

2008J7054A

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

科学的知見に基づく食品表示に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

(H20-食品-一般-017)

主任研究者 宇理須 厚雄

平成 21(2009)年 4月

目次

I. 総括研究報告書

科学的知見に基づく食品表示に関する研究

宇理須 厚雄 ----- 1

II. 分担研究報告書

1. 健康被害防止のためのアレルギー物質食品表示方法に関する研究

宇理須 厚雄 ----- 13

2. 魚類パルプアルブミンの性状と一次構造特性および非加熱甲殻類のELISA検査法の問題点と改善

塩見 一雄 ----- 24

3. 果実・種実類検知法の開発及びバリデーション

安達 玲子 ----- 33

4. アレルギー表示に関する患者調査

海老澤 元宏 ----- 51

5. アレルギー表示に伴う情報媒体の検討と内容の精査

掘口 逸子 -----56

6. アレルギー表示検査法のバリデーションプロトコールの
ハーモナイゼーションに関する研究

亀山 浩 ----- 57

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 63

科学的知見に基づく食品表示に関する研究

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) 食物アレルギー事例実態調査：食物アレルギーの実態調査を行なうため、延べ450件の事例を集計解析した。原因食品は表示義務食品がほぼ3/4を占めていた。加工食品の外観からは原因食品の含有の有無がわかりにくい食品が21%あった。表示に関連した例は24件あった。その中で、表示の見落としが8件あった。消費者に対して表示をみて購入する習慣づけの啓発が必要である。表示の不備のために発症した事例も12件あった。食品関連企業や販売店への啓発も同時に重要なテーマである。発生場所は自宅54.3%、園・学校11.8%、外食8.9%の順に多かった。発生回数としては、初発エピソードが約半数を占めていた。家庭での発生状況は原材料表示に関連した事例、手に届くところにあった家族の食事を食べてしまった事例が多かった。園・学校では配膳ミスなどが多くみられた。今後、食物アレルギー事例報告書を改訂し、事例収集を再度行い、それらを集計・解析し、場面ごとの具体的な対策マニュアルを作成する予定である。
- 2) 食物アレルギー誘発量の検討：鶏卵は凍結乾燥卵白でも加熱卵白でも初回負荷量である7mgで約10%の患者がアレルギー症状を呈することが判明した。アレルギー症状を惹起する閾値を求めするためにはさらに低濃度の鶏卵抗原を用いた経口負荷試験を行う必要がある。
- 3) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成：アレルギー物質含有量に基づき加工食品を食品群ごとにレベル分けして交換表を作成することを試みた。市販されている80種類の加工食品の卵、牛乳、小麦、大豆、落花生タンパク質の含有量をFASTKIT エライザ ver. II（日本ハム）で測定し、食品1個あたりのそれぞれの含有タンパク質量に基づいて分類した。それぞれのタンパク質含有レベルを検出されず（レベル0）、1 μ g未満（レベル1）から対数で1g（レベル7）までを7段階に、1g以上（レベル8）の9段階に分類した。
- 4) アレルギー物質表示対象食品のアレルゲン性に関する検討：特定原材料に準ずる食品群の中で、「さけ」の範囲は、日本標準商品分類に基づいて決定されているため、陸封性のは対象外になっている。サケ科サケ属に属するさく河性（降海型）であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討をした。魚アレルギー患者血清を用いたIgE結合能の相関係数は、ベニザケ-ヒメマス間が一番高かった。さらに、サケアレルギー患者血清6名でのELISA インヒビションの結果では、ベニザケとヒメマスはお互いに同等（約100%）の阻害率を示した。これらの結果から両魚種のIgE結合能は同等と考えられた。
- 5) 陸封型サケ科魚類のバルブアルブミンの一次構造解析：陸封型サケ科魚類3種のバルブアルブミンのアミノ酸配列は異種の降海型サケ類（タイセイヨウサケ）のバルブアルブミンと高い配列相同性を示したので、同種の陸封型と降海型の間では変異はあってもごくわずかであると予想され、アミノ酸配列の点では陸封型と降海型のバルブアルブミンのIgE反応性は同等と判断された。
- 6) チダイバルブアルブミンの精製および性状：チダイの背側筋肉から、2成分のバルブアルブミン精製されたが、一方のバルブアルブミンは、他方と比べるとIgE反応性はかなり低いことがELISAにより明らかになった。
- 7) 頭胸部を含む非加熱甲殻類のELISA検知法の問題点と改善：非加熱の「えび」および「かに」を丸ごと検体としてELISAキットで測定したとき、頭胸部に含まれるプロテアーゼが抽出操作中にトロポミオシンを分解するために反応性が低下することが判明した。頭胸部を含む非加熱の「えび」および「かに」の測定には、本研究で確立した加熱抽出法が有効であると考えられた。

8) えび及びかに検知 PCR 法のバリデーション: えび・かにをそれぞれ特異的に検知する定性 PCR 法の妥当性を評価した。6 種類のモデル加工食品を用いた外部機関による多機関バリデーションにおいて、厚生労働省通知の基準（陽性試料の陽性判定率 90%以上、陰性試料の陰性判定率 90%以上）を満たすことが示され、えび・かに検知 PCR 法はえび・かにの確認検査法として実用可能であることが確認された。

9) キウイフルーツ検知 ELISA 法の開発: 特定原材料に準ずるものであるキウイフルーツを検知する ELISA 法の開発を行った。平成 17-19 年度の厚生労働科学研究において選択したアクチニジンに対するモノクローナル抗体の組み合わせは、牛肉、豚肉、牛乳、鮭などに対し偽陽性反応を示したため、新たに 5 株の抗変性アクチニジンモノクローナル抗体を調製し検討したところ、偽陽性のない組み合わせが得られた。また、加工食品に対応したイムノクロマトキットでは製品換算で 2 µg/g のキウイフルーツタンパク質が検出できた。

10) バナナ検知 ELISA 法の開発: バナナを検知する ELISA 法の開発を行った。キチンアフィニティカラムとゲル濾過 HPLC を組み合わせることで得られた未変性キチナーゼを用いて抗体作製を行い、5 種類のマウスモノクローナル抗体が樹立された。得られた抗体を組合せ、サンドイッチ ELISA 系を構築した。この ELISA 系を用いてキチナーゼに対する反応性を検討したところ、未変性キチナーゼに対しては優れた反応性を示したが、変性キチナーゼに対する反応性は低かった。

11) アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発: アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量検知法開発に必要な抗体を供給するため、オボアルブミンに対するモノクローナル抗体を調製し、これらの抗体が、未変性オボアルブミンだけでなく変性オボアルブミンに対しても反応性を示すことを確認した。

12) アレルギー表示に関する患者調査: どのようなアレルギー表示が食物アレルギー患者にとって有用かを検討するため、制度施行後の現行の表示について患者を対象にアンケート調査を行った。その結果、食物アレルギー患者におけるアレルギー表示への意識は高く、多くの患者にとって役に立っていたが、一方、その学習機会は少なく、理解度は必ずしも高くなかった。本調査結果から、食物アレルギー患者にとってより理解しやすい表示方法を検討し、正しく食品選択ができるための適切な理解を促すことで、患者のアレルギー物質を含む食品による健康被害を防ぎ、QOL の向上に寄与する。

13) アレルギー表示に伴う情報媒体の検討と内容の精査: アレルギー表示制度の改正に伴い、製造販売事業者向けへの情報提供用媒体の検討をし、既存のハンドブックの改訂をすることとなった。改訂に際しては、NPO 法人食物アレルギーパートナーシップの協力を得て、えび、かにの義務化に伴う留意点を中心に、食品衛生法上での取り扱いや諸外国の状況などについての記述の追加を行った。

14) アレルギー表示検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションに関する研究: 世界各国のアレルギー表示制度の動向を調査した。食物アレルギー表示制度の細部については各国の事情により差異があった。Codex 委員会により食物アレルギー表示が規格化されたこと、欧米において食物アレルギー表示が制度化されたことにより、食物アレルギー表示の制度がグローバル化しつつある。またアレルギー表示の検査法のバリデーションプロトコルをハーモナイゼーションに関する検討を行った。各国の代表とともに、バリデーションプロトコルのハーモナイゼーション案を確立した。確立した国際的なハーモナイゼーション案は我が国で設定されているバリデーションプロトコルとほぼ同様の手法に調整することが可能となった。

A. 研究目的

1) 食物アレルギー事例実態調査:

食物アレルギー患児を持つ患者の会に協力を依頼し、食物アレルギー事例実態調査を行ない、

家庭・園・学校、レストラン・ホテルなど場面ごとで発症した事例を収集、解析し、対応策を検討した。

2) 食物アレルギー誘発量の検討:

鶏卵に対するアレルギー患者を対象に、凍結乾燥卵白あるいは加熱卵白による微量抗原量から漸増する経口負荷試験を行い、アレルギー誘発量を明らかにする。

3) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:

アレルギー物質の表示には、含有量まで記載されていない。そのため、微量なら摂取できる患者でも、原因食品が表示されていると、これらすべての加工食品を摂取できない。そこで、アレルギー物質含有量を測定して、含有量に基づき加工食品をレベル分けしたアレルギー物質含有量に基づいた交換表を作成する。

4) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討:

サケ科サケ属に属するさく河性であるベニサケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性を検討した。

特定原材料に準ずる食品群の中で、「さけ」の範囲は、日本標準商品分類に基づいて決定されているため、陸封性のものは対象外になっている。特定原材料に準ずるものの「さけ」とまったく同一の科に属していながらも陸封性であるため、「にじます、いわな、やまめなど陸封性の魚」はアレルゲン表示の対象から外されている。特に、ベニサケ（さく河性）とヒメマス（陸封性）は同じ *Oncorhynchus Nwrka* という同じ種である。両者のアレルゲン性の比較を試みた。

5) 陸封型サケ科魚類のバルブアルブミンの一次構造解析:

アレルギー表示制度においてサケは特定原材料に準ずる品目として表示が奨励されているが、サケの範囲は降海型のみで陸封型は含まないとなっている。このことが適切であるかどうかを検討するための基礎データとして、陸封型サケのバルブアルブミンの一次構造解析を目的とした。

6) チダイバルブアルブミンの精製および性状:

以前の研究において、バルブアルブミンより分子量が少し大きく一部患者血清と反応するタンパク質（以下、タンパク質 A と呼ぶ）がタイ類に検出されている。タンパク質 A が新規アレルゲンかバルブアルブミンのアイソフォームかを明確にするために、精製・同定することも目指し

た。

7) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善:

すでに開発している甲殻類 ELISA 検査キットでは whole の生エビを測定できないという事例があったので、その原因究明と改善も試みた。

8) えび及びかにに検知 PCR 法のバリデーション:

えび・かにをそれぞれ特異的に検知する定性 PCR 法の妥当性を評価した。

9) キウイフルーツ検知 ELISA 法の開発:

特定原材料に準ずるものであるキウイフルーツを検知する ELISA 法の開発を行った。

10) バナナ検知 ELISA 法の開発:

バナナを検知する ELISA 法の開発を行った。

11) アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発:

12) アレルギー表示に関する患者調査:

食物アレルギー物質を含む加工食品の原材料への表示制度が、食物アレルギー患者にとってアレルギー症状を引き起こさないためにどの程度有用とされているか、また現状での表示制度の問題点について調査した。

13) アレルギー表示に伴う情報媒体の検討と内容の精査:

アレルギー表示制度の改正に伴い、製造販売事業者向けへの情報提供用媒体の検討である。

14) アレルギー表示検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションに関する研究:

各国のアレルギー表示制度の動向を調査した。アレルギー表示の検査法のバリデーションプロトコルをハーモナイゼーションに関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 食物アレルギー事例実態調査:

450 件の食物アレルギー事例を集計・解析した。

2) 食物アレルギー誘発量の検討:

鶏卵に対するアレルギー患者を対象とした経口負荷試験を実施する。負荷量は鶏卵白タンパク質 7mg から漸増し、全量 3.5g (鶏卵 1 個相当) まで投与した。

3) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:

対象食品と測定法: 5 種類の食品群に属する 80 種類の加工食品をランダムに選別し、卵、牛乳、小麦、大豆、落花生タンパク質の含有量を FASTKIT エライザ ver. II (日本ハム) で測定した。それぞれの測定値は商品 1 個あたりのタンパク質含量で表し、含有量別にレベル分類した。

4) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討:

サケ科サケ属に属するさく河性 (降海型) であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討した。

① 魚肉抗原抽出:

② IgE 結合能の測定: ELISA、イムノブロット。

③ 交差抗原性の検討: Inhibition ELISA, Inhibition Immunoblot。

④ 対象魚種: ベニザケ (*Oncorhynchus Nwrka*; さく河性)、これと同種のヒメマス (*Oncorhynchus Nwrka*: 陸封性)、異種のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*: 陸封性)、ギンザケ (*Oncorhynchus Kisutch*: さく河性)、これらとは異なる目に属する魚としてマアジ、ホンマグロを選んだ。

⑤ 対象患者: IgE 結合能の相関関係にはアレルギー患者 50 名の血清。ELISA inhibition と Immunoblot 試験には、さけアレルギー歴を有する 6 名と、さけ摂取歴はないが特異的 IgE が高値のため避けている魚アレルギー患者 2 名を選んだ。

5) 陸封型サケ類のバルブアルブミンの一次構造解析:

陸封型サケ科魚類として、ニジマス、ヤマメおよびアマゴを試料とし、バルブアルブミンの cDNA をクローニングした。さらに、増幅産物の塩基配列解析からバルブアルブミンのアミノ酸配列を演繹した。

6) チダイバルブアルブミンの精製および性状:

精製したバルブアルブミンのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで分析した。

精製したタンパク質 A およびバルブアルブミンの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA により検討した。

7) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善:

試料: 甲殻類は whole で購入可能な非加熱の「えび」7 種類 (ブラックタイガー、クルマエビ、ホッコクアカエビ、アカエビ、サルエビ、サクラエビ、アカザエビ) および「かに」3 種類 (ガザミ、サワガニ、アサヒガニ) を用いた。甲殻類加工品としては釜揚げサクラエビ、素干しサクラエビ、遠赤外線乾燥アキアミ、釜揚げ後に干したクルマエビ、ホッコクアカエビの沖漬け、ホッコクアカエビのすり身、シラエビのすり身およびシバエビのすり身を用いた。

試料溶液の調製: 30 分間加熱抽出法で行った。

ELISA による測定方法: FA テスト EIA・甲殻類「ニッスイ」(日本製薬; 以下、ELISA キットと呼ぶ) を用いた。

8) えび及びかにに検知 PCR 法のバリデーション:

1) えび・かに標準粉末調製:

2) 試料: 白粥、鶏肉団子、フリーズドライ (FD) 野菜スープ、クリームコロッケ、味噌汁、しらたき麺 (えび PCR の場合)、ふりかけ (かに PCR の場合)。陽性試料には、原材料段階でえび又はかに標準粉末を添加し、加工を行った。添加量は終濃度で 10 μ g タンパク質/g となるように調整した。

陽性試料の均一性評価:

試験室間バリデーション:

1. 財団法人食品環境検査協会東京事業所
2. 千葉県衛生研究所食品化学研究室
3. 株式会社ニッポンジーン研究試薬部製品開発課
4. 財団法人日本食品分析センター千歳研究所生物科学課
5. 日本水産株式会社食品分析センター
6. 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
7. 株式会社ハウス食品分析テクノサービス分析サービス部
8. 株式会社ファスマック遺伝子検査事業部

9. 株式会社マルハニチロホールディングス中央研究所
10. 和光堂株式会社商品開発本部開発支援部

9) キウイフルーツ検知ELISA法の開発:

キウイフルーツ検知ELISAキットの偽陽性食品の検証

F(ab)₂化モノクローナル抗体 (以下MAB) を用いた偽陽性食品の検証

変性アクチニジン (以下、D-ACT) 認識MABの新規作製

加工食品に対応したイムノクロマトキット (以下、IC) の検討

10) バナナ検知 ELISA 法の開発:

11) アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発

12) アレルギー表示に関する患者調査:

平成 20 年 12 月に、当院小児科外来受診中の食物アレルギー児の保護者を対象に、現行法に基づくアレルギー表示に対する患者の意識、信頼度、表示法に関する理解度、表示についての学習や問合せ経験の有無、特定原材料に関する満足度、表示法に対する要望などについてアンケート調査を行った。

表示法に関する理解度を問う調査では、現行法に基づいた様々な表記 (『原材料の一部に〇〇を含む』や注意喚起表示など) と、主要原因食物 (鶏卵、牛乳、小麦) それぞれに関する紛らわしい表示への理解度を問題形式で質問した。更に、外食産業におけるアレルギー表示への患者の認識についても調査した。

13) アレルギー表示に伴う情報媒体の検討と内容の精査:

既存の媒体から、これまでアレルギー表示制度創設より関わり精通している3名により、インフォメーションされている内容を検討した。特に目次に着目し、全体構成を再構築した。それをもとに、NPO 法人食物アレルギーパートナーシップ (以下 FAP) 理事を中心として、製造販売事業者向けへの情報提供用媒体ハンドブック案を作成した。FAP は、製造販売事業者や食物アレルギー患者が参画して

おり、そのステイクホルダー間でのギャップを埋める作業をさまざまな場面で行っている。そのため、両者の抱える現状を解決できるような記述とした。

14) アレルギー表示検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションに関する研究:

各国のアレルギー表示制度の動向を調査した。アレルギー表示の検査法のバリデーションプロトコルをハーモナイゼーションに関する検討を行った。

C. 研究結果、考察、結論

1) 食物アレルギー事例実態調査:

アレルゲン進入ルートは、経口以外に、接触や吸入によるケースもあり、食物アレルギーの場合は食事時間以外の学習・遊戯の時間においても注意しなければならないと思われた。

原因食品は、義務表示となっている 7 品目が 3/4 を占めており、このことから、わかりやすく、しかも、正しい表示の徹底や、表示の確認の徹底により、誤食を防ぐことができると考えられた。

食物アレルギー発生場所は自宅、園・学校で多く、両者をあわせると過半数を超えていた。

自宅では、初めて食べて症状が出現する例が多かった。再発を防ぐことが難しいケースも多い一方で、表示に関連するアクシデントや、他の人の料理を触った・食べたなどと、なんらかの対策をたてることにより防げるケースも多くみられた。

自宅の次に多かった園・学校に於いては、友達のものに触った、交換して食べたなどの友達に関連したアクシデントや配膳ミスが多かった。配膳時の対策として、ネームプレートをつける、専用のプレートにのせる、確実に配膳されたことを確認するなど、具体的な対策が家族の意見としてあがっていた。

友達に関連した事例では、他の園児・生徒に食物アレルギーを正しく伝えるなどの対策があがっていた一方で、友達との交流を避けるなど消極的な対策の記載もみられた。

原因食品の性状は、原因食品そのもの、原因食品が容易に想像できるものが、6割を占めており、アレルゲンの入っていることがわかっても、アクシデントが起こっており、アレルゲンを含む食品を手の届くところにおかないなど、アレルゲンを

しっかり回避できる環境も同時に整えていく必要がある。

原材料表示に関連するアクシデントには、アレルギー物質が表示されていなかったり、表示がわかりにくい事例があった。正確でしかも誰にでもわかりやすい表示を考えなければならないと思われた。

店頭販売の食品やレストランでは、外観からの自己判断誤りによる健康被害だけではなく、誤った表示による事故や、店員に確認したにもかかわらずアレルギーが入っていたなど、表示・口頭での確認がかえってアクシデントを招いているケースもある。今後、店頭販売・レストランにおいては店員に対して食物アレルギーに関する教育と患者接客法の研修を行い意識の向上を図る必要がある。今後、アクシデントの起こりやすい状況、それに対する具体的な対策をあげ、家庭、園・学校、レストランなど場面ごとの食物アレルギー対応マニュアルの作成を目指す。

このマニュアルは、食に携わる関係者にとって食物アレルギー対応の具体的な指針となる。食物アレルギー患者の安全を保証し、ひいては、食の安心・安全に貢献すると期待される。アレルギー物質の食品表示の改善にも有用な情報を提示できる。

2) 食物アレルギー誘発量の検討:

鶏卵は凍結乾燥卵白でも加熱卵白でも 7mg で約 10%の患者アレルギー症状を呈することが判明した。アレルギー症状を惹起する閾値を求めるためにはさらに低濃度の鶏卵抗原を用いた経口負荷試験を行う必要がある。

3) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:

今回の測定により、同じ食品群でもタンパク含有量にかなりの幅があることが判明した。摂取できる食品を食品群で指導することは過敏性が強い患者ではアレルギー症状が惹起されるおそれがある。アレルギー物質含有量に基づいた交換表ができれば、異なる食品群でも交換表に基づき、摂取可能な市販加工食品の指導可能であることを示している。

今後は、今回試作した交換表の有用性と信頼性の検討を実際の経口負荷試験から判明した陽性域値と安全に摂取できる市販加工食品と照らし

合わせることを行おう。このようなアレルギー物質含有量に基づいた交換表が完成すれば食物アレルギー患者の QOL 向上に役立つと期待される。

4) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討:

魚アレルギー患者血清を用いた IgE 結合能の相関係数は、同種であるベニザケ(さく河性)・ヒメマス(陸封性)間が一番高かった。サケアレルギー患者血清での ELISA インヒビションの結果、ベニザケとヒメマスはお互いに同等(約 100%)の阻害率を示した。

イムノプロットインヒビションで、それぞれの特異的 IgE 結合能を有するタンパク質バンドは、お互いの抗原添加によって、ほぼ同等に IgE 結合は阻害された。以上から、ベニザケとヒメマスのアレルゲン活性はほぼ同一であると考えられた。

5) 陸封型サケ類のバルブアルブミンの一次構造解析

ニジマスバルブアルブミンとタイセイヨウサケのバルブアルブミン(アイソフォーム 1)との相同性は 96%。ニジマスのバルブアルブミンとヤマメとアマゴのバルブアルブミン(48 残基)は完全に一致した。これまでにアミノ酸配列が明らかになっている魚類バルブアルブミンの配列相同性は 50-80%である。本研究で取り上げた陸封型と降海型のサケ科魚類では同じ魚種だけではなくアミノ酸配列の相同性がきわめて高いことが判明した。主要アレルゲンであるバルブアルブミンの IgE 反応性は陸封型と降海型ではほとんど差がないと判断される。ただし、陸封型と降海型では、環境の違いによってバルブアルブミン含量に違いがあることは考えられるので、アレルゲン性を明確にするためにはバルブアルブミン含量を測定することが望まれる。

6) チダイバルブアルブミンの精製および性状

ゲルろ過および逆相 HPLC により、チダイ背側筋肉に含まれるタンパク質 A およびバルブアルブミンを精製した。タンパク質 A はチダイバルブアルブミンのアイソフォームであると判断した。チダイから精製した 2 種類のバルブアルブミン(ピーク 1 成分およびピーク 2 成分)の IgE 反応性を 14 名の患者血清を用いた ELISA で調べたところ、ほとんどの患者でピーク 1 成分の反

応性がピーク 2 成分より弱かった。チダイバルブアルブミンはバルブアルブミンの IgE 反応性を分子レベルで解析する際のよいモデルとなり得る。

7) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善:

非加熱の whole 試料を ELISA キットで測定できない原因は、頭胸部(特に肝臓)に高濃度に含まれるプロテアーゼにより測定対象タンパク質であるトロポミオシンが分解を受けるためであることを明らかにした。さらに、プロテアーゼの影響を回避するための有効な抽出方法として加熱抽出法を開発した。

各種甲殻類を用いて加熱抽出法を評価した結果、通常抽出法と比較して反応性の改善が確認された。加熱抽出法は抽出液の調製を短縮できかつ抽出効率も良好であるので、非加熱で whole の「えび」および「かに」を測定する際に適した方法であると判断した。

生の whole の甲殻類、あるいは非加熱または加熱の程度が弱い whole の甲殻類加工品では、通常抽出法では ELISA キットでは測定できない。このような甲殻類を ELISA キットで測定する場合、加熱抽出法を採用することが適切である。

8) えび及びかにに検知 PCR 法のバリデーション:

19 年度までの厚生労働科学研究において開発したえび・かにに検知 PCR 法の分析性能を 10 機関による試験室間バリデーションにより評価した。6 種類のモデル加工食品について、ハウス食品(株)と国立衛研との 2 機関プレバリデーションを行った結果、抽出 DNA 濃度の低いもの、OD260/230 値が 2.0 を下回るものも見られたが、PCR は全て問題なく進行することが確認された。バリデーション参加 10 機関には抽出 DNA 溶液を送付した。各機関ではこれを鋳型として PCR を行い、各サンプルについて陽性/陰性の判定を行った。

特定原材料等の定性検査法については、通知検査法において、「特定原材料タンパク質を含む試料についての陽性率は 90%以上、ブランク試料における陰性率は 90%以上」という基準が示されている。今回のバリデーションでは、6 種類のモデル加工食品について、えび PCR の場合は陽

性・陰性判定率ともに 94-100%、かに PCR の場合は陽性・陰性判定率ともに 100%であり、上記の基準を満たす結果が得られた。従って、これらのえび・かにに検知 PCR 法は、えび・かにの定性検査法として実用可能であることが確認された。

現在これらのえび・かにに検知 PCR 法は、えび・かにの確認検査法として通知検査法(最終改正平成 21 年 1 月 22 日 食安発第 0122001 号)に収載されている。

9) キウイフルーツ検知 ELISA 法の開発

キウイフルーツ検知 ELISA キットの偽陽性食品の検証:

新たに選択した MAb の組み合わせによるサンドイッチ ELISA 系では、問題となっていた牛乳、牛肉などの食品との偽陽性反応は認められず、キウイフルーツタンパク質に特異性の高い系を構築できた。今後、キウイフルーツの近縁種について検知できる範囲を調べることで、また、その他食品に対する偽陽性反応の確認を広範に行い、ELISA 系の完成を急ぐ必要がある。

また、ELISA 系では検査に係わる機器が必要であり、個人の手技による検査結果のばらつきなど食品製造現場で簡易に利用することが難しい場合も考えられるため、ELISA 系の構築と並行して、IC の開発も行ってきた。今回、SDS および 2-ME を含む抽出液により加工食品中に含まれるキウイフルーツタンパク質を検出可能な IC を開発し、本 IC を用いることにより、加熱後の食品でも製品換算で 2 $\mu\text{g/g}$ までのキウイフルーツタンパク質を検出可能となった。

以上の結果より、製造現場では平成 17-19 年度の厚生労働科学研究にて開発した N-ACT 検出用 IC、製品検査の簡易検査あるいはスクリーニングに D-ACT 検出用 IC、定量検査用にサンドイッチ ELISA を用いることで、キウイフルーツを効果的に検知できるものと考えられた。

10) バナナ検知 ELISA 法の開発

未変性キチナーゼを抗原として抗体を作製し、測定系が構築できた。今後は変性キチナーゼ抗原に対して反応性を示す抗体の作製を行う必要がある。また、バナナキチナーゼは、他の果実類とのホモロジーが高いため、交差反応性についても検討することが重要である。また、もう一つのターゲット分子候補であるソーマチンライクプロ

テインについても、ELISA系の構築を進める。

11) アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発：

食品事業者が導入することが比較的容易で、安価、迅速、及び簡易な食物アレルギーの検出システムの構築を目指した。本年度は、新規検出システムの開発検討用として、卵タンパク質であるオボアルブミン（OVA）のモノクローナル抗体の調製を行った。本検討で調製した5種のモノクローナル抗体は、変性OVAにも反応する抗体であり、加工食品中の卵タンパク質を検出することも可能であると考えられた。

12) アレルギー表示に関する患者調査：

回答者数は169名、患者の平均月齢は49.3±35.6ヶ月、初発症状の出現時期は10.1±14.1ヶ月で、診断されてからの治療期間は39.2±33.2ヶ月であった。除去品目数は平均2.9±2.5品目で、除去食物は多い順から鶏卵135名、牛乳79名、小麦47名、以下ピーナツ、魚卵であった。そのうち、除去食物が表示義務のある特定加工食品のみの患者は57.0%であった。アナフィラキシーの既往は44.2%の患者でみられ、原因食物の微量摂取での症状出現を80.2%の患者が経験していた。

現行法に対する患者の意識や信頼度

アレルギー表示は97.0%の患者で意識されており、97.0%が表示法は“役に立つ”と回答したが、その表示について“信頼している”と回答した患者は76.4%であった。現行の表示が“わかりやすい”と回答した患者は48.8%であったが、保護者自身が表示を“理解できている”という回答は79.3%にのぼった。しかし、“表示の見間違い”で30.1%、“表示ミス”で13.9%の患者が誤食を経験していた。

現行の表示が“わかりにくい”と回答した患者の理由は“表示が細かすぎて原因食物を探すのが困難”、“メーカーによって表示が異なる”、“表示されている用語がどんな食物からできているかわからない”などがあげられた。現行法では表示の方法がメーカーや商品によって異なることによる患者の混乱があり、特定原材料以外の原材料についても、一定の表示方法への統一が求められていた。

現行法による表示への患者の理解度

主要原因食物（鶏卵、牛乳、小麦）のアレルギー患者にとって紛らわしいと考えられる表示についての患者の理解は必ずしも正しいとはいえなかった。表示からその食品にアレルギー物質を含むかどうか正しい判断ができておらず、本来食べることでできる食品を除去している場合も少なからずみられ、また逆に除去が必要な食品を正しく認識できず、誤食のリスクが高い患者もいた。

不必要な除去や誤食を防止するため、多くの患者が紛らわしいと感じている表記に関してはその表示方法を検討するとともに、患者に表示についての正しい理解を促す必要が示された。

また、加工食品のアレルギー表示と、本来表示法の対象とならない外食産業における表示について、患者の理解が混同し誤解されており、外食でのアレルギー表示や説明に対して、混入の危険性への患者の警戒が低いことが示された。

表示についての学習、問合せ経験

食物アレルギー患者の病院以外の場での表示についての学習の機会は少なく、患者の教育が充分であるとは言えなかった。患者の表示内容に関する疑問の確認方法は、メーカーへ直接問い合わせる場合が多かった。その際のメーカーの対応について患者の満足度は平均的に高かったが、ばらつきもみられ、原因としてメーカーによって未だその対応に温度差があることが示唆された。

特定原材料や表示方法に関する検討

推奨表示に関しては、食物アレルギー患者にとって一定の役割を果たしていたが、特定原材料への期待も引き続き高かった。しかし具体的に特定原材料を追加する要望には、個々の患者の除去食物があげられていたが、現行の特定原材料に追加して特定のものに対する義務化の希望が集積する結果ではなかった。

また、特定原材料の表示については、特別な知識がない場合でも見てすぐにわかるよう、7品目を抜き出してその含有の有無がわかるような表示への要望があげられていた。

13) アレルギー表示に伴う情報媒体の検討と内容の精査：

記述内容として、大きな変更点は、えび、かにが義務表示として加わったことであるが、特にコンタミネーションの部分についての記述を大幅に追加することがよいとした。

また、法令については、昨今の偽装表示事件などから、法律に関する知識は向上したと考えられ、そのためさまざまな表示の法令ではなく、食品衛生法における取扱いについての詳細な記述となった。

また、表示制度は日本から始まったが、アメリカ、カナダ、EUなどの制度についても記述が加えられた。

記述内容として、大きな変更点は、えび、かにが義務表示として加わったことであるが、特にコンタミネーションの部分についての記述を大幅に追加することがよいとした。

また、法令については、昨今の偽装表示事件などから、法律に関する知識は向上したと考えられ、そのためさまざまな表示の法令ではなく、食品衛生法における取扱いについての詳細な記述となった。

また、表示制度は日本から始まったが、アメリカ、カナダ、EUなどの制度についても記述が加えられた。

14) アレルギー表示検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションに関する研究:

国際的なアレルギー表示制度の調査

アメリカ、カナダ、欧州連合 (EU)、オーストラリア・ニュージーランド、アジア (香港、韓国、タイ、台湾等) で食物アレルゲン表示が制度化されている。

我が国の食物アレルゲン表示制度は、その運用面において先導的な立場にあると考えられた。欧州、北米では食物アレルゲン表示制度が定着し、実際の運用状況を受けて制度の改善が行われつつある。食物アレルゲン表示制度の細部については各国の事情により差異があった。

アレルギー表示の検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーション

I. 今回、確立したバリデーションプロトコルのハーモナイゼーション案は、我が国の公定法におけるバリデーションプロトコルと一部を除き同一のプロトコルとなった。

バリデーションの機関数 (Number of laboratories required) は8機関以上で食品マトリックス数、濃度レベルと繰り返し回数 (Number of matrices, concentration levels and replicates required) については、ゼロある

いはブランクを含めた4濃度と2マトリックスとなった。受容基準 (Acceptance Criteria) としては回収率が50% and 150%ということで、我が国の基準と同一ものが採択された。データ解析方法としては Data Analysis for Interlaboratory Studies AOAC method あるいは ISO 5725-2 を推奨している。我が国行ってきたアレルギー表示監視の方法が高く評価されたことになる。

D.健康危険情報

なし

E.研究発表

1.論文発表

1) Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kato M, Kurahashi H, Urisu A, Asano Y, Up-regulated cytokine inducible SH2-containing protein expression in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. Clinical and Experimental Allergy, 1493-1506, 2008.

2) Ando H, Movérare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres M, Urisu A, Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy, J Allergy Clin Immunol. 122, 583-588, 2008.

3) Kondo Y, Ahn J, Komatsubara R, Terada A, Yasuda T, Tsuge T, Urisu. Comparison of allergen properties in salmon (*Oncorhynchus nerka*) from landlocked and anadromous habitats. Allergology International (in press).

4) 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, 穠山浩, 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. 日本食品化学学会誌, 15, 12-17, 2008.

5) Y. Kobayashi, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Ani s I, the major allergen of *Anisakis simplex*: purification by affinity chromatography and functional expression in *Escherichia coli*. Parasitol. Int., 57, 314-319, 2008.

6) 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.*, 10, 709-718, 2008.
- 7) S. Yoshida, A. Ichimura and K. Shiomi: Elucidation of a major IgE epitope of Pacific mackerel parvalbumin. *Food Chem.*, 111, 857-861, 2008.
- 8) 塩見一雄: 甲殻類アレルゲンの分子生物学的解析. *アレルギーの臨床*, 28, 631-637 (2008)
- 9) 塩見一雄: 魚類間および甲殻類・軟体類・昆虫類間の交叉反応性. *臨床免疫・アレルギー科*, 50, 188-195, 2008.
- 10) 塩見一雄: 魚介類アレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患. *アレルギー*, 57, 1083-1093, 2008.
- 11) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畷尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 塩見一雄: 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法に適した抽出法の開発. *食品衛生学雑誌* (投稿中)
- 12) 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. *J AOAC Int*, 91, 123-129, 2008.
- 13) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡道弘, 阿部晃久, 清木典介, 織田浩司, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穠山浩, 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 *日本食品化学学会誌*, 15, 12-17, 2008.
- 14) 安達玲子, 酒井信夫, 穠山浩, 手島玲子, 特定原材料表示と検査法—えび・かきの表示義務化— *ジャパンフードサイエンス*, 47, 27-31, 2008.
- 15) 安達玲子, わが国のアレルギー表示制度と検査法 *月刊フードケミカル*, 2009-2, 19-23, 2009.
- 16) Richard E Goodman, Stefan Vieths, Hugh A Sampson, David Hill, Motohiro Ebisawa, Steve L Taylor & Ronald van Ree: Allergenicity assessment of genetically modified crops—what makes sense?. *nature biotechnology* 26(1) 73-81, 2008.
- 17) Imamura T, Kanagawa Y, Ebisawa M.: A survey of patients with self-reported severe food allergies in Japan. *Pediatr Allergy Immunol*. 19(3) 270-274, 2008.
- 18) 今井孝成, 杉崎千鶴子, 海老澤元宏: アナフィラキシーおよびアドレナリン投与の適応に関する意識調査. *アレルギー* 57(6) 722-727, 2008
- 19) 緒方美佳, 宿谷明紀, 杉崎千鶴子, 池松かおり, 今井孝成, 田知本寛, 海老澤元宏: 乳児アトピー性皮膚炎における Bifurcated Needle を用いた皮膚プリックテストの食物アレルギーの診断における有用性 (第 1 報) —鶏卵アレルギー—. *アレルギー* 57(7) 843-852, 2008.
- 20) 海老澤元宏: シンポジウム 学校におけるアレルギー疾患の管理と支援 今後の具体的取り組みの方向を探る—小児アレルギー科医の立場から. *日本医師会雑誌* 137(4) 42-44, 2008.
- 21) 海老澤元宏, 今井孝成: 食物アレルギーによるアナフィラキシーとその対応. *日本薬剤師会雑誌* 60(10) 63-66, 2008
- 22) Hirohito Yamakawa, Hiroshi Akiyama, Yumi Endo, Kiyoko Miyatake, Shinobu Sakai, Kazunari Kondo, Masatake Toyoda, Atsuo Urisu, and Reiko Teshima, Specific Detection of Buckwheat Residues in Processed Foods by Polymerase Chain Reaction *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 312-316, 2008.
- 23) Morishita N, Kamiya K, Matsumoto T, Sakai S, Teshima R, Urisu A, Moriyama T, Ogawa T, Akiyama H, Morimatsu F, A Reliable Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay for Determination of Soybean Proteins in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6818-6824, 2008.
- 24) Doi, H., Shibata, H., Shoji, M., Sakai, S., Akiyama, H. A Reliable Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay for the Determination of Walnut Proteins in Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7625-7630, 2008.
2. 学会発表
- 1) Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Ikuya T, Yasuda T, Urisu A, Allergen analysis of canned tuna using patient's sera, Congress

of European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 2008. June.

2) Urisu A, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kawada Yasusuke Nakajima Y, Yukawa M, Kondo Y, Tsuge I, Tokuda R, Yamada K, Kimura M, Oral immunotherapy by heated and ovomucoid-reduced egg white to children with hen's egg hypersensitivity, Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 2008, June.

3) 宇理須厚雄、小松原亮、平田典子、各務美智子、川田康介、中島陽一、湯川牧子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、寺西映子、近藤久、アレルギー疾患総合ガイドラインの作成に向けて、食物アレルギーと総合ガイドライン、第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008、6月。

4) 柘植郁哉、中島陽一、小松原亮、平田典子、湯川牧子、各務美智子、近藤康人、山田一恵、木村 守、宇理須厚雄、食物アレルギー研究の最近の進歩、食物アレルギーの寛容誘導法、第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008年、6月。

5) 宇理須厚雄、厳格な除去食療法は食物アレルギーの寛容誘導に必須であるか？ Con の立場から第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008年、6月。

6) 近藤康人、中島陽一、小松原亮、湯川牧子、柘植郁哉、宇理須厚雄、安田俊隆、寺田明彦、サケ(さく河性)とマス(陸封性)の抗原性の相違に関する検討、第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008年、6月。

7) 繁平有希、猪又直子、中河原怜子、小林征洋、塩見一雄、池澤善郎：アニサキスアレルギーにおける精製及び組み換えアレルゲン9種を用いたブリックテストの検討。第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜、2008年11月。

8) 中村和子、猪又直子、大川智子、前田修子、桐野実緒、塩見一雄、池澤善郎：アスピリン1.5gの組み合わせ負荷試験により診断し得たイカの食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの1例。第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、横浜、2008年11月。

9) 原田 晋、塩見一雄、太田國隆、工藤比等志：魚アレルギーの3例一原因抗原解析に関する検討と共に。第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、横浜、2008年11月。

10) Sakai, S., Adachi, R., Akiyama, H., Urisu, A., Teshima, R. Interlaboratory Evaluation of Two Kinds of ELISA Kits for the Determination of Soybean Protein and Walnut Protein in Processed Foods. 122nd AOAC International Annual Meeting & Exposition, 2008. 9.

11) 安達玲子、穉山浩、手島玲子、アレルギー表示の現状と海外の表示制度について 日本食品化学工学会第55回大会、2008年、9月。

12) Ebisawa M : Establishment of food provocation network in Japan. Collegium Internationale Allergologicum 27th Symposium, Curaçao, 2008, May.

13) Ebisawa M, Imai T, Komata T, Yanagida N, Kurosaka N, Tomikawa M, Hasegawa M, Tachimoto H : Natural history of pediatric food allergy in Japan. XXVII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Barcelona, Spain, 2008, June.

14) 海老澤元宏、長谷川実穂、今井孝成、小俣貴嗣、富川盛光、柳田紀之、田知本寛：小児期食物アレルギーの自然歴。第20回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2008年、6月。

15) 今井孝成、海老澤元宏：食物アレルギー診断法の進歩。第20回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2008年、6月。

16) 小俣貴嗣、今井孝成、黒坂了正、柳田紀之、井口正道、佐藤さくら、富川盛光、田知本寛、宿谷明紀、海老澤元宏：食物アレルギーの関与する乳児アトピー性皮膚炎における早期診断の重要性。第20回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2008年、6月。

17) 海老澤元宏、西間三馨 1) : エピベン注射液の使用例の検討。第20回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2008年、6月。

18) 今井孝成、柳田紀之、黒坂了正、小俣貴嗣、富川盛光、宿谷明紀、海老澤元宏：卵白スコア4以上で全卵負荷試験陰性症例の検討。第20回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2008年、6月。

19) 海老澤元宏：医師の立場で。第55回日本栄養改善学会学術総会、鎌倉、2008年、9月。

20) 海老澤元宏：食物アレルギーへの対応について。第30回日本臨床栄養学会総会 第29回日本臨床栄養協会総会 第6回大連合大会、東京、

2008年, 10月.

21)今井孝成, 海老澤元宏: 食物アレルギーにおける食物負荷試験と現状. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

22)今井孝成, 海老澤元宏: 食物アレルギー. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

23)柳田紀之, 今井孝成, 黒坂了正, 佐藤さくら, 井口正道, 小俣貴嗣, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏: 148. 牛乳オープン負荷試験191例の検討. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

24)柳田紀之, 今井孝成, 黒坂了正, 佐藤さくら, 井口正道, 小俣貴嗣, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏: 152. 食物負荷試験の摂取間隔の検討(小麦). 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

25)海老澤元宏: 食物アレルギーの自然歴. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

26)小俣貴嗣, 黒坂了正, 柳田紀之, 井口正道, 佐藤さくら, 今井孝成, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏: ピーナッツアレルギー診断におけるピーナッツ抗原(Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4)の意義. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

27)海老澤元宏: 小児アレルギー疾患の発症・進展・重症化の予防対策について. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008年, 11月.

28)今井孝成, 柳田紀之, 黒坂了正, 井口正道, 小俣貴嗣, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏: 耐性獲得確認のための食物負荷試験の適応判断にはSPTは有益な指標となるのか. 第45回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008年, 12月.

29)林典子, 今井孝成, 長谷川実穂, 黒坂了正, 佐藤さくら, 小俣貴嗣, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏: 食物アレルギー児に対する栄養指導法確立に向けての調査. 第45回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008年, 12月.

30)今井孝成, 海老澤元宏: 学校における対策. 第45回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008年, 12月.

31)海老澤元宏: アナフィラキシーへの対策について. 第45回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008年, 12月.

32)小俣貴嗣, 林典子, 海老澤元宏: 食物負荷試験. 第45回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008年, 12月.

33)長谷川実穂, 林典子, 今井孝成, 富川盛光, 小俣貴嗣, 井口正道, 柳田紀之, 黒坂了正, 佐藤さくら, 宿谷明紀, 海老澤元宏: 不適切な除去食指導を受けていた事例の検討. 第45回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008年, 12月.

34)Hiroshi Akiyama, Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food, 122st. AOAC International Annual Meeting & Exposition, 2008, Sept.

35)田口大夢, 平尾宜司, 亀山浩, 酒井信夫, 手島玲子 「PCR法を用いた食品中のエビおよびカニの識別検出法」 日本食品衛生学会第95回学術大会, 2008年, 5月.

36)渡辺聡, 平尾宜司, 酒井信夫, 安達玲子, 亀山浩, 手島玲子 「PCR法を用いた食品中のモモおよびリンゴの検出法について」 日本食品衛生学会第95回学術大会 2008年, 5月.

37)伊藤歌奈子, 田中裕之, 橋本博之, 員壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 宮本文夫, 亀山浩, 手島玲子 「特定原材料(小麦)検査におけるELISA法とネステッドPCR法との比較」 日本食品衛生学会第95回学術大会 2008年, 5月.

38)田口大夢, 平尾宜司, 亀山浩, 酒井信夫, 坂田こずえ, 手島玲子 「エビおよびカニの識別検出PCR法を用いた市販製品の分析」 日本食品化学学会第14回学術大会 2008年, 5月.

39)亀山浩 「検知法(アレルギー)の最近の進歩について」 第20回日本アレルギー学会春季臨床総会 2008年, 6月.

F.知的財産権の出願・登録状況
なし

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）
科学的知見に基づく食品表示に関する研究
分担研究報告書

健康被害防止のためのアレルギー物質食品表示方法に関する研究

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
柘植郁哉	藤田保健衛生大学医学部 小児科
鈴木聖子	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
平田典子	藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 小児科

研究要旨

1) アレルギー物質表示対象食品のアレルゲン性に関する検討:特定原材料に準ずる食品群の中で、「さけ」の範囲は、日本標準商品分類に基づいて決定されているため、陸封性のものは対象外になっている。サケ科サケ属に属するさく河性（降海型）であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討をした。魚アレルギー患者血清50名を用いたIgE結合能の相関係数は、ベニザケ・ヒメマス間が一番高かった。さらに、サケアレルギー患者血清6名でのELISAインヒビションの結果では、ベニザケとヒメマスはお互いに同等(約100%)の阻害率を示した。これらの結果から両魚種のIgE結合能は同等と考えられた。

2) 食物アレルギー事例実態調査:食物アレルギーの実態調査を行なうため、患者の親の会の協力を得て、延べ450件の事例を集計解析した。尚、回収した事例は表示制度発行前のものが含まれていた。内訳は0歳から25歳にわたり、平均2.7歳±3.2歳、うち男児274人、女児170人であった。発症年齢はこれまでの調査と同様で、乳児期から幼児早期に多かった。原因食品は表示義務食品がほぼ3/4を占めていた。加工食品の外観からは原因食品の含有の有無がわかりにくい食品が21%あった。表示に関連した例は24件あった。その中で、表示の見落としが8件とあった。消費者に対して表示をみて購入する習慣づけの啓発が必要である。表示の不備のために発症した事例も12件あった。食品関連企業や販売店への啓発も同時に重要なテーマである。発生場所は自宅54.3%、園・学校11.8%、外食8.9%の順に多かった。発生回数としては、初発エピソードが約半数を占めていた。家庭での発生状況は原材料表示に関連した事例、手に届くところにあった家族の食事を食べてしまった事例が多かった。園・学校では配膳ミスなどが多くみられた。今後、食物アレルギー事例報告書を改訂し、事例収集を再度行い、それらを集計・解析し、場面ごとの具体的な対策マニュアルを作成する予定である。

3) 食物アレルギー誘発量の検討:鶏卵は凍結乾燥卵白でも加熱卵白でも初回負荷量である7mgで約10%の患者がアレルギー症状を呈することが判明した。アレルギー症状を惹起する閾値を求めするためにはさらに低濃度の鶏卵抗原を用いた経口負荷試験を行う必要がある。

4) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:アレルギー物質含有量に基づき加工食品を食品群ごとにレベル分けし、交換表を作成することを試みた。市販されている80種類の加工食品の卵、牛乳、小麦、大豆、落花生タンパク質の含有量をFASTKIT エライザ ver. II（日本ハム）で測定し、食品1個あたりのそれぞれの含有タンパク質量に基づいて分類した。それぞれのタンパク質含有レベルを検出されず(レベル0)、1μg未満(レベル1)から対数で1g(レベル7)までを7段階に、1g以上(レベル8)の9段階に分類した。

A. 研究目的

1) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討;

サケ科サケ属に属するさく河性であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討;

特定原材料に準ずる食品群の中で、「さけ」の範囲は、日本標準商品分類に基づいて決定されているため、陸封性のもは対象外になっている。そのため、厚生労働省のホームページ上のアレルギー物質を含む食品に関する表示 Q&A、F-13 において、特定原材料に準ずるものの「さけ」とまったく同一の科に属していながらも陸封性であるため、「にじます、いわな、やまめなど陸封性の魚」はアレルギー表示の対象から外されている。特に、ベニザケ（さく河性）とヒメマス（陸封性）は同じ *Oncorhynchus Nwrka* という同じ種である。しかし、これら両者のアレルギー性を比較した検討はこれまで行われておらず、両者を区別する理由に乏しい。そこで6名のサケアレルギー患者血清を用いて両者のアレルギー性の比較を試みた。

2) 食物アレルギー事例実態調査;

これまでの食物アレルギーの実態調査は、医療者側、すなわち主治医からの報告による調査が主体であった。それに対して今回は、食物アレルギー患者を持つ患者の会に協力を依頼し実態調査を行なった。今回の調査の目的は、家庭、園・学校、レストラン・ホテルなど場面ごとで発症した事例を収集、解析し、対応策を検討するためである。

3) 食物アレルギー誘発量の検討;

鶏卵（凍結乾燥卵白）に対するアレルギー患者を対象に、微量抗原量から漸増する経口負荷試験を行い、アレルギー誘発量を明らかにする。

4) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成;

現在、容器包装された加工食品には、義務7品目、推奨18品目に関してアレルギー表示がなされている。しかし、アレルギー物質の表示には、含有量まで記載されていない。そのため、微量なら摂取できる患者でも、原因食品が表示されているすべての加工食品を摂取できない。そこで、アレルギー物質含有量を測定して、含有量に基づき

加工食品をレベル分けしたアレルギー物質含有量に基づいた交換表を作成する。食物アレルギー患者が原因物質を含有する加工食品でも摂取できる食品をみつけることができるようになり、患者の QOL 向上が期待できる。

B. 研究方法

1) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討 (サケ科サケ属に属するさく河性であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討)

①魚肉抗原抽出: 魚肉抗原の抽出はこれまで行なわれてきたのと同様 1 M-KCl PBS バッファーを使用した

②IgE 結合能の測定: 魚肉抗原に対する IgE 結合能の測定は ELISA で行い、血清 IgE が反応するタンパク質バンドに関してはイムノブロットを行ない、それぞれの結果を比較した。

③交差抗原性の検討: 交差抗原性は Inhibition ELISA, Inhibition Immunoblot を使用して検討した。

④対象魚種 (表 1): 今回使用したサケ科魚種を表 1 に示す。さけはベニザケ (*Oncorhynchus Nwrka*; さく河性) を選び、これと同種のヒメマス (*Oncorhynchus Nwrka*; 陸封性)、異種のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*; 陸封性)、ギンザケ (*Oncorhynchus Kisutch*; さく河性)、これとは異なる目に属する魚としてマアジ、ホンマグロを選んだ。

⑤対象患者: IgE 結合能の相関に関しては魚アレルギー患者 50 名の血清を用いて行った。ELISA inhibition と Immunoblot 試験においては、さけアレルギー歴を有する 6 名と、さけ摂取歴はないが特異的 IgE が高値のため避けている魚アレルギー患者 2 名を選んで行なった (表 2)。

表 1 今回抽出した魚種の生物学的分類

Order 目	Family 科	Genus 属	Species 種	Common name *	
Salmoniformes サケ	Salmonidae サケ	<i>Oncorhynchus</i> タイヘイヨウサケ	<i>Oncorhynchus Nwrka</i>	Kokanee ヒメマス ★	
				Red salmon ベニザケ ☆	
				<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout ニジマス ★
				<i>Oncorhynchus Kisutch</i>	Silver salmon ギンザケ ☆
Perciformes スズキ	Carangidae アジ	<i>Trachurus</i> マアジ	<i>Trachurus japonicus</i>	Japanese jack mackerel マアジ	
	Scombridae サバ	<i>Thunnus</i> マグロ	<i>Thunnus thynnus</i>	Bluefin tuna ホンマグロ	

*: ☆: さく河, ★: 陸封

表4: 含有蛋白質量によるレベル分類

	(商品1個あたり)
L8	1000mg以上
L7	1000mg未満
L6	100mg未満
L5	10mg未満
L4	1mg 未満
L3	0.1mg 未満
L2	0.01mg未満
L1	0.001mg未満
L0	検出されず

表2 患者血清の背景

患者 no.	年齢 (歳)	性	サケアレルギー-症状 01-6 他のもによる症状 07,8	特異的IgE抗体	
				U/ml	score
1 IK	1	男	じんま疹	2.25	2
2 IR	1	男	じんま疹	2.20	2
3 KK	2	男	湿疹、痒み	5.55	3
4 UA	4	女	腹痛、嘔吐	75.5	5
5 OK	5	男	腹痛、下痢	>100	6
6 SA	9	女	紅斑、口腔アレルギー-症状	6.17	3
7 KK	1	男	回避(湿疹)	37.7	4
10 TA	6	男	回避(じんま疹)	24.4	4

2) 食物アレルギー事例実態調査:

平成19年に、食物アレルギーがあり、過去にアレルギーによる事例(アクシデント・インシデント)を持つ患児の保護者もしくは本人に無記名でアンケート調査を行い、450件の事例を集計・解析した。

3) 食物アレルギー誘発量の検討:

鶏卵に対するアレルギー患者を対象とした経口負荷試験を実施する。負荷量は乳タンパク質7mgから漸増し、全量3.5g(鶏卵1個相当)まで投与した。

4) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:

①対象食品と測定法: 表5に示す5種類の食品群に属する80種類の加工食品をランダムに選別し、卵、牛乳、小麦、大豆、落花生タンパク質の含有量をFASTKIT エライザ ver. II (日本ハム)で測定した。

表3: 測定加工食品のグループ

クッキー、ビスケット	12種
卵ポーロ	9種
食パン	20種
菓子パン類	24種
ハム、ソーセージ類	15種

それぞれの測定値は商品1個あたりのタンパク質含量で表し、含有量別にレベル分類した。微量のアレルギーに関しては、乳糖負荷(乳タンパクとして24 μ g)での誘発例が数例あったことから1 μ g未満のレベルも考慮してレベル分けした。

C. 研究結果

1) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討

①魚アレルギー患者50名の血清を用いた各魚種に対するIgE結合の比較(図1・表3)

魚アレルギー患者血清50名を用いたIgE結合能の相関係数は、同種であるベニザケ(さく河性)-ヒメマス(陸封性)間が一番高かった。

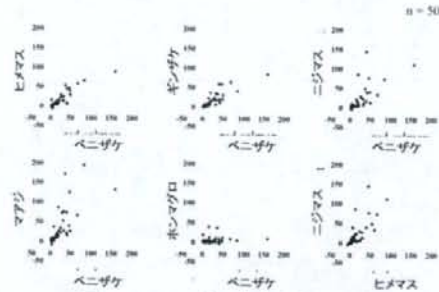


図1: 魚アレルギー患者血清(n=50)各魚種に対するIgE結合能の相関図

表5: 各魚種に対するIgE結合能の相関係数(n=50)

	ベニザケ	ヒメマス	ギンザケ	ニジマス	マアジ
ヒメマス	0.885				
ギンザケ	0.851	0.882			
ニジマス	0.706	0.746	0.849		
マアジ	0.723	0.824	0.700	0.685	
マグロ	0.182	0.281	0.198	0.101	0.332

各魚種IgEの相関係数はベニザケ、ヒメマス間が最も高かった。

②さけアレルギー患者血清を用いたELISA inhibition:

a. 各魚抗原によるさけ IgE 結合能阻害率

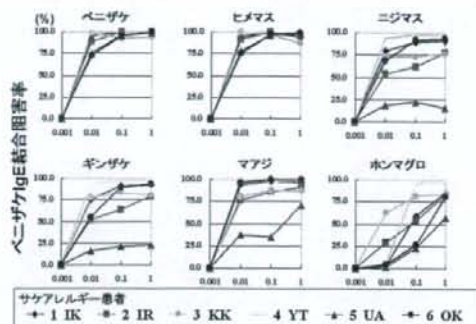


図2-a 各魚抗原によるベニザケIgE抗体阻害率

b. 各魚抗原によるヒメマス IgE 阻害率

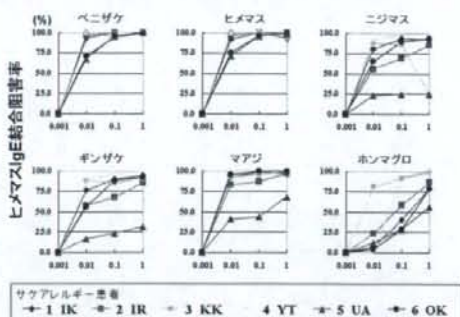


図2-b 各魚抗原によるヒメマスIgE抗体阻害率

各魚種との IgE 結合能競合性の試験では患者により IgE 結合能阻害率に差がみられたが、ベニザケ-ニジマス間ではどの患者も 100%阻害を示した。

③ さけアレルギー患者の血清を用いた immunoblot

表 2 で示した患者血清を用いたイムノブロットの結果を示す

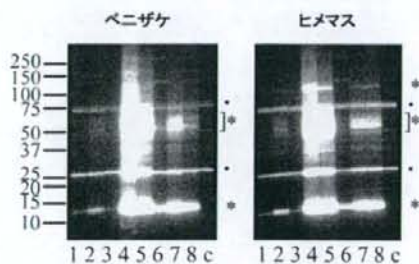


図3 イムノブロット (サケアレルギー6名IgE高値2名:8名の血清)

ヒメマスのイムノブロットではベニザケではみられない高分子タンパク質に対する IgE 結合がみられた。

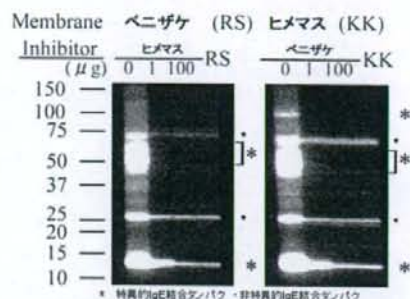


図4 イムノブロットインヒビション (8名プール血清)

Inhibition immunoblot の結果いずれのタンパク質に対する特異的 IgE 結合も互いに阻害しあうことが判明し、ELISA inhibition の結果と総合して、両者のアレルギー性はほぼ同一と考えられた。

2) 食物アレルギー事例実態調査:

発生件数のべ 450 件、うち男児 274 人、女児 170 人。0 歳から 25 歳、平均 2.7 歳±3.2 歳であった (図 5)。

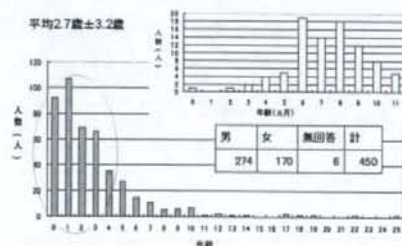


図5 食物アレルギー事例発生年齢

進入ルートは、食べた 87.6%、触った 11.8%、吸い込んだ 0.7%であった (図 6)。

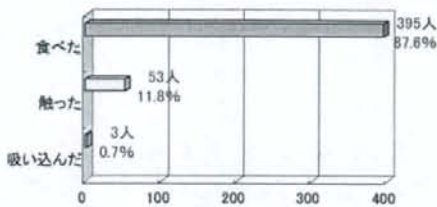
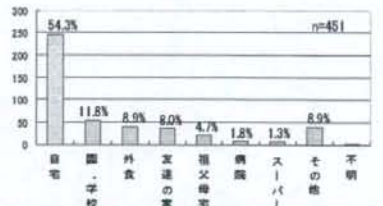


図6 食物アレルギーの進入ルート (複数回答あり)

発生場所は自宅 54.3%、園・学校 11.8%、外食 8.9%、友達の家 8.0%、祖父母宅 4.7%、病院 1.8%、スーパー 1.3%、その他 8.9%であった(図7)。



その他
旅行先、イベント、店舗販売、外出先、託児所、戸外、公園、祭り、鍼灸院、火葬場、デパート、ホーイスカウト、塾、水泳教室、車中、福祉会場、飛行機、講演会、調理実習、ガソリンスタンド

図7 食物アレルギー発生場所

アクシデント発生回数は、1回目が49%、2回目が23%、3回目が8%となっており、4回以上繰り返している例も17%と高い割合になっていた(図8)。

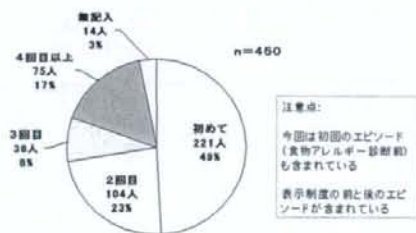


図8 アクシデント・インシデント発生回数

アクシデントにより症状の出現したケースは96%あり、皮膚症状 80.5%、呼吸器症状 37.9%、消化器症状 22.6%、口腔内症状 20.0%、眼症状 15.7%、アナフィラキシー症状 21.1%であった(表6)。

表6 食物アレルギーの症状

症状	人数(人)	割合
皮膚症状(蕁麻疹、発赤、痒み、湿疹など)	363	80.5%
呼吸器症状(くしゃみ、咳、鼻汁、鼻閉、喘鳴、呼吸困難など)	171	37.9%
消化器症状(腹痛、下痢、悪心、嘔吐など)	102	22.6%
口腔内症状(口唇・口の中のビリビリ感・痒み・腫れなど)	90	20%
眼症状(結膜充血、眼瞼浮腫、流涙など)	71	15.7%
アナフィラキシー症状(全身蕁麻疹・呼吸困難・血圧低下・意識障害など)	95	21.1%
その他	8	1.8%
計	900	

食物アレルギーの原因となったアレルゲンは、卵・牛乳・小麦が多く、その3つで、全体の68.4%を占めた(図9)。

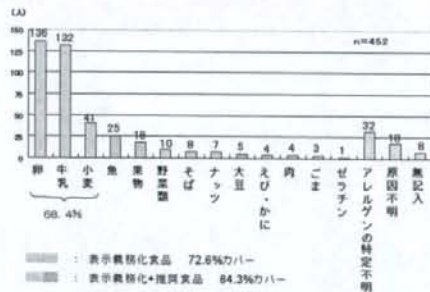


図9 食物アレルギーの原因食品

加工食品のアレルギー表示で必ず表示されなければならない7品目(卵・乳・小麦・えび・かに・そば・落花生)をあわせると、72.6%であった。

原因食品の性状を、原因食品そのもの(ゆで卵、牛乳、バナナなど)、原材料が容易に想像できるもの(茶碗蒸しに入っている卵、クッキーに入っている小麦など)、容易には想像できないもの(大福に入っている卵など)に分類すると、「そのもの」、「想像できるもの」をあわせて62%であった。一方、加工食品の形状からは原因食品の含有の有無がわかりにくい食品が21%あった。(図10)。

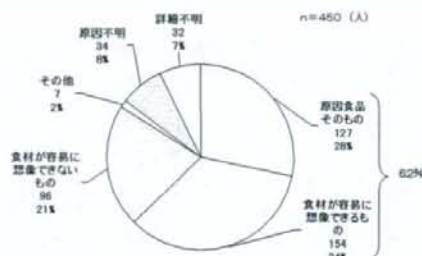


図10 食物アレルギーの原因食品の性状

加工食品の表示に関連した事例を場面別に検討すると、表示に関連した例は24件。うち23件のアレルゲンは、現在表示が義務化となっている特定原材料であった。表示を見落としたという例が一番多く、8件で、どの場所でもみられた。

また、表示されていなかった、表示がわかりにくかった、表示の上にシールが貼ってありみえなかったなど、表示自体に問題がある例が、合わせて12件もみられた(表7)。

表7 加工食品のアレルギー物質に関するアクシデント

	自宅	祖父母宅	園・学校	友達の家	戸外	試食	計
表示を見落とした。	2	1	1	2	1	1	8
表示されていなかった	5		1				6
表示がわかりにくかった	4		1				5
表示の確認を忘れた	2						2
表示の上にシールが貼ってあり、みえなかった	1						1
原因不明	2						2
	16	1	3	2	1	1	24

店頭販売、外食での原材料確認・表示に関するアクシデントは27件であった。店頭販売・外食では原材料表示がないことが多く、見た目からアレルゲンが入っていないと判断し、アクシデントとなる例が10件、また、表示があっても、表示自体に記入漏れなどミスが8件、店員に確認したにもかかわらず、アレルゲンが入っていたが6件となっている(表8)。

表8 店頭販売、外食での原材料確認・表示に関するアクシデント

	店頭販売	レストラン	スーパー	その他	計
表示がないため、見た目からアレルゲンが入っていないだろうと判断し、食べた	3	7			10
表示ミス	4		4		8
店員にアレルゲン入っていないことを確認したが、実は入っていた	5	1			6
表示の確認を忘れた				1	1
事前にアレルゲンなし確認してあったが、症状出現し、同じトングからのコンタミが疑われる		1			1
調理師が表示を見落とした		1			1
	12	10	4	1	27

食物アレルギーの発生場所が最も多い、自宅事例では、初めて食べたが35.1%と多く、次に原材料表示に関連したアクシデント17.6%、他の人の料理を触った・食べたが17.1%、今まで大丈夫だったが今回症状出現14.3%となっていた(表9)。これらの事例に対し家族が患児に対して取った対策(表10-a,b)を示す。

表9 食物アレルギーの発生状況(自宅)

原因	人数(人)	割合
初めて	96	26.1%
原材料表示に誤ったアクシデント	40	17.6%
他の人の料理を触った、食べた	42	17.1%
今まで大丈夫だった	15	6.1%
誤りに食べた	10	6.2%
調理中に触った	7	2.3%
うっかり食べさせた	8	2.4%
人からもらった	8	2.4%
箸・調理器具を誤りなかった	4	1.5%
箸・しゃもじからアレルゲンがついた	3	1.2%
その他	15	6.1%
原因不明	0	2.0%

表10-a 食物アレルギー対策(自宅)

対策	人数(人)	割合
アレルゲンを近づけない	44	13.0%
アレルゲンを家の中に置かない	13	
アレルゲンを家の中に置かない手の届くところに置かない	13	
アレルゲンを食卓料理を作らない	6	
本人の前でアレルゲンを食べない	3	
その他	10	
アレルゲンの確認に対する対策	26	14.7%
原材料をしっかり確認する	21	
疑わしいものは食べない	6	
その他	3	
禁忌食を実施する	26	14.7%
親・兄弟・他の人への対策	24	9.8%
親・家族のアレルギーに対する理解を深める	21	
兄弟で同じものを食べる	1	
他の人の食卓の手洗いを行う	1	
食べ残したものはすぐ片付ける	1	
本人に自覚してもらう	10	6.1%