○	○	64.7%	0.90以上	ND	交差性あり	約90%以上	検出		
7136 その他の甲殻類	×	×	21.4%	0.93	抑制+/-	ND	約90%以上	検出	検出せず	
71362 あみ類			ND	ND	ND	ND	ND	検出	検出せず	
71363 おさあみ類	×	×	26.7%	0.93	抑制+/-	交差性あり	約90%以上	検出	検出せず	
71369 他に分類されない甲殻類	×	×	ND	0.91	抑制+/-	交差性あり	ND	検出	ND	
7131 いか類	×	×	17.5%	0.75	抑制+/-	交差性あり	約55%(アワビ類75-80%)	検出	ND	
7132 たこ類			20.3%	0.75	ND	交差性あり	約60%	検出せず	検出せず	

表2;平成17-19年度研究成果 -アレルギー-物質検査法の開発 -

H19年度 完了

		ELISA法						PCR法				検証
抗体	権的抗原	抗体	交叉反応性	感度	定量性	モデル加工食品:回収率	検証	プライマー作製	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・ざりがりに類	良好	良好	エビとカニと分別可能なエビとカニ検知法開発	
頭足類	スルメイカトロポミオシン	モノクロ		良好								
サバ	バルブアルブミン	ポリクロ、モノクロ	区別困難					サバ				
サケ								サケ				
イクラ	β-コンポーネント	ポリクロ	良好									
大豆	GlymBd30K。	ポリクロ	良好	良好	良好	良好	完了	大豆	良好			
クルミ	2Sアルブミン	ポリクロ	良好	良好	良好	良好	完了	クルミ	良好		ピ-カンナッツと交叉反応性(制限酵素で区別可能)	
キウイ	アクチニジン	モノクロ	コーヒ-豆、ブラックペッパーと交叉反応	良好	良好	良好		キウイ	良好			
バナナ	キチナーゼ							バナナ	良好	良好		
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			鶏肉	良好	良好	鶏、鴨、七面鳥と鑑別可能	
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			豚肉	良好	良好	猪肉とは反応。牛、鶏、羊、馬、兎の肉とは鑑別可能	
牛肉	ミオグロビンとウン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			牛肉	良好	良好	良好	
ゼラチン	ゼラチン部分配列ペプチドあるいはウンゼラチン	ポリクロとモノクロ	ブタとウン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)		不可能	-	-	-	-

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

魚類間の交差反応性、アレルギー物質食品表示、アレルゲン閾値、エビ抗原含有食品の
アレルギー惹起性に関する検討

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
	川田 康介	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
	各務美智子	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
	平田 典子	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
	小松原 亮	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
	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 臨床研究センター アレルギー性疾患研究部

研究要旨

1、魚類間の交叉反応性に関与するパルプアルブミン以外の魚肉タンパク質（宇理須）

マグロ単独アナフィラキシーと考えていた患者が同日異科に属するクロカジキの摂食後に同様のアナフィラキシーを生じた。ELISA inhibition で両者にお互いに強い抑制がみられたことから共通抗原性が証明された。両者の共通抗原性の原因タンパクを調べるため immunoblot inhibition を行い、互いに抑制するタンパクを取り出し N 末アミノ酸シーケンスを行った結果トランスフェリンと高い相同性が見られた。この結果、トランスフェリンがホンマグロとクロカジキの共通抗原性に関わっているタンパクであると考えられた。

2、アレルギー物質食品表示に関するアンケート；アレルギー物質食品表示の認知度は 91.7% と高く、その多く（86.2%）が有用性を認めていた。今後、義務化を望む食品は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツの順位であり、エビとカニをたすと 1 位であった。しかし、40.9% の人が判りづらい表示があると回答していた。今後更なるアレルギー物質食品表示の改善が望まれる。

3、乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖には 1g 当たり約 8 μ g の乳タンパク質が含まれる。牛乳アレルギー患者 31 人中 1 人が 3 g（24 μ g 乳タンパク質）乳糖経口負荷試験で陽性となった。今回の経口負荷試験では陽性となる乳タンパク質最低量は 36 μ g であった。また、90% の患者が陰性となる閾値は 3.3mg であった。今後、対象牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

4、アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

32 食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量を FASTKIT エライザ Ver. II で測定した。その中で、クッキー・ビスケットの牛乳タンパク質含有量をみると、0.01mg から 3.4mg と約 300 倍の幅があった。経口負荷試験で陽性となった牛乳タンパク質量に基づきどの含量の食品ならば摂取可能と指導できるようにするためには、さらなる検証が必要である。アレルギー物質含有食品交換表が完成されれば、食物アレルギー患者は表示に自身のアレルギー物質が含まれていても、食べることができる加工食品を見つけることができる。日本の食品表示では表示義務食品は定量的検知法（ELISA 法）が確立している。検知法の応用の 1 つになる。

5、エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

原材料に甲殻類を含まない食品（つみれ、しらす、味付のり、かまぼこ、魚肉ソーセージ、ちくわ、ちりめんじゃこ、佃煮）でも、甲殻類測定キット（ELISA）によって甲殻類抗原が検出される食品の中には、エビあるいはカニアレルギー患者の一部に過敏症状を惹起する場合があることが判明した。症状はアナフィラキシー等の重篤な症状ではなく軽微であった。6 例に関しては含有する甲殻類抗原で症状が出現している可能性があった。しかし、真に甲殻類抗原によって惹起された症状であるか今後の検討が必要である。エビ、カニの表示義務化に向け新たな課題となる。

A. 研究目的

1、魚類間の交叉反応性に関するパルブアルブミン以外の魚肉タンパク質

魚アレルギー患者は通常複数の魚にアレルギーを示すことが多い。その原因としてパルブアルブミン (PA) が関与しているとされている。これ以外に交差抗原に関わるタンパク質は報告されていない。

今回、マグロアナフィラキシーの既往のある患者が、PA 以外のアレルギーの交差反応性によって、クロカジキにアナフィラキシーを生じたと考えられたので、アレルギーの同定を試みた。

2、アレルギー物質食品表示に関するアンケート

消費者を対象にアレルギー物質食品表示に関するアンケート調査を行い、表示制度の有用性、問題点などを明らかにすることによって、表示の改善のための提言をする。

3、乳糖・微量牛乳経口負荷試験

マイクログラムオーダーの経口負荷試験を行うことによって、食物アレルギー惹起閾値決定の予備的研究を行う。また、乳糖のアレルギー性を評価する。

4、アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

牛乳たんぱく質の含量に基づきランク別に食品を分類する。負荷試験陽性抗原量を決定する経口負荷試験の結果で摂取できる食品の指導に使うアレルギー物質含有食品交換表作成の予備的研究を行う。

5、エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

シラス、チリメンジャコ、すり身製品、のりなどにはエビ抗原が微量含まれることが判明した。エビアレルギー患者がこれらを食してアレルギーが惹起されるか検討する。

B. 研究方法

1、魚類間の交叉反応性に関するパルブアルブミン以外の魚肉タンパク質

症例；マグロ(スズキ目サバ科マグロ属)とカジキ(クロカワカジキ：クロカジキ) (スズキ目マカジキ科クロカジキ属) に対してアレルギー(アナフィラキシー) を呈する。同じスズキ目サバ科に属するマサバを食べても無症状。

魚抗原：ギンザケ(サケ目サケ科タイヘイヨ

ウサケ属)、ヤマトカマス(スズキ目カマス科カマス属)、マサバ(スズキ目サバ科マサバ属)、ホンマグロ(スズキ目サバ科マグロ属)、クロカジキ(スズキ目マカジキ科クロカジキ属)、スケトウダラ(タラ目タラ科スケトウダラ属) からの抽出抗原。

ELISA inhibition および Immunoblot inhibition;アレルギー性の共通抗原性の検討。

2、アレルギー物質食品表示に関するアンケート

対象は 933 人(食物アレルギー患児の保護者 366 人、栄養士 116 人、調理師 185 人、保育士 149 人、医師 17 人、その他 100 人。表 2-1 にアンケートの質問用紙を示す。

3、乳糖・微量牛乳経口負荷試験

対象；最近の牛乳負荷試験陽性または牛乳摂取で過敏症状の既往を有する牛乳アレルギー患者 31 例(男児：17 例 女児：14 例)、平均年齢：4 歳 2 カ月、平均総 IgE 値：670 IU/ml、平均牛乳特異的 IgE 値：29.3 UA/ml、アナフィラキシー歴あり：13 例(42%)。

経口負荷試験(図 3-1);乳糖経口負荷試験(乳糖 3g=乳タン白質 24 μg)、牛乳微量負荷試験(乳タンパク質 1.7~333 μg 漸増法)、牛乳普通量負荷試験(乳タンパク質 3.3~2963mg 漸増法、投与全量；牛乳 100mL)。

4、アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

32 食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量を FASTKIT エライザ Ver. II で測定した。

5、エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

表 5-1 に示す質問紙を用い、平成 19 年 9 月から平成 19 年 12 月に関係協力機関に依頼して、健康被害に関する調査を行った。対象を図 5-1、図 5-2 に示す。

C. 研究結果

1、各魚種およびアニサキス抗原を用いた皮膚試験：1 回目のプリック試験はカジキのエピソードの発症前に行った。目(もく)が異なるギンサケやスケトウダラに対するプリック試験は陰性で、同じ目であるが科が異なるカマスも陰性、同じ目同科であるが属の異なるマサバも陰性であった。

2回目のプリック試験はカジキのエピソードのあとに行ったものでホンマグロ以外のクロカジキにも反応がみられた。カジキのエピソードと皮膚試験の結果からカジキアレルギーの合併が考えられた。

ELISA inhibition(図 1-1)：ホンマグロとクロカジキの間で50%以上の強い抑制が相互に見られた。マグロに対するクロカジキ(同目異科)添加による抑制は、マグロと同目同科のマサバより強い抑制が見られた。

Immunoblot inhibition(図 1-2)：患者血清IgEはホンマグロの94kDa, 98 kDaに反応していた。これら高分子のタンパクは抗PA抗体には反応しなかった。また、これらのタンパクに対するIgE結合はクロカジキ抗原の添加により濃度依存性に抑制された。同様の抑制は、クロカジキに対するIgE抗体においてもホンマグロ抗原の添加によってみられた。ホンマグロの94kDaタンパク質をPVDF膜から切り出しN末端アミノ酸配列を決定し相同性検索を行った結果、マダイのトランスフェリンのアミノ酸配列と87.5%一致していた。

2、アレルギー物質食品表示に関するアンケート

①加工食品にアレルギー物質が表示されていることを知っていますか？

91.7%の回答者が表示制度を知っていると回答した。

②日常生活でアレルギー物質の食品表示は役に立っていますか？

役に立っている584人(62.6%)、役に立つ場合と立たない場合がある220人(23.6%)、役に立っていない6人(0.6%)、わからない109人(11.7%)、無回答14人(1.5%)。

③アレルギー物質の食品表示が役に立つのはどんな点ですか？

安心して食品を購入できるようになった49.1%、スーパーなど普通の店でも食品の購入ができるようになった37.4%、食品表示を見て買うようになったら症状がでなくなった7.7%、その他5.8%。

④アレルギー物質の食品表示が役に立っていないのはどんな点ですか？

食べてよいのかいけないのか判りづらい表示がある46.9%。卵、乳など枠外にまとめて表示(一括表示)がされていないので、アレルギ

ー物質が含まれているかわかりにくい22.2%、現行の25品目では表示される食物アレルゲン数が少ないのもっと増やすべきである19.4%、アレルギー物質の食品表示がなされるようになったために、今まで食べられた食品が食べられなくなった4.6%。

⑤食べてよいのかいけないのか判りづらい表示の順位(図 2-1)

加水分解タンパク質、卵殻カルシウム、乳酸カルシウム、乳糖、デユラムセモリナ、乳酸菌、カカオバター、乳化剤、魚介類。

⑥表示義務アレルギー物質と表示推奨アレルギー物質があることを知っていますか？

知っている66.2%、知らない32.3%、無回答1.5%。

⑦表示推奨アレルギー物質はメーカーにとって必ずしも表示の義務がないことを知っていますか？

知っている40.9%、知らない57.6%、無回答1.5%。

⑧表示推奨アレルギー物質の中で表示義務に変更したほうがよいと思う食品原材料はどれですか？(図 2-2)

トップ5は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツだった。

3、乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖負荷試験陽性；牛乳アレルギー患者31人中1人。微量牛乳負荷試験；31人中1人陽性(陽性抗原濃度36 μ g)。牛乳アレルギー患者31人の90%の患者が陰性となる閾値は3.3mgであった(図 3-2)。

4、アレルギー物質含有食品交換表作成の試み
代表例としてクッキー・ビスケットを牛乳タンパク質含量でランク1から3までの3段階に分けた(表 4-1)。

5、エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

エビあるいはカニアレルギー患者の中には、原材料にエビ・カニ等甲殻類を含まない食品の摂取によって症状を呈する例がある。

摂取者に占める陽性率は、多い順につみれ(16.0%)、しらす(12.5%)、味付のり(10.8%)、かまぼこ(9.1%)、魚肉ソーセージ(6.9%)、ちくわ(6.1%)、ちりめんじゃこ(5.7%)、佃煮(3.7%)、焼のり(0%)であった。

症例の詳細な検討では一部データが不足している例もあるが、6例に関しては甲殻類の微量摂取で症状が出現している可能性があった。出現症状としては蕁麻疹、皮膚掻痒と発疹がほとんどで、1例だけ咽喉のイガイガ感を訴えていた。

D. 考察

1. 魚類間の交叉反応性に関与するパルブアルブミン以外の魚肉タンパク質

魚アレルギーでは単独魚種のアレルギーの報告もあるが(Kelso JM, et al. An Allergy Asthma Immunol 1996, Asero R, et al. Allergy 1999)、多くの魚種にアレルギーを示すことが多い(Helbling A, et al. Ann Allergy Asthma Immunol 1999)。この複数の魚種にアレルギーを起こす原因としてPAやコラーゲンが報告されているが、そのほかのタンパク質の関与については報告されていない。

今回、病歴およびプリック試験からマグロ単独魚種によるアナフィラキシーと考えていたが、初めてクロカジキを食べ、同様のアナフィラキシー症状をきたした症例を経験した。この患者の血清を用いて、その症状が両者の共通抗原性によって生じたところをELISA inhibitionおよびimmunoblot inhibitionによって証明した。ホンマグロに対するIgE結合の抑制が、マグロと同目同科に属するマサバより、同目異科であるクロカジキのほうがより強かったことから、魚のアレルギーは魚種の生物学的分類とは必ずしも一致していないことが考えられた。

また、N末アミノ酸配列の相同性検索によってこの両者の共通抗原性を有するタンパクがトランスフェリンと高い相同性を有することが分かった。魚のトランスフェリンはこれまでアレルゲンとして報告されていないことから、今後更なる解析が必要であると思われる。

2. アレルギー物質食品表示に関するアンケート

加工食品のアレルギー物質の表示の認知度は非常に高かった。特に、食物アレルギー患児の保護者や栄養士の認知度は非常に高値であった。また、役立つという回答と、役立つ場合と役立つ場合がない場合があるという回答を合わせ

ると86.2%ということになり、ほとんどの回答者が何らかの有用性があると評価していた。

「アレルギー物質の食品表示が役に立つのはどんな点ですか?」という質問に対して、安心して食品を購入できるようになったが49.1%、スーパーなど普通の店でも食品の購入ができるようになったが37.4%、食品表示を見て買うようになってから食物アレルギーの症状が出なくなったが7.7%と表示の目的が達せられていることが判った。食の安心・安全に大きく貢献しているといえる。

「アレルギー物質の食品表示がなされるようになったために、今まで食べられた食品が食べられなくなった」が4.8%と存在することも判った。

「現行の25品目では表示される食物アレルゲン数が少ないのでもっと増やすべきである」が19.4%と意外に低値であった。

「食べてよいのかいけないのか判りづらい表示がある」が46.9%と多くの人の意見であった。その例としては図2-1に示すように、加水分解タンパク質、卵殻カルシウム、乳酸カルシウム、乳糖、デユラムセモリナ、乳酸菌、カカオバター、乳化剤、魚介類が挙げられた。さらなる広報活動が求められる。

「卵、乳など枠外にまとめて表示(一括表示)がされていないので、アレルギー物質が含まれているかわかりにくい」が22.2%があり、表示の工夫が必要といえる。

回答者が、表示奨励アレルギー物質の中で表示義務に変更してほしいと希望する食品原材料のトップ5は、大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツだった。昨年度の共同会議と今年度の表示部会で、えび・かきが表示推奨から義務化されることになった。えびとかにいずれも上位にきており、消費者の希望にかなった対応といえる。

3. 乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖には1g当たり約8 μ gの乳タンパク質が含まれる。牛乳アレルギー患者31人中1人が3g(24 μ g乳タンパク質)乳糖経口負荷試験陽性となった。頻度は非常に小さいといえる。今回の経口負荷試験では陽性となる最低量は36 μ g乳タンパク質量であった。また、90%の患者が陰性となる閾値は3.3mgであった。今後、

対象牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

4、アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

クッキー・ビスケットの牛乳タンパク質含量をみると、0.01mg から 3.4mg と約 300 倍の幅があることが分かった。経口負荷試験で陽性となった牛乳タンパク質量に基づきどの含量の食品ならば摂取可能であるか指導できるようにするためには、さらなる検証が必要である。

アレルギー物質含有食品交換表が完成し消費者に公開されれば、食物アレルギー患者は表示に自分のアレルギー物質が含まれていても、食べることができる加工食品を見つけることができるようになる。

さらに、測定するアレルギー物質の種類と食品数を増やすことも有用性を高めることになる。日本の食品表示制度では表示義務食品に関しては定量的検知法 (ELISA 法) が確立している。さらに、本研究班で表示奨励食品の多くが検知可能となった。アレルギー物質含有食品交換表作成は、この検知法の応用範囲を広げることになる。

5、エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

原材料表示に甲殻類を含まない食品 (つみれ (16.0%)、しらす (12.5%)、味付のり (10.8%)、かまぼこ (9.1%)、魚肉ソーセージ (6.9%)、ちくわ (6.1%)、ちりめんじゃこ (5.7%)、佃煮 (3.7%)) でも、エビ・カニ抗原測定キットによって検出される食品の中には症状を呈する症例がいることが判明した。

症状はアナフィラキシー等の重篤な症状は認めず、軽微であった。6 例に関しては含有する甲殻類抗原の微量摂取で症状が出現している可能性があった。しかし、真に甲殻類抗原によって惹起された症状であるか今後の検討が必要である。エビ・カニ等甲殻類の表示義務化に向け新たな課題となる。

E. 結論

1、魚類間の交叉反応性に関与するパルプアルブミン以外の魚肉タンパク質

ホンマグロとクロカジキは共通抗原性があることがわかった。この責任タンパクはアミノ

酸配列の相同性検索の結果トランスフェリンであると考えられた。

2、アレルギー物質食品表示に関するアンケート

1) アレルギー物質の食品表示の認知度は 91.7% と高かった。

2) 義務化してほしい食品は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツの順位であり、エビとカニをたすと 1 位であった。

3) 86.2% の人がアレルギー物質の食品表示は役に立つと回答する一方、40.9% の人が判りづらい表示があると回答していた。

4) 今後更なるアレルギー物質の食品表示の改善が望まれる。

3、乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖 (3g、乳タンパク質 24 μ g) による経口負荷試験陽性者は牛乳アレルギー患者 31 人中 1 人であった。牛乳経口負荷試験が陽性となる最低量は乳タンパク質 36 μ g であり、90% の患者が陰性となる閾値は 3.3mg であった。今後、対象牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

4、アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

クッキー・ビスケットの牛乳タンパク質含量をみると、0.01mg から 3.4mg と約 300 倍の幅があることが分かり、ランク 1 からランク 3 までの 3 段階に分類した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mukoyama T, Nishima S, Arita M, Ito S, Urisu A, Ebisawa M, Ogura H, Kohno Y, Kondo N, Shibata R, Hurusho M, Mayumi M, Morikawa A. Guidelines for Diagnosis and Management of Pediatric Food Allergy in Japan. *Allergol Int.* 2007 ;56(4):349-361

2) Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Ohno Y. A Reliable and Sensitive Immunoassay for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods. *J Agric Food Chem.* 2007 14;55(23):9345-9350.