

200939038A

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物アレルギー患者の
安全管理と QOL 向上に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書
(H21-食品-一般-004)

研究代表者 宇理須 厚雄

平成 22(2010)年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

科学的知見に基づく食物アレルギー患者の安全管理と QOL 向上に関する研究

宇理須 厚雄 1

II. 分担研究報告書

1. 食物アレルギー誘発量の決定とアレルギー物質含有食品交換表の作成に関する研究

宇理須 厚雄 17

2. 食物アレルギー分析の臨床診断への応用に関する研究

伊藤 浩明 26

3. 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造およびクロアワビに見いだされた新規アレルギーの精製・同定

塩見 一雄 30

4. 果実・種実類に含まれるアレルギー物質及び検知法に関する研究

安達 玲子 40

5. 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

海老澤 元宏 55

6. 食物アレルギーへの理解促進を目的としたゲーム教材試作案の開発

堀口 逸子 59

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 61

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I . 総括研究報告

科学的知見に基づく食物アレルギー患者の安全管理と QOL 向上に関する研究
総括研究報告書

研究代表者 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) 食物アレルギーの誘発量の決定：食物アレルギー症状が誘発されうる最小誘発量検討のため、牛乳および鶏卵で微量経口負荷試験を行った。牛乳および加熱鶏卵経口負荷試験陽性者を対象にそれぞれの 90% および 95% の患者が陽性になる値について検討した。牛乳の 90%、95% 陽性値はそれぞれ 1951.5 μ g (牛乳 0.06mL)、285 μ g (牛乳 0.009mL) であった。加熱鶏卵陽性患者 95 名を対象に求めた 90%、95% 陽性値はそれぞれ 719.3 μ g (1/1250 個)、194.5 μ g (1/4500 個) で、最小誘発牛乳タンパク質量は 10 μ g (0.0003mL)、加熱鶏卵タンパク質量は 1.75 μ g (1/500,000 個) であった。牛乳経口負荷試験では 0.1ml 未満の投与で約 14% の患者が陽性となった。加熱鶏卵 (90°C、15 分) では 1/500 個未満で約 20% の患者が陽性となった。この結果は、経口負荷試験の安全性を確保するためには微量からの負荷試験を行った方がよい患者が比較的多いことを示した。今後、微量経口負荷試験で陽性となる患者の特徴を明らかにする必要がある。また、経口免疫療法では、負荷試験が陽性となる閾値を明らかにしないと、治療の開始量を定めることができない。このような閾値を求める経口負荷試験では、初回投与量として微量から開始する必要がある。
- 2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明：小麦アレルギー患児 25 名に加水分解小麦の経口負荷試験を行った結果、12 名 (48%) に陽性反応がみられ、加水分解小麦の安全性は低いことが判明した。
- 3) 臨床診断の精度が高いアレルゲン特異的 IgE 抗体検査の開発
即時型小麦アレルギーに対する、小麦特異的 IgE 抗体検査の診断精度向上のため、小麦特異的 IgE 抗体測定に対して、米アレルゲンによる吸収試験を試みた。
また、大豆のアレルゲンコンポーネント特異的 IgE 抗体検査を評価して、より診断精度の高い検査法を開発することを目的とし検討した。
次に、分子生物学的なアレルゲン分析は以下の項目から構成した。
- 4) 魚類、甲殻類、軟体動物 (貝類) の主要アレルゲンのアミノ酸配列解析と交叉抗原性の検討
甲殻類および軟体動物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が知られている。しかし近年、甲殻類の新しいアレルゲンとして、アルギニンキナーゼ、sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) およびミオシン軽鎖が次々に同定された。本研究では、SCP の IgE 反応性を分子レベルで理解するための基礎情報として、3 種甲殻類 (ブラックタイガー、クルマエビ、ズワイガニ) の SCP の一次構造を cDNA クローニング法により解析した。一方、軟体動物であるクロアワビに 100 kDa の新規アレルゲンの存在が認められた。そこで本研究では、クロアワビから 100 kDa アレルゲンを精製して同定すること、100 kDa アレルゲンの性状や軟体動物における分布を明らかにすることも目的とした。
- 5) アレルギー物質検査法 (えび、かに PCR 法のバリデーション、キウイフルーツ ELISA 法、大豆、キウイフルーツ、バナナ、くるみ PCR 法) の作製
現在の特定原材料 ELISA キットには、2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む抽出用緩衝液が添付されている。しかし平成 20 年 6 月、2-ME が毒物に指定されたため、2-ME に代わる還元剤を用いた抽出液について、ELISA キットメーカー、標準品メーカーとの共同研究により検討を行った。次に、特定原材料に準ずるものでありかつ、口腔アレルギー症候群の原因食品でもあるリンゴについて、その検出法を開発するため、標的となるタンパク質の特性 (品

解析した。また、魚肉すり身を原料とする加工食品を対象としてえび・かにの混入に関する実態調査も行った。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を目的とし、本年度は牛乳の主要アレルゲンであるカゼイン（ α -Casein）のモノクローナル抗体の調製を行った。

ゴマは、特定原材料及び特定原材料に準ずるものではないが、最近症例数が徐々に増加しており、要注意品目である。本研究では11Sグロブリンのエピトープ解析を行った。

- 6) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査：即時型食物アレルギー全国モニタリング調査から得られた表示ミス症例に対して二次調査を行い、本法の表示ミスの現状を把握し、問題を表出した結果、衛生法違反が15名(60.0%)、店頭表示ミスが7名(28.0%)であり、表示ミスの多くが製造・販売元の認識不足や誤解であった。衛生法違反15例のうち、表示の問題を製造・販売元に通報していたのは53%、保健所へ通報していたのは20%であった。
- 7) 食物アレルギー患者を対象としたリスクコミュニケーションのあり方とリスク認知に関する研究：食物アレルギー患者にとっての食物選択時の「危機」をコミュニケーション、いわゆるリスクコミュニケーションによって回避できるようになり、食物アレルギー患者としての疑似体験ができる教材開発を試みた。カードゲーム形式により、試作品が完成した。次年度以降、ゲーム性を高めつつ、アレルゲン除去が可能になるようなルールを添加し、より食物アレルギー患者の食物選択の疑似体験ができるようにし、完成させる。
- 8) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析：食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートを取った結果、主な発生場所は自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの5つのグループに分けられ、その原因は各グループに共通する部分が多いと感じられた。今回これらの事例に対する対策マニュアルを作成するため、場面ごとにアンケートを再構成した。
 - 9) アレルギー物質含有食品交換表（交換表）の作成：牛乳および加熱鶏卵を用いた経口負荷試験から推定安全閾値（積算量）を求め、この値を参考にして交換表から推定安全ゾーンを決定した。実際に安全に摂取可能であるか検討するために、1/1000 から 1/10 の安全係数をかけたレベルの加工食品の摂取における症状誘発率について検討した結果、安全係数が1/10 では25%、1/100 では18%で誘発症状がみられた。交換表を用いれば牛乳や鶏卵に対してアレルギーがある患者でも安全に食べることができる加工食品を見つけることが可能であることが判明した。

A. 研究目的

食物アレルギー患者の安全管理と QOL の向上の目的を達成させるために、図1に示すように3つの側面から食物アレルギーの解析を試みた。すなわち①経口負荷試験の結果に基づいた臨床アレルギー学的な研究、②分子生物学的を中心にしたアレルゲン分析を中心とした研究、③食物アレルギーの疫学調査研究である。

はじめの臨床アレルギー学的な研究は以下の項目から構成した。

1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定

牛乳および、鶏卵アレルギー患者での経口負荷試験の安全性を図る目的で、牛乳あるいは鶏卵アレルギー患者の95%(95%陽性値)あるいは90%(90%陽性値)をカバーする閾値を検討した。

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明

加水分解によって低分子化された小麦のアレルゲン性の解明のため小麦アレルギー患者に対して経口負荷試験を行って、その安全性を確認した。

3) 臨床診断の精度が高いアレルゲン特異的 IgE 抗体検査の開発

即時型小麦アレルギーに対する、小麦特異的 IgE 抗体検査の診断精度向上のため、小麦特異的 IgE 抗体測定に対して、米アレルゲンによる吸収試験を試みた。

また、大豆のアレルゲンコンポーネント特異的 IgE 抗体検査を評価して、より診断精度の高い検査法を開発することを目的とし検討した。

次に、分子生物学的なアレルゲン分析は以下の

項目から構成した。

4) 魚類、甲殻類、軟体動物（貝類）の主要アレルゲンのアミノ酸配列解析と交叉抗原性の検討

甲殻類および軟体動物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が知られている。しかし近年、甲殻類の新しいアレルゲンとして、アルギニンキナーゼ、sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) およびミオシン軽鎖が次々に同定された。本研究では、SCP の IgE 反応性を分子レベルで理解するための基礎情報として、3 種甲殻類（ブラックタイガー、クルマエビ、ズワイガニ）の SCP の一次構造を cDNA クローニング法により解析した。一方、軟体動物であるクロアワビに 100 kDa の新規アレルゲンの存在が認められた。そこで本研究では、クロアワビから 100 kDa アレルゲンを精製して同定すること、100 kDa アレルゲンの性状や軟体動物における分布を明らかにすることも目的とした。

5) アレルギー物質検査法（えび、かに PCR 法のバリデーション、キウイフルーツ ELISA 法、大豆、キウイフルーツ、バナナ、くるみ PCR 法）の作製

現在の特定原材料 ELISA キットには、2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む抽出用緩衝液が添付されている。しかし平成 20 年 6 月、2-ME が毒物に指定されたため、2-ME に代わる還元剤を用いた抽出液について、ELISA キットメーカー、標準品メーカーとの共同研究により検討を行った。次に、特定原材料に準ずるものであつかつ、口腔アレルギー症候群の原因食品でもあるリンゴについて、その検出法を開発するため、標的となるタンパク質の特性（品種間差異や存在状態）を解析した。また、魚肉すり身を原料とする加工食品を対象としてえび・かにの混入に関する実態調査も行った。

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を目的とし、本年度は牛乳の主要アレルゲンであるカゼイン (α -Casein) のモノクローナル抗体の調製を行った。

ゴマは、特定原材料及び特定原材料に準ずるものではないが、最近症例数が徐々に増加しており、要注意品目である。本研究では 11S グロブリンのエピトープ解析を行った。

最後に食物アレルギーの臨床アレルギー的な

研究は以下の項目から構成した。

6) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

今回、医師を対象とした即時型食物アレルギー全国モニタリング調査から得られた食物アレルギー発症症例に対して二次調査を行い、本邦の食物アレルギー事例の現状を把握することを目的として検討した。

7) 食物アレルギー患者を対象としたリスクコミュニケーションのあり方とリスク認知に関する研究

食物アレルギーについてすべての人々が理解をしているわけではなく、学校現場などでは「いじめ」につながっている状況などを耳にする。また、食物アレルギー患者においては、幼少時には、食物選択をその保護者が主として行っているが、十代以降は、患者本人が食物を選択する機会が増える。食物アレルギー患者にとっての食物選択時の「危機」をコミュニケーション、いわゆるリスクコミュニケーションによって回避できるようになり、食物アレルギー患者としての疑似体験ができる教材開発を試みた。

8) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートを取った結果、主な発生場所は自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 つのグループに分けられ、その原因は各グループに共通する部分が多いことが分かった。これらの事例に対する対策マニュアルを作成するため、今回は各場面での共通した原因に関する詳細な情報を拾い出すためのアンケートの改訂版を作成した。

9) アレルギー物質含有食品交換表の作成

アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表（交換表）の信頼性と有用性を検討した。経口負荷試験から求めた推定安全ゾーンを設定し、この値をもとに安全に摂取できるための完全係数について検討した。

B. 研究方法

1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定

牛乳に関しては牛乳 (B) および牛乳 (B) を 2000 倍に希釈したジュース (A) を準備し、牛乳タンパク質量として $10 \mu\text{g}$ から 30 分ごとに微量負

荷試験を実施した。微量負荷試験が陰性であった場合に、牛乳普通量負荷試験を 0.1ml から 30 分ごとに 10 倍量ずつ増量し合計が 100ml に達するまで実施した。

一方、加熱鶏卵に関して準備した加熱鶏卵負荷試験用食品は、90°C15 分加熱全卵（卵タンパク質 875mg）を 100ml のジュースに溶かし、そのうちの 0.1ml（卵タンパク 875 μ g）を 50ml のジュースに希釈したもの（A 液）と、90°C15 分加熱全卵（卵タンパク質 875mg）を 50ml のジュースに溶かした B 液であり、これらを鶏卵タンパク質量 1.75 μ g から 30 分ごとに増量し微量鶏卵負荷試験を行い、卵タンパク質 525 μ g なるまで増量した。微量負荷試験が陰性であった場合に、加熱（90°C、15 分）鶏卵負荷試験を卵タンパク質 1750 μ g=1.75mg から 30 分ごとに 680.75mg に達するまで実施した（普通量経口負荷試験）。

2) 小麦・加水分解小麦負荷試験

小麦アレルギーを疑う患児:45 名(男児 29 名、女児 16 名、平均年齢 3.51 歳) に対し、1 日目は加水分解小麦 1g を漸増法で経口負荷試験を施行した。次に、加水分解小麦陰性の患者に対し、うどん（50~100g）を用い小麦経口負荷試験を施行した。

3) 臨床診断の精度が高いアレルゲン特異的 IgE 抗体検査の開発（小麦と大豆）

小麦アレルギー診断の向上性に関しては、小麦アレルギー患者、小麦感作群、及び小麦耐性群の血清を用いて、ImmunoCAP を用いた吸収試験の予備的な検討を行った。米抗原の吸収には、米 ImmunoCAP からアレルゲンを固相化したディスクだけを取り出して、患者血清とインキュベーションすることとした（ImmunoCAP 吸収試験）。吸収率は、特異的 IgE 抗体価(UA/ml)を用いて $(1 - \text{吸収後 IgE} / \text{吸収前 IgE}) \times 100\%$ として算出し、測定値 < 0.35 は 0 として扱った。

大豆アレルギー診断向上に関しては、主として大豆経口負荷試験で確定診断された大豆アレルギー患者 33 名と、アレルギー症状を認めない大豆感作群 41 名の血清を用い、大豆の代表的な貯蔵蛋白アレルゲンである Gly m5 (b-conglycinin, 7S globulin)、Gly m6 (glycinin, 11S globulin) を単離精製して ImmunoCAP を作成し(Phadia KK., Uppsala, Sweden)、臨床で使用されている大豆粗

抗原(f14)と同時に特異的 IgE 抗体価を測定した。

4) 魚類、甲殻類、軟体動物（貝類）の主要アレルゲンのアミノ酸配列解析と交叉抗原性の検討

3 種甲殻類（ブラックタイガー、クルマエビ、ズワイガニ）の SCP の一次構造を cDNA クローニング法により解析するために、ブラックタイガーおよびクルマエビから尾肉を、ズワイガニから脚肉を採取し、total RNA を抽出した。total RNA から mRNA を精製し、さらに Marathon cDNA ライブラリーを作製した。次に、ブラックタイガー SCP について、5' RACE を行った。5' RACE により明らかになった塩基配列から設計した遺伝子特異的フォワードプライマー (bla-gsp-f) と AP1 プライマーを用いて 3' RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。クルマエビ SCP についても、同じ戦略で 5' RACE および 3' RACE を行い、コードする全長 cDNA の塩基配列を解析した。ズワイガニについては、既報の甲殻類 3 種（コウライエビ *Fenneropenaeus orientalis*、ザリガニ類 *Pontastacus leptodactylus*、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii*）の SCP のアミノ酸配列および本研究で解析したブラックタイガー SCP のアミノ酸配列から保存性の高い領域を選び、2 つのプライマー (crab-f および crab-r) を設計した。2 種類のプライマーとアダプタープライマーとを組み合わせ RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定に関しては、クロアワビの筋肉（5g）を液体窒素で凍結粉碎後ホモジナイズし、遠心分離後に得られた上清を水溶性タンパク質画分とした。沈殿に 20 mL の同じ溶媒を加えて再度ホモジナイズし、遠心分離後に上清を除去し、最終的に得られた上清を塩溶性タンパク質画分とした。これを硫酸塩析後に Bio-Scale CHT2-I カラムを用いたヒドロキシアパタイト HPLC に供し、リン酸緩衝液 (pH 6.8) の濃度勾配 (0.01-0.24 M、30 min) により、流速 1 mL/min で溶出した。精製した 100 kDa アレルゲン (150 μ g) を、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を分析した。

次いでクロアワビから精製した 100 kDa アレルゲン（パラミオシン）およびトロポミオシンの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA により検討した。阻害 ELISA では、患者血清 (1:100 希釈) に等量の阻害剤（パラミオシンまたはトロ

ポミオシン) 溶液 (0.002-20 µg/mL) を添加して 37 °C、2 時間反応後、一次抗体として用いた。

イムノブロットイングおよび阻害イムノブロットイングは 6 種軟体動物(クロアワビ、サザエ、ムラサキイガイ、ホタテガイ、スルメイカ、マダコ) の筋肉を用いて行った。阻害イムノブロットイングでは、患者血清 (1:100 希釈) に等量の阻害剤 (パラミオシンまたはトロポミオシン) 溶液 (20 µg/mL) を添加して 37 °C、2 時間反応後、一次抗体として用いた。

5) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法

ELISA キット用タンパク質抽出液の改良に関して、「0.5% SDS 及び 2% 2-ME」という部分を「0.6% SDS 及び 100 mM 亜硫酸ナトリウム」に置き換えた抽出液を調製し、一次標準粉末からの抽出を行った。標準品規格に従い、各品目の一次標準粉末に抽出液を加えて一晩抽出し、不溶物を遠心分離及びろ過によって分離し、標準品原液とした。この標準品原液について、2-D Quant kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) によりタンパク定量を行い、また SDS-PAGE 電気泳動像を確認した。同時に現行の 2-ME 含有抽出液による抽出も行い、亜硫酸ナトリウム含有抽出液との比較を行った。

次いで、リンゴに含まれるアレルゲンタンパク質のうち、Mal d 1 及び Mal d 4 について、検出用抗体を作製した。9 種のリンゴ(サンフジ、ジョナゴールド、王林、サンムツ、シナノ、ムツ、世界一、インド、紅玉) について、果肉部及び果皮部における Mal d 1 及び Mal d 4 の含有レベルを上記の抗体を用いて解析した。また、リンゴ抽出液における Mal d 1 及び Mal d 4 の含有レベルについても解析した。市販のリンゴジュースについても解析を行った。

魚肉すり身のえび・かにの混入に関する実態調査のための加工食品として、ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げの 4 種について、通常の市販製品からそれぞれ 12 製品を購入し、2 種類の ELISA キット(甲殻類キット「マルハ」(マルハニチロ食品社製、以下 M キット) 及び FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日本製薬社製、以下 N キット) による定量検査、及び、PCR による確認検査を行った。

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を目的としたカゼイン (α -Casein) のモノクローナル抗体の調製は、まず α -Casein をラットに免疫し、ハイブリドーマを作製した。未変性状態の Casein を 96well プレートにコーテ

ィングし、ハイブリドーマ培養上清の反応性を確認した。また、Casein 溶液と等量のサンプル PBS を混合し、95°C で 5 分間加熱した変性サンプルを調製し、ELISA で培養上清の反応性を確認した。これらの結果に基づいて未変性、変性両方のタンパク質に対して反応するクローンを選別した。

ゴマアレルゲン解析のため、栽培用の種子ゴマ、及び食用の洗いゴマ、煎りゴマについて、それぞれ黒ゴマ、白ゴマ、金ゴマの市販品を購入し、これらのゴマから抽出タンパク質溶液を得た。この抽出液を非還元条件下電気泳動し、タンパク質染色及びウェスタンブロットイングを行った。ゴマアレルギー患者血清と反応させた。

6) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

対象は、平成 20 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査にて、即時型食物アレルギー症状の発症原因が“表示ミス”で返信があった 63 名 (41 施設) とし、2 次調査を郵送法で平成 21 年 11~12 月に行った。調査内容は患者背景 (年齢、性別、事故当時の除去食物)、表示ミスの原因食物と具体的な食品名、ミスの原因と発覚した理由、事故後の対応として製造・販売元への指摘と対応、保健所への指摘と対応などとした。

7) 食物アレルギー患者を対象としたリスクコミュニケーションのあり方とリスク認知に関する研究

教材利用の目的は食物アレルギー患者にとって食物選択時に起こる「危機」への対応として、どのように食事を選択すればよいのか、またどのようなアレルゲンがあるのか、また食物アレルギー患者としての疑似体験による理解促進を目的に教材を開発した。

8) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

これまで食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートの結果解析に基づき、場面ごとにアンケートを再構成した。

9) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成と安全係数の検討

約 100 種類の加工食品の卵、牛乳、小麦、大豆、落花生のアレルゲンタンパク質含有量を FASTKIT エライザ ver. II (日本ハム) で測定し、そのうち食品群ごとにわけ、以下に示す 80 種類

を分類し、交換表を作成した。

クッキー・ビスケット：12 種類、卵ボーロ：9 種類、食パン：20 種類、菓子パン類：24 種類、ハム・ソーセージ類：15 種類。

牛乳および鶏卵経口負荷試験の結果から推定安全量（積算）を求め、この値から推定安全ゾーンを決めた。この推定安全ゾーンを参考にして、1/1,000 から 1/10 の安全係数をかけたレベルの加工食品を患者に摂取してもらいその安全性を検討した。

C. 研究結果、考察、結論

1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定に関する研究

牛乳陽性患者 72 名を対象に求めた 90%、95% の患者をカバーするの陽性抗原閾値はそれぞれ 1951.5 μ g (牛乳 0.06mL)、285 μ g (牛乳 0.009mL) で、加熱鶏卵陽性患者 95 名を対象に求めた 90%、95% 陽性抗原閾値はそれぞれ 719.3 μ g (1/1250 個)、194.5 μ g (1/4500 個) であった。また牛乳と加熱鶏卵に関して最小誘発量は、それぞれ 10 μ g (0.0003mL)、1.75 μ g (1/500,000 個) であった。牛乳や鶏卵アレルギー患者の 90% をカバーする値 (90% 陽性値) や 95% をカバーする値 (95% 陽性値) をみると、ほとんどの患者が 10 μ g を超える量で症状が惹起されることが判明した。しかし、ごく一部の患者は非常に微量でも症状が惹起され、最小誘発量を決定することには限界があることも判明した。

牛乳経口負荷試験では 0.1ml 未満の投与で約 14% の患者が陽性となった。加熱鶏卵 (90°C、15 分) では 1/500 個未満で約 20% の患者が陽性となった。この結果から、経口負荷試験の安全性を確保するためには微量からの負荷試験を行った方がよい患者が比較的多いことが示された。

今後、微量経口負荷試験で陽性となる患者の特徴を明らかにする必要がある。また、経口免疫療法では、負荷試験が陽性となる閾値を明らかにしないと、治療の開始量を定めることができない。このような閾値を求める経口負荷試験では、初回投与量として微量から開始する必要がある。

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明

小麦アレルギーを疑う患児：45 名 (男児 29 名、女児 16 名、平均年齢 3.51 歳) に対し、加水分解小麦を経口負荷試験し、陽性だった患児は、男

児 9 名、女児 3 名であった。陰性であった患者に、うどん (50~100 g) を用い小麦経口負荷試験を施行した結果、小麦陽性の患児は男児 4 名、女児 9 名であった。以上の結果から小麦アレルギーの患児 25 名のうち加水分解小麦陽性患児は 12 名 (48%) であり、加水分解小麦のアレルゲン性は残存していることが判明した。小麦アレルギー患者が加水分解小麦を摂取できるかどうかは経口負荷試験が必要であることが判明した。

3) 臨床診断の精度が高いアレルゲン特異的 IgE 抗体検査の開発 (小麦と大豆)

米 IgE 抗体の吸収率は、小麦アレルギー患者 10 例では、小麦 IgE は米ディスクによって平均 19.2 \pm 6.7% 吸収された。一方、小麦アレルギーの既往はあるが耐性獲得した血清では、吸収率 74.1% 及び 28.2%、小麦アレルギーの既往がない血清 3 では 100% の吸収が確認された。今後症例数をさらに増やして小麦アレルギーの既往がない小麦感作血清や、小麦アレルギーの耐性獲得後の血清を検討する予定である。

Gly m5 及び Gly m6 特異的 IgE 抗体は、大豆アレルギー患者全例で検出され、いずれも大豆 (f14) 特異的 IgE 抗体価と強い相関関係を認めた。

大豆アレルギー群と大豆感作群の間には、大豆及び Gly m5 特異的 IgE には有意な抗体価の差を認めた ($p < 0.01$) が、Gly m6 では抗体価の差を検出できなかった。重症者はいずれも大豆感作群よりも有意に高い抗体価を示したが、重症者と軽症者の抗体価は大豆のみで有意な差 ($p < 0.01$) を認めた。今回の結果、代表的な大豆の貯蔵蛋白である Gly m5/m6 が主要なアレルゲン成分であることは確認できたが、残念ながら診断精度の向上には結びつかなかった。この理由の一つとして、糖鎖構造 (Cross-reacting carbohydrate determinant, CCD) が含まれている可能性が考えられる。CCD を認識する抗体成分を吸収した血清を用いて、大豆又はそのコンポーネントに対する抗体価を測定することで、診断精度の向上が図れる可能性があり、来年度以降の検討課題としたい。さらに、大豆の Gly m5 と Gly m6 と、それに相当するピーナッツ主要アレルゲン Ara h1 及び Ara h2/h3 との関連に着目して、これら豆類アレルゲンの診断精度向上も検討していきたい。

4) 魚類、甲殻類、軟体動物 (貝類) の主要アレ

ルゲンのアミノ酸配列解析と交叉抗原性の検討

RACE 法により、3 種甲殻類(ブラックタイガー、クルマエビおよびズワイガニ)の SCP をコードする全長 cDNA をクローニングし、塩基配列解析により全アミノ酸配列(いずれも 192 残基)を決定した。3 種甲殻類 SCP のアミノ酸配列の比較で、ブラックタイガーとクルマエビの SCP はお互いに 96.3%と高い配列相同性を示した。ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP はザリガニ類 SCP とは約 80%、ズワイガニ SCP とは約 87%の相同性を、ズワイガニ SCP は他の甲殻類 SCP と 85-90%の相同性を示すというように、各種甲殻類の SCP はお互いに類似していた。一方、甲殻類と軟体動物(貝類)の SCP との間の相同性はわずか 10-21%で、非常に低かった。イムノブロッティングおよび阻害イムノブロッティング実験の結果から、エビ類(とくにクルマエビ類)の SCP の IgE 反応性は強くかつお互いに抗原交差性を示すが、カニ類および軟体動物の SCP の IgE 反応性は陰性または非常に弱いと考えられた。しかし、IgE 反応性が陰性と判断されたズワイガニ SCP の場合、そのアミノ酸配列はエビ類 SCP と非常に類似していた(85-90%)。他のカニ類の SCP のアミノ酸配列は今のところ不明であるが、少なくともズワイガニ SCP はカニ類 SCP 同様に IgE 反応性を示すと考えられる。以前のイムノブロッティングでカニ類 SCP の IgE 反応性がみられなかったのは、カニ類における SCP 含量が低いためであったと推定される。いずれにしても今後は、エビ類 SCP の IgE 結合エピトープを解析することがまず望まれる。それとあわせて、甲殻類(とくにカニ類) SCP の配列データの蓄積、甲殻類における SCP 含量の測定も必要である。

クロアワビに見いだされた 100 kDa アレルゲンは大部分が塩溶性タンパク質画分に回収されたので、塩溶性の筋肉タンパク質の 1 成分と考えられた。精製した 100 kDa アレルゲンのアミノ酸配列から、クロアワビのパラミオシンであると結論した。

クロアワビから精製したパラミオシンおよびトロポミオシンの IgE 反応性を、18 人の甲殻類アレルギー患者の血清を用い調べた。トロポミオシンに対する陽性反応は 16 人もの多くの患者で認め、トロポミオシンに陽性反応を示した 16 人の患者はすべてクロアワビのパラミオシンに対しても反応した。この結果からパラミオシンはト

ロポミオシン同様に主要アレルゲンであると判断された。軟体動物の場合、トロポミオシン以外のアレルゲンの同定例はない。その意味で、パラミオシンは軟体動物の第 2 のアレルゲンである。

6 種軟体動物の非加熱抽出液で、37 kDa タンパク質(トロポミオシン)は種類によらず、100 kDa タンパク質(パラミオシン)は少なくとも 4 種(クロアワビ、サザエ、ムラサキイガイ、マダコ)で IgE 反応は陽性であった。加熱抽出液の場合、トロポミオシンは 6 種で、IgE 陽性反応を示したが、SDS-PAGE およびイムノブロッティングのいずれにおいても、パラミオシンは検出されなかった。

患者血清を予めクロアワビパラミオシンとインキュベートすると、軟体動物パラミオシンとの反応は完全に消失し、さらにトロポミオシンとの反応も消失または減少した。また、患者血清を予めクロアワビトロポミオシンとインキュベートした場合、軟体動物トロポミオシンとの反応だけでなく軟体動物パラミオシンとの反応も完全に消失した。パラミオシンとトロポミオシンの間の抗原交差性の検討で、患者血清とパラミオシンとの反応および患者血清とトロポミオシンとの反応は、いずれもトロポミオシンおよびパラミオシンによって阻害された。阻害の程度は、いずれにおいてもトロポミオシンの方がかなり強かった。

この結果は、パラミオシンはクロアワビ特有のアレルゲンではなく、少なくとも数種軟体動物の間で交差性を示すアレルゲンであることを示している。それにも関わらず、これまでの軟体動物アレルゲンに関する研究においては見落とされてきた。これまでの研究では、沸騰水で加熱調理した試料のホモジネイトから調製した加熱抽出液、または生試料のホモジネイトを加熱して調製した加熱抽出液が用いられてきた。トロポミオシンは耐熱性であるので、イムノブロッティングにより加熱抽出液中でも容易に検出できるし、クロマトグラフィーによって加熱抽出液から容易に精製できる。それに対してパラミオシンは、本研究で明らかにしたように加熱に対しては不安定で変性不溶化する。そのため、もっぱら加熱抽出液を用いてきたこれまでの研究では見落とされたと考えられる。

パラミオシンは無脊椎動物特有のタンパク質で、すでにダニやアニサキスではアレルゲンの一つとして同定されている。パラミオシンはかなり易熱性であるので、加熱調理した軟体動物による

アレルギーにはトロポミオシンほど寄与していないと予想される。しかし、生食の習慣があるわが国では軽視できないかもしれない。また、パラミオシンは、軟体動物を扱っている労働者における接触アレルギーや軟体動物摂取による口腔アレルギー症候群に関与することは十分に考えられる。軟体動物に起因するアレルギー症状を考える際には、今後はトロポミオシンとともにパラミオシンも念頭においておく必要がある。

阻害イムノブロットングおよび阻害 ELISA により、パラミオシンとトロポミオシンの間の抗原交差性が証明された。この非常に興味深い現象を分子レベルで説明するためには、クロアワビのパラミオシンとトロポミオシンの IgE 結合エпитープを解析し、比較することが必要である。また、各種無脊椎動物のパラミオシンの IgE 反応性と一次構造に関する知見の集積も望まれる。

5) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法

各特定原材料一次標準粉末から調製された標準品原液のタンパク定量の結果、卵、牛乳、小麦、甲殻類では、現行の 2-ME 含有抽出液を用いた場合と亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた場合で大きな差は見られなかったが、そば、落花生では、亜硫酸ナトリウム含有抽出液の場合のタンパク定量値が、2-ME 含有抽出液の場合と比較してやや減少していた。どの品目の場合も、タンパク質の泳動パターンについて両抽出液間で大きな差は見られなかった。今後は、亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いて調製した標準品を ELISA キットに適用し、検量線及び実際の食品の測定値等を 2-ME 含有抽出液を用いた場合と比較して、亜硫酸ナトリウム含有抽出液の妥当性を検討していく。

リンゴのアレルゲンタンパク質 Mal d 1 及び Mal d 4 についてウサギポリクローナル抗体を作成し、リンゴ果実及びジュースにおける含有レベルを検討した。品種間での量的変動は多少見られたが、どの場合もほぼ一定レベルで Mal d 1、Mal d 4 が含有されていることが示された。但し、含有量は Mald4 の方が一定している傾向にあった。また、Mal d 1 については、透明タイプのジュースよりも濁っているタイプのジュースの方が含有量が高いことが判明した。リンゴ抽出液に関しては、Mal d 1、Mal d 4 ともに、遠心上清にはほとんど存在せず、沈殿に含まれていた。今回の結果から、Mal d 1、Mal d 4 いずれの抗原も、検知用の標的抗原として適用可能と考えられた。し

かしながら、Mal d 1、Mal d 4 ともに可溶性抗原として知られているにもかかわらず、繊維(パルプ)とともに沈殿しやすいことに留意する必要がある。今後、特異性の高いモノクローナル抗体との組み合わせによってサンドイッチ ELISA 検出系の構築が可能と考えられた。

魚肉すり身製品の代表的な加工方法である“焼く”、“ゆでる”、“蒸す”、“揚げる”にそれぞれ対応する製品として、ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げを対象とし、それぞれ12種類を検体とした。

ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げの4種の魚肉すり身加工食品において、ELISA 法陽性率はそれぞれ 83%、50%、75%、92%、えび PCR 法陽性率はそれぞれ 92%、50%、83%、67%であり、比較的高い陽性率であった。しかし、ELISA 法で 5 µg/g 以上 10 µg/g 未満であったものはさつま揚げ1検体、10 µg/g 以上であったものもさつま揚げ1検体のみであり、甲殻類タンパク質の含有量としては少ないものがほとんどであった。PCR 法で陽性となったのはほとんどがえび PCR 法であり、かに PCR 法で陽性となったのはさつま揚げ1検体のみであった。今回の結果から、魚肉すり身を原料とする加工食品には比較的高い割合で甲殻類が混入しているが、その約半分は含有量が 1 µg/g 未満と少ないこと、また、ほとんどの場合はえびが混入していることが示された。

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に関して、各クローンの培養上清の反応性を、未変性Caseinと変性Caseinを用いて確認したところ、良好に反応する4種クローン(2G12、3B11、3G6、2G7)が得られた。すべて未変性Caseinと変性Caseinの両方に反応した。これら4種のモノクローナル抗体は、未変性Caseinのみでなく変性Caseinにも反応する抗体であり、加工食品中の牛乳タンパク質を検出することが可能であると考えられる。また、モノクローナル抗体であるため半永久的な供給が可能であり、新規検出システムへの安価な抗体供給が見込まれる。

今年度は、牛乳のα-Caseinのモノクローナル抗体の調製を目的に、ハイブリドーマ作製を行った。今後は、得られた抗体を組み合わせることにより、安価、迅速、簡易な食物アレルゲンの検出システム構築を目指して検討を進める。

ゴマアレルゲンの解析のため、栽培用の種子ゴマ、食用の洗いゴマ、煎りゴマについて、それぞれ黒ゴマ、白ゴマ、金ゴマの市販品を購入し、それぞれタンパク質を抽出して電気泳動を行った結果、50 kDa付

近の2本のバンド(11Sグロブリン)と、15 kDa付近のバンド(2Sアルブミン)がみられた。各ゴマの比較において、タンパク質電気泳動像に大きな違いは見られなかった。ゴマ負荷試験陽性患者血清を用いたウェスタンブロットニングの結果、血清中のIgE抗体は、11Sグロブリン、2Sアルブミンに強く結合した。患者血清中のIgEは11Sグロブリンの4種のアイズフォームのうち、アイズフォーム2(Ses i 7)よりもアイズフォーム1(Ses i 6)に対して強く反応したことから、アイズフォーム1(Ses i 6)に特徴的なエピトープに強く結合するものと考えられる。

6) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

調査票は回収率が70.7%(31/41施設)であり、41名(61.9%)が集積された。このうち医師や患者の誤解や勘違いなどの16例を除いた25名を分析対象とした。

対象年齢は 3.3 ± 2.1 歳、男女比は1.5(15/10)であった。除去品目数は一人当たり 1.8 ± 0.9 品、鶏卵21名、牛乳12名、小麦5名、その他7名であった。

表示ミス内訳は衛生法違反が15名(60.0%)、店頭表示ミスが7名(28.0%)、詳細不明が3名であった。食品別には牛乳と鶏卵が各10例で最も多く、以下小麦、ピーナツが続いた。

表示ミスが発覚した理由は、“症状が現れないはずの食品表示で症状が誘発されたため”が17例、“原因不明の症状を精査する過程”が6例、“記入なし”が2例であった。

表示ミスの原因は、“食品会社がアレルギー表示法を認識していなかった”が6例、“原因食物の混入”が5例、“食品会社がアレルギー表示法を誤解していた”が4例、“原料の変更に対応せず、記載もれ”が3例、“店頭販売なのでもともと記載なし”が2例、“不明”が1名、“記入なし”が4例であった。

表示ミス25例のうち、製造・販売元への問題の通報が行われていたのは15例(60.0%)、通報していなかったのが8例(32.0%)、未記入が2例であった。

事業所へ問題を通報した15例のうち、先方の対応や説明に対して、“非常に満足していた”のは1例、“満足していた”のは9例で、合計10例(66.7%)が対応に満足していた。一方で“やや不満”が4例、“不満”が1例であった。

衛生法違反の15例に限ってみれば、事業所へ

問題の通報が行われていたのは8例(53.3%)、通報していなかったのが6例(40.0%)、記入なしが1例であった。

問題を通報した8例のうち、製造・販売元の対応や説明に対して、非常に満足していたのは1例、満足していたのは3例で、合計4例(50.0%)が対応に満足していた。一方でやや不満が3例、不満が1例であった。

衛生法違反の15例に関して、保健所通報をしたのは3例、なしが11例、記入なしが1例であった。

またELISA法による抗原検索は1例で実施され、未実施は9例であった。ELISA法を特異的IgE値の検査と勘違いしている例が3例、記入なしが2例であった。

製造・販売元への行政処分があった例はなく、8例が処分なし、6例が不明、記入なしが1例であった。

今回の調査で表示ミスは2つに分類される。ひとつは容器包装された加工食品などに対する表示ミスであり、これはつまり食品衛生法違反に該当する。もう一つは店頭における表示ミスで、これは容器包装されていないので、食品衛生法違反に該当しないが、不適切な表示の結果、患者が健康被害に見舞われている例である。何れもそれぞれに問題を包含する。

表示ミスの約3割を占める容器包装されていない店頭販売の商品の表示は本来アレルギー表示法の管轄外である。しかし、十分にアレルギー表示に関する理解がない消費者(患者)は、店頭の商品のアレルギー表示を見たときに、アレルギー表示と見間違えるのは想像に難くない。このためアレルギー表示法の説明を行うときは、容器包装されていないもの(店頭販売やレストランなど)が本来の表示法の対象外であることを強調する必要がある。

表示ミスの原因も様々あるが、食品会社の認識不足や誤解、管理不足など、製造販売元の原因が主因であり、未だに一部の事業所では同法が周知されているとは言えない状況があることが分かる。こうした結果より、ますます引き続き同法の普及に注力する必要がある。

事故後の対応として、衛生法違反15例の検証では、事業者へ通報した割合は53%に過ぎず、さらに保健所への通報は20%でしかなかった。本来は、さらなる健康被害の拡大を防ぐために

も事業者および保健所への通報は必須のほうであるが、医師の表示違反に対するアクションは低調であった。悪質な事業者への営業停止などの行政処分の社会的制裁を加えて行くことは、本法の周知にも一役を買おうと考えられる。そのためには表示ミスに疑うもしくは判断するケースに関しては、医師が起こすべきアクション（保健所へ通報するなど）が周知される必要がある。

ところが、現実には表示違反を発見した医師が、適切なアクションを起こすことが出来ていたとは言えない。そもそも今回の調査では、事前のモニタリング調査において表示ミスで登録された症例のうち、2次調査で34.2%が登録医師や患者の勘違いや誤解で除外症例となった。また原因抗原診断に必要なELISA検査法を抗原特異的IgE検査と誤解している例があり、関係者の法制に対する理解度に大きな疑問が残った。

7) 食物アレルギー患者を対象としたリスクコミュニケーションのあり方とリスク認知に関する研究

ゲームはカードゲーム方式をとった。カードは「料理（献立名）」カードと「アレルゲン」カードの2種類である。

ゲームのストーリーとして、1週間の月曜から金曜までのウィークデーの昼ごはんのメニューを決めていく。しかし、プレイヤー全員が何らかのアレルゲンをもった食物アレルギー患者のため、「バランスよく食べること」「アレルゲンは食べてはいけない」ことが決められている。手持ちの料理カードに書かれている総得点が高い人が勝利する。

「料理」カードの献立として、固定的に1対1対応（同じ献立名でも材料が異なる場合がある）にならないものを採用する。また献立名から容易にアレルゲンが含まれていることが予測できないものを採用する。そして、身近な献立とするために、国民栄養調査などを参考にする。また、食事には、そのシチュエーションも重要（デートや誕生日など）であるため、さまざまな料理を採択することとした。そして、そのデザインは視覚情報で料理を示すデザインをさける。

試作品に対して今後反映させ、また改善する点として、ひとつの献立に対してアレルゲン数を2つなどと絞らないこと、アレルゲン除去ができるシチュエーションを設定することが考えられた。

次年度には試作品から完成させ、次年度以降学校などでの試用から評価を行うことが必要不可欠である。

8) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

これまで食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートの結果解析に基づき、場面ごとにアンケートを再構成した。今後は電子媒体などを利用し、患者に自由に記入していただき再度回収・解析し、各場面ごとでの対策マニュアルを作成する。

9) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成と安全係数の検討

牛乳および加熱鶏卵による経口負荷試験の結果から推定安全量を求め、この値から交換表を基に推定安全ゾーンを決定した。この安全ゾーンに1/1,000から1/10の安全係数をかけたレベルの加工食品の摂取における症状誘発率について検討した結果、牛乳は安全係数1/10で25%、1/100で0%、1/1000で0%、加熱卵は1/100では28%、1/1000で0%、まとめて検討した結果1/10では25%、1/100では18%で誘発症状がみられた。

一定の安全係数をかければ、牛乳アレルギーや鶏卵アレルギー患者でも安全に食べることができると証明された。その際、安全に摂取できる加工食品を見つけると、アレルギー物質含有量に基づく食品交換表は有用である。また、この信頼性が高い交換表の作成は、これまで世界をリードして日本で開発されたアレルギー物質の検知法（公定法）によるところが大きい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1、論文発表

- 1) Benhamou AH, Caubet JC, Eigenmann PA, Nowak-Węgrzyn A, Marcos CP, Reche M, Urisu A. State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy*. 2010;65:283-289.
- 2) Kondo Y, Urisu A. Oral allergy syndrome. *Allergol Int*. 2009; 58:485-491.
- 3) Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Kato M,

- Hirata N, Matuyama H, Kakami M, Tsuge I, Ohya Y, Urisu A. Short-term efficacy of tacrolimus ointment and impact on quality of life. *Pediatr Int.* 2009 ;51:385-389.
- 4) Kondo Y, Ahn J, Komatsubara R, Terada A, Yasuda T, Tsuge I, Urisu A. Comparison of allergenic properties of salmon (*Oncorhynchus nerka*) between landlocked and anadromous species. *Allergol Int.* 2009;58:295-299.
 - 5) Ito K, Urisu A. Diagnosis of food allergy based on oral food challenge test. *Allergol Int* 2009;58: 467-474.
 - 6) 佐合真紀、浅野みどり、伊藤浩明、二村昌樹、杉浦太一 食物アレルギー児の母親の食生活管理の現状と負担の関係. *日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌* 009; 7: 21-27, 2009.
 - 7) 二村昌樹、伊藤浩明、有田昌彦、宇理須厚. アレルギー専門医による食物経口負荷試験の実施状況. *日本小児アレルギー学会誌* 2009;23, 279-286.
 - 8) 伊藤浩明. 食物アレルギー診療のエンドポイント. *アレルギー* 2009; 58; 1557-1567.
 - 9) 伊藤浩明. 血中抗原特異的 IgE 抗体測定の実状と今後の課題. *日本小児アレルギー学会* 2010;24, 9-16.
 - 10) Emoto A, S. Ishizaki S and K. Shiomi K. Tropomyosins in gastropods and bivalves: identification as major allergens and amino acid sequence features. *Food Chem*,2009; 114, 634-641.
 - 11) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畝尾規子, 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方法の開発. *食衛誌* 2009; 50: 153-159.
 - 12) 繁平有希, 猪又直子, 中河原怜子, 大川智子, 澤城晴名, 中村和子, 小林征洋, 塩見一雄, 池澤善郎: スルメイカの塩辛摂取後に発症したアニサキスアレルギーの 1 例: 精製及び組み換えアレルゲンを用いたアレルゲン解析を含めて. *アレルギー* 2010; 59, 55-60.
 - 13) 塩見一雄: 「えび」, 「かに」のアレルギー表示の義務化. *日水誌* 2009; 75: 495-499.
 - 14) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Doi H, Shibata H, Urisu A. Determination of walnut protein in processed foods by enzyme-linked immunosorbent assay: Interlaboratory study. *J AOAC Int.* in press.
 - 15) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Morishita N, Matsumoto T, Urisu A. Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for the determination of soybean protein in processed foods: Interlaboratory evaluation. *J AOAC Int.* 2010;93: 243-248.
 - 16) Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Teshima R. Japanese Regulations and Buckwheat Allergen Detection. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*, (Ed. Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K) John Wiley & Sons, Inc.2009.
 - 17) 酒井信夫、安達玲子、中村厚、柴原裕亮、上坂良彦、清木興介、織田浩司、穂山浩、手島玲子、いわゆる健康食品に含まれる甲殻類様タンパク質の実態調査. *日本食品化学学会誌* 2009;16: 118-122.
 - 18) 穂山浩、安達玲子、手島玲子、食物アレルギーについて. *都菓雑誌* 2009;31: 18-22.
 - 19) 安達玲子、酒井信夫、穂山浩、手島玲子、アレルギー物質を含む食品の表示と検査法 —えび、かにの表示義務化—. *食品衛生学雑誌* 2009;50, J225-230.
 - 20) 安達玲子、酒井信夫、穂山浩、手島玲子、特定原材料えび・かにの表示と検査法について. *食品衛生研究* 2009;59, 7-14.
 - 21) 穂山浩、安達玲子、手島玲子、アレルゲン検知法の新たな開発状況. *臨床免疫・アレルギー科* 2009;51, 363-370.
 - 22) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi A, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M, Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;124: 779-785.
 - 23) Miyazawa T, Itahashi K, Imai T, Management of neonatal cow's milk allergy in high-risk neonates. *Pediatrics International* 2009;51: 544-547.

- 24) Ebisawa M, Management of Food Allergy in Japan "Food Allergy Management Guideline 2008 (Revision from 2005)" and "Guidelines for the Treatment of Allergic Diseases in Schools". *Allergology International* 2009; 58: 475-483.
- 25) Komata T, Söderström L, Borres MP, Tachimoto H, Ebisawa M, Usefulness of Wheat and Soybean Specific IgE Antibody Titers for the Diagnosis of Food Allergy. *Allergol Int* 2009;58: 599-603.
- 26) Ebisawa M, How to Cope with Allergic Diseases at Schools in Japan From the standpoint of a pediatric allergist. *Japan Medical Association Journal* 2009; 52: 164-167.
- 27) 小俣貴嗣, 宿谷明紀, 今井孝成, 田知本寛, 海老澤元宏: ブラインド法乾燥食品粉末食物負荷試験に関する検討(第1報) —非加熱全卵・卵黄負荷試験—. *アレルギー* 2009;58: 524-536.
- 28) 小俣貴嗣, 宿谷明紀, 今井孝成, 田知本寛, 海老澤元宏: ブラインド法乾燥食品粉末食物負荷試験に関する検討(第2報) —牛乳負荷試験—. *アレルギー* 2009; 58: 779-789.
- 2. 学会発表**
- 1) 安 在根, 近藤康人, 柘植郁哉, 成瀬徳彦, 鈴木聖子, 小松原亮, 安藤仁志, 安田俊隆, 宇理須厚雄, ウニアレルゲン解析の試み. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009年6月.
- 2) 宇理須厚雄, 食物アレルギー経口負荷試験の標準化. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009年6月.
- 3) 安藤仁志, 成瀬徳彦, 安 在根, 小松原亮, 鈴木聖子, 近藤康人, 柘植郁哉, 宇理須厚雄, 鶏卵アレルギーにおける Ovomuroid 特異的 IgE 抗体測定の有用性. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009年6月.
- 4) 鈴木聖子, 成瀬徳彦, 小松原亮, 平田典子, 宇理須厚雄, 安 在根, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表による食品指導の試み. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009年6月.
- 5) 鈴木聖子, 成瀬徳彦, 小松原亮, 平田典子, 安藤仁志, 宇理須厚雄, 安 在根, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, 森下直樹, 松本貴之, アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表による食品指導の試み. 第59回, 日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009年10月.
- 6) 小松原亮, 成瀬徳彦, 平田典子, 鈴木聖子, 安藤仁志, 宇理須厚雄, 安 在根, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, 牛乳アレルギー児に対する牛乳経口負荷試験における最小陽性誘発量の検討. 第46回, 日本小児アレルギー学会, 福岡, 2009年12月.
- 7) 鈴木聖子, 成瀬徳彦, 小松原亮, 平田典子, 安藤仁志, 宇理須厚雄, 安 在根, 湯川牧子, 近藤康人, 柘植郁哉, 森下直樹, 松本貴之, アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表による食品指導の試み. 第46回, 日本小児アレルギー学会, 福岡, 2009年12月.
- 8) 大野敦子, 尾辻健太, 平山美香, 漢人直之, 伊藤浩明. 当科のエピペン処方外来のまとめ. 第45回中部日本小児科学会. 名古屋, 2009年8月.
- 9) 伊藤浩明, 漢人直之, 平山美香, 尾辻健太, 二村昌樹, 坂本龍雄. 遷延する重症牛乳アレルギー児に対する経口免疫療法の試み. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 秋田, 2009年10月.
- 10) 漢人直之, 二村昌樹, 尾辻健太, 平山美香, 伊藤浩明. 食物アレルギー児の成長発育に関するアンケート調査. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 秋田, 2009年10月.
- 11) 尾辻健太, 平山美香, 二村昌樹, 伊藤浩明. 当院におけるピーナッツ・ナッツ類経口負荷試験の検討. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 秋田, 2009年10月.
- 12) 大野敦子, 尾辻健太, 平山美香, 漢人直之, 伊藤浩明. 食物経口負荷試験でアドレナリン筋肉注射を使用した4症例. 第247回日本小児科学会東海地方会. 岐阜, 2009年11月.
- 13) 尾辻健太, 平山美香, 二村昌樹, 伊藤浩明. 当院における魚, 大豆, 甲殻類, ゴマ, ソバ, 肉, 果物などの経口負荷試験に関する検討. 第46回日本小児アレルギー学会. 福岡, 2009年12月.
- 14) 伊藤浩明. 血中抗原特異的 IgE 抗体測定の現状と今後の課題. 第46回日本小児アレルギー学会シンポジウム. 福岡, 2009年, 12月.
- 15) 伊藤浩明. 食物負荷試験陽性例の判断基準と

その後の指導方法. 第 10 回食物アレルギー研究会. 東京, 2010 年 2 月.

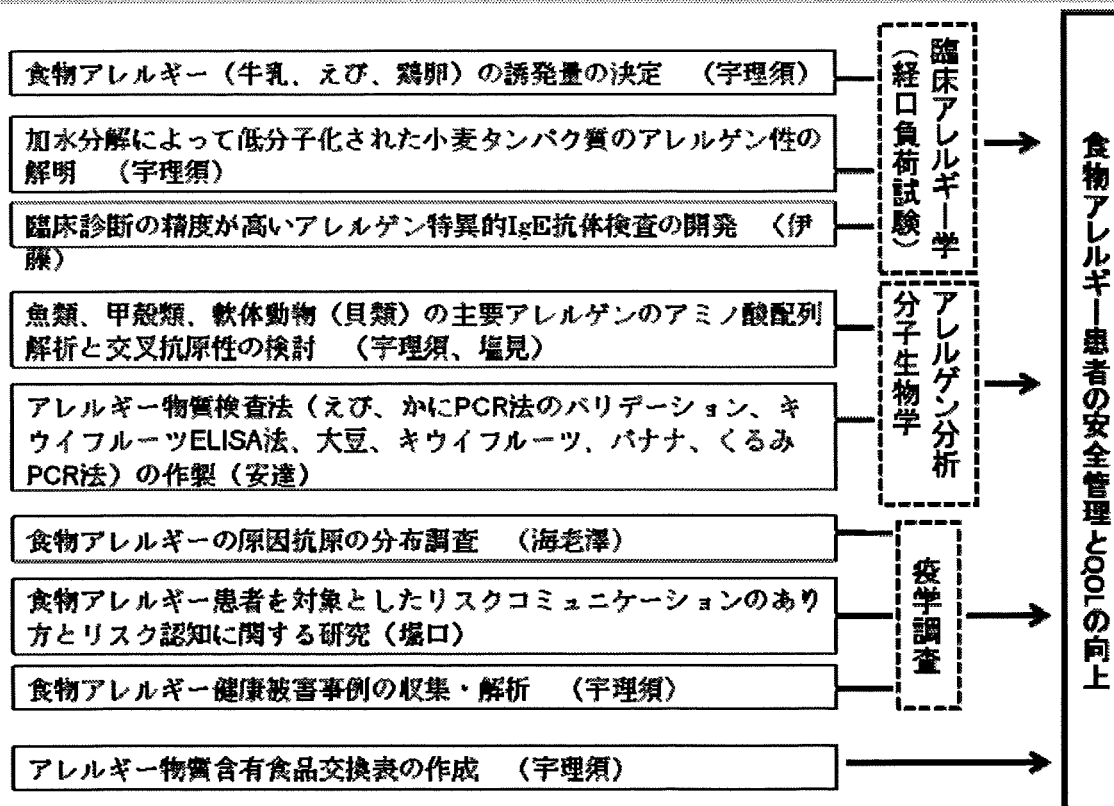
- 16) Otsuji K, Hirayama M, Kando N, Ito K, Muto T, Sakamoto T. Introduction of allergenic food after positive oral food challenge test. AAAAI 2010, New Orleans, 2010 年 2 月.
- 17) Ito K, Ebisawa M, Sato S, Sjolander S, Borres M. Specific IgE to Gly m 5 and Gly m 6 in children with soybean allergy in Japan. AAAAI 2010, New Orleans, 2010 年 2 月.
- 18) Sjolander S, Bernhardtsson F, Brostedt P, Borres M, Tanaka A, Ito K, Ebisawa M, Utsumi S, Poorafshar M. High IgE Reactivity to subunit G5 from the soybean legumin allergen Gly m 6 in sera from soy allergic Japanese children. AAAAI 2010, New Orleans, 2010 年 2 月.
- 19) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畝尾規子, 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 検出法に適した抽出法について. 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会 2009 年 5 月, 東京
- 20) Hong Z, Ushio H, Shiomi K: Method of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. International Union of Biochemistry and Molecular Biology 2009 上海 2009 年 8 月.
- 21) 張 虹, 潮 秀樹, 塩見一雄: 無脊椎動物主要アレルゲントロポミオシンのモノクローナル抗体作製及び応用. 2009 年度日本水産学会秋季大会、盛岡 2009 年 10 月.
- 22) 鈴木 翠, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: クロアワビのパラミオシン: トロポミオシンとの IgE 反応交差性および一次構造解析. 2009 年度日本水産学会秋季大会、盛岡 2009 年 10 月.
- 23) 鈴木 翠, 石崎松一郎, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: クロアワビパラミオシンの大腸菌における発現および組み換えパラミオシンの IgE 反応性. 平成 22 年度日本水産学会春季大会、藤沢 2010 年 3 月.
- 24) Adachi R, Sakai S, Akiyama H, Teshima R, Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Urisu A. Interlaboratory validation of PCR methods for the detection of shrimp and crab in processed foods. 123rd AOAC Annual Meeting and Exposition 2009 年 9 月.
- 25) Taguchi H, Watanabe S, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Teshima R. PCR methods for differential detection of allergenic shrimp and crab. 123rd AOAC Annual Meeting and Exposition 2009 年 9 月.
- 26) 安達玲子, 酒井信夫, 穉山浩, 手島玲子, 田口大夢, 渡辺聡, 平尾宜司, 特定原材料えび・かにを検知する特異的定性 PCR 法の妥当性確認 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会 2009 年 5 月.
- 27) 伊東花織, 小山由利子, 渡邊恵理子, 鶴間理恵子, 山本貴之, 加藤正俊, 本庄勉, 安達玲子, 穉山浩, 手島玲子, 新抽出液を用いた特定原材料タンパク質の測定 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会 2009 年 5 月.
- 28) 鶴間理恵子, 渡邊恵理子, 伊東花織, 小山由利子, 山本貴之, 加藤正俊, 本庄勉, 安達玲子, 穉山浩, 手島玲子, イムノクロマト法を用いた加熱加工食品中の特定原材料タンパク質測定について 第 15 回日本食品化学学会総会・学術大会 2009 年 5 月.
- 29) 酒井信夫, 安達玲子, 穉山浩, 手島玲子, いわゆる健康食品中に含まれる甲殻類タンパク質の実態調査 第 15 回日本食品化学学会総会・学術大会 2009 年 5 月.
- 30) 秋田涼子, 小泉大輔, 織田浩司, 清木興介, 酒井信夫, 安達玲子, 穉山浩, 手島玲子, イムノクロマト法による甲殻類原材料検出キットの開発 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 2009 年 10 月.
- 31) 小泉大輔, 清木興介, 織田浩司, 中村健人, 酒井信夫, 穉山浩, 安達玲子, 手島玲子, 加工食品中に混入する甲殻類タンパク質について 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 2009 年 10 月.
- 32) 安達玲子, 酒井信夫, 中村厚, 穉山浩, 手島玲子, 魚肉すり身を原材料とする加工食品に含まれる甲殻類の実態調査 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会 2009 年 11 月.
- 33) 橋本博之, 中西希代子, 眞壁祐樹, 宮本文夫, 長谷川康行, 安達玲子, 穉山浩, 手島玲子, 特定原材料検査における海苔製品からの DNA 抽出法の検討 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会 2009 年 11 月.
- 34) 中村厚, 佐藤里絵, 安達玲子, 手島玲子, ソバ 16kDa アレルゲンに対するサンドイッチ ELISA

- 系の構築 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月.
- 35) 安達玲子、アレルギー物質を含む食品の表示と検査法について 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会シンポジウム 2009 年 11 月.
- 36) 安達玲子、アレルギー表示の検査法 日本食品衛生学会第 12 回特別シンポジウム 2010 年 1 月.
- 37) 澤田絵理奈、近藤武晴、矢野えりか、森山達哉、河村幸雄「リンゴのアレルゲンレベルの品種間差違の検討:低含有品種の探索」 2009 年度(第 48 回)日本栄養・食糧学会近畿支部大会 京都 2009 年 11 月.
- 38) Ebisawa M: Food Allergy. The Allergy and Immunology Society of Thailand, Bangkok, Thailand, 2009 年 4 月.
- 39) Ebisawa M: Clinical problems of food allergy in Japan. XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Warszawa, Poland, 2009 年 6 月
- 40) Ebisawa M: Session 4: Wheat and rice allergy. World Allergy Congress 2009, Buenos Aires, Argentina, 2009 年 12 月.
- 41) Ebisawa M, N Hayashi, C Sugizaki, N Yanagida, T Imai: Management of hen's egg allergy in consideration of quality of life. World Allergy Congress 2009, Buenos Aires, Argentina, 2009 年 12 月
- 42) Yanagida N., Sato S, Utsunomiya T, Komata T, Iguchi M, Tomikawa M, Imai T, Ebisawa M: Treatment of Hen's Egg- and Cow's Milk-induced Anaphylaxis by Rash Oral Immunotherapy. 2010 AAAAI Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, 2010 年 2 月.
- 43) Ebisawa M, Chizuko Sugizaki: Prevalence of allergic diseases during first 7 years of life in Japan. 2010 AAAAI Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, 2010 年 3 月.
- 44) 今井孝成 杉崎千鶴子 海老澤元宏: 平成 20 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009 年 6 月.
- 45) 長谷川実穂 今井孝成 林 典子 海老澤元宏: アレルギー表示に関する患者調査. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009 年 6 月.
- 46) 林典子 今井孝成 長谷川実穂 小俣貴嗣 海老澤元宏: 栄養士の食物アレルギー対応に関する調査. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009 年 6 月.
- 47) 海老澤元宏: 食物アレルギーの診断と治療 今後の展望. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009 年 10 月.
- 48) Takatsugu Komata, Motohiro Ebisawa: 2. The Predictive Relationship Between Food-specific Serum IgE and Challenge Outcomes in Food Allergy to Egg, Milk, Wheat and Soybean. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009 年 10 月.
- 49) 今井孝成, 杉崎千鶴子, 長谷川実穂, 海老澤元宏: 37. 即時型食物アレルギー症状は原因食物によって臓器症状の発症傾向があるのかー平成 20 年度全国モニタリング調査よりー. 第 46 回日本小児アレルギー学会, 福岡, 2009 年 12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1科学的知見に基づく食物アレルギー患者の安全管理とQOL向上に関する研究



Ⅱ . 分担研究報告

食物アレルギー誘発量の決定とアレルギー物質含有食品交換表の作成に関する研究

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)
	安藤 仁志	(藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 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)
	成瀬 徳彦	(藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 小児科)

研究要旨

1) 食物アレルギーの誘発量の決定：食物アレルギー症状が誘発されうる最小誘発量検討のため、牛乳および鶏卵（90℃15分）で微量経口負荷試験を行った。牛乳および加熱鶏卵経口負荷試験陽性者を対象にそれぞれの90%および95%の患者が陽性になる値について検討した。牛乳アレルギー患者72名で求めた90%、95%の患者をカバーする閾値はそれぞれ1951.5 μ g（牛乳0.06mL）、285 μ g（牛乳0.009mL）であった。加熱鶏卵陽性患者95名を対象に求めた90%、95%閾値はそれぞれ719.3 μ g（1/1250個）、194.5 μ g（1/4500個）であった。また、最小誘発牛乳タンパク質量は10 μ g（牛乳0.0003mL）、加熱鶏卵タンパク質量は1.75 μ g（鶏卵1/500,000個）であった。牛乳経口負荷試験では0.1ml未満の投与で約14%の患者が陽性となった。加熱鶏卵では1/500個未満で約20%の患者が陽性となった。この結果から、経口負荷試験の安全性を確保するためには微量からの負荷試験を行った方がよい患者が比較的多いことが示された。今後、微量経口負荷試験で陽性となる患者の特徴を明らかにする必要がある。また、経口免疫療法では、負荷試験が陽性となる閾値を明らかにしないと、治療の開始量を決めることができない。閾値を求める経口負荷試験では、初回投与量として微量から開始する必要がある。

2) 加水分解によって低分子化された小麦タンパク質のアレルゲン性の解明：小麦アレルギー患児25名を対象に加水分解小麦の経口負荷試験を行った結果、12名（48%）に陽性反応がみられ、加水分解小麦のアレルゲン性は残存していることが判明した。

3) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析：食物アレルギーを有する患者の家族を対象に事例アンケートを取った結果、主な発生場所は自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの5つのグループに分けられ、その原因は各グループに共通する部分が多かった。今回場面ごとにアンケートを再構成した。今後は電子媒体などを通じて患者から情報を記入してもらい、これを再度回収して対策マニュアル作成を行う。

4) アレルギー物質含有食品交換表の作成：牛乳および加熱鶏卵を用いた経口負荷試験から推定安全閾値（積算量）を求め、この値を参考にしてアレルギー物質含有量に基づいた食品交換表から推定安全ゾーンを決定した。実際に安全に摂取可能であるか検討するために、1/1000から1/10の安全係数をかけたレベルに含まれる加工食品の摂取における症状誘発率について検討した結果、安全係数が1/10では25%、1/100では18%で誘発症状がみられた。交換表を用いれば牛乳や鶏卵に対してアレルギーがある患者でも安全に食べることができる加工食品を見つけることが可能であることが判明した。