

201033018A

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 22 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 23(2011)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…………… 15

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…………… 43

3. 魚貝類アレルギー (サケ類パルブアルブミン、ブラックタイガー sarcoplasmic calcium-binding protein およびクロアワビパラミオシン) に関する生化学的研究

塩見 一雄…………… 47

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…………… 58

5. 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

海老澤 元宏…………… 72

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…………… 76

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 97

## IV. 研究成果の刊行物・別冊…………… 99

# 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  
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 :

加熱鶏卵陽性患者 112 名を対象に求めた 95%、99% 閾値はそれぞれ 29.2  $\mu$ g、2.7  $\mu$ g であった。牛乳アレルギー患者 102 名で求めた 95%、99% の患者をカバーする最小誘発閾値はそれぞれ 1265.5  $\mu$ g、22.9  $\mu$ g であった。このことから、大多数の患者は、加工食品の表示をみて購入すれば安全に食べる事が出来ると考えられた。また、エビ負荷試験陽性者 20 名で 90% の患者をカバーする最小誘発エビタンパク質量は 88.4 mg であった。

2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究 :

食物アレルギー健康被害事例アンケートを作成しインターネットを利用して、現在までに約 400 例のアンケートが回収でき、このうち 384 例の解析が可能であった。トラブル発生場所は自宅が多く、中には皮膚からの感作が疑われるような症例もあった。約 40% が表示食品のチェックを行っていれば予防ができたと回答した。

3) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成 :

卵・牛乳・小麦・大豆の含有タンパク質量をレベル別に分類した食品交換表を試作した。

4) イクラの交叉反応性についての検討 :

イクラアレルギー患者の血清を用いた魚卵などとの交差反応性を有する食品の検討で、多くの症例がウニとの間に共通抗原性を示した。

5) 臨床診断の精度が高いアレルギー特異的 IgE 抗体検査の開発 :

小麦アレルギー 87 例(平均年齢 3 歳)で  $\omega$ -5 グリアジン特異的 IgE 抗体を約 3 年間フォローし、耐性獲得群 (40 名) では  $\omega$ -5 グリアジン特異的 IgE 抗体は有意に低下し、多くは陰性化することを見いだした。ピーナッツアレルギーでは、ピーナッツの代表的なコンポーネントである Ara h 1、Ara h 2 特異的 IgE 抗体検査が、従来の粗抗原に比べて優れた診断感度、特異性を示すことを確認した。

6) 魚類、甲殻類、軟体動物(貝類)の主要アレルギーのアミノ酸配列解析と交叉抗原性の検討 :

サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)の比較で、パルブアルブミン含量はヤマメの方が高いことが示唆された。

ブラックタイガーの新しいアレルギーとして同定した sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) を大腸菌で発現し、精製することができた。患者血清を用いた検討で rSCP の IgE 反応性は天然 SCP と同等であると判断された。SCP からキレート剤(EGTA)を用いて  $Ca^{2+}$  を除去すると、SCP の立体構造が変化、IgE 反応性は約半分に低下した。これに加え、SCP の全長をカバーするオーバーラップペプチドを用いた IgE 結合能の結果がいずれのペプチドにも IgE 結合能が見られなかったことから、IgE エピトープは立体構造のみに依存していると考えられた。

クロアワビの新しいアレルギーとして同定したパラミオシンをクローニングし、全アミノ酸配列(860 残基)を解明した。クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンとは約 70% という高い相同性を示したが、ダニ類やアニサキスのパラミオシンとの相同性は約 35% であった。

#### 7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法：

[1]毒物に指定された 2-ME を含有する従来の抽出液に代わるものとして、亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用い、標準品原液を再現性よく調製することが可能であった。このような定量検査法の改良に対応するため、改良法の評価に関するガイドライン案を作成した。

[2]キウイフルーツ検出法では、アクチニジン免疫原として確立した抗アクチニジンモノクローナル抗体の組み合わせを選択し、サンドイッチ ELISA を構築した。0.78-50 ng/mL の範囲を測定可能であり、モデル加工食品を用いた検討において 62.4~106.6%という良好な回収率を示した。バナナ検出法開発では、変性クラスIキチナーゼを免疫原として2種類のモノクローナル抗体を確立した。

[3]特定原材料検査用 BIST (Bead array in Single Tip) で、7項目同時検査の可能性が示唆された。えび、かにのタンパク質いずれも表示義務の閾値である 10 µg/g が測定できることを確認した。また、食物アレルギー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国際的な検討で、卵と牛乳の検出法に関して国際的な指針を確立した。

[4]ゴマアレルギー患者血清とのウェスタンブロットティングの結果、主要アレルギーである2S アルブミンの他に、IIS グロブリンにも患者 IgE が強く反応することが示された。また、IIS グロブリンの IgE エピトープはタンパク質全長にわたって複数存在することが示唆された。

#### 8) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査：

平成 13・14 年、平成 17 年、平成 20 年にそれぞれ行われた即時型食物アレルギー全国モニタリング調査の結果：各年次とも鶏卵、乳製品、小麦が3大原因食物であり、それぞれ 69.1%、70.8%、75.3%と徐々に増加傾向を認めた。また上位 10 抗原は、前記3食物とピーナツ、イクラ、エビ、そば、大豆、キウイ、カニで調査年次に関わらず固定していた。アナフィラキシーショックの原因食物も同様に鶏卵、乳製品、小麦が俄然多く、上位 5 抗原で各年次 80.6%、74.9%、81.3%を占めた。この結果から今後の臨床、行政の施策は、引き続き鶏卵、牛乳、小麦など、主要原因食物に重点を置き注力すると良い。

#### 9) 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：

食物アレルギーに関する理解促進を目的として、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、アレルギー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。また、学校現場などでの試用により、評価をすることが必要不可欠と考えられた。

#### 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としたアレルギー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。

##### 1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定

昨年度までの中間報告で、鶏卵あるいは牛乳アレルギー患者の 90% (90%陽性値)、95% (95%陽性値) をカバーする閾値は、加熱鶏卵陽性患者 (95 名) で 719.3 µg (1/1250 個)、194.5 µg (1/4500 個) で、最小誘発加熱鶏卵タンパク質量は 1.75 µg

(1/500,000 個)であった。また、牛乳陽性患者 (72 名) では 1951.5 µg (牛乳 0.06mL)、285 µg (牛乳 0.009mL) で、最小誘発牛乳タンパク質量は 10 µg (0.0003mL) あった。

今年度はさらに症例数を増やして検証した。また甲殻類の誘発域値についても検討を行った。

##### 2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

昨年度までに収集した食物アレルギー健康被害事例の解析に基づき、発生場所を自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 つのグループに分け、各グループにおける共通した原因に関する情報を拾い出すためのアンケートを作成した。

今年度は、作成したアンケートをインターネットホームページに掲載し、患者からの情報収集を



開始した。

### 3) アレルギー物質含有食品交換表(交換表)の作成

鶏卵・牛乳・小麦・大豆の含有タンパク質量によってレベル別に分類した食品交換表を作成完成させる。

### 4) イクラの交叉反応性についての検討

イクラは乳幼児期に即時型反応をきたす主要な原因の一つで、多くの症例は初回の摂取で症状を来す。交差抗原性を有する食品による感作が先行すると考えられるが、これまで鶏卵やその他の魚卵とイクラとは有意な共通抗原性は見出されていない。卵黄、サケ、タラコ、カズノコ、ウニ抗原を用いた検討から、今回イクラとウニに焦点を絞り、両者の交叉反応性の検討を行った。

### 5) 臨床診断の精度が高いアレルギー特異的IgE抗体検査の開発

昨年度までの成果を発展させて2つのテーマ(小麦とピーナッツ)について実施した。

#### ①小麦:小麦アレルギー耐性獲得の指標としての $\omega$ -5 グリアジン特異的IgE抗体検査の有用性

小麦グルテンに含まれる代表的なアレルギーコンポーネントである $\omega$ -5 グリアジンに対する特異的IgE抗体価(以下、 $r\omega$ 5G-IgE)が、耐性獲得の指標として有用かどうか検討した。

#### ②ピーナッツ:ピーナッツの代表的なアレルギーコンポーネント特異的IgE抗体検査により、ピーナッツアレルギーの診断精度向上及び病態の解明を行った。

### 6) 魚類、甲殻類、軟体動物(貝類)の主要アレルギーのアミノ酸配列解析と交叉抗原性の検討

本研究では1)サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)のアレルギー性を主要アレルギーであるパルブアルブミンに着目して評価すること、2)ブラックタイガーSCPの組換え品を大腸菌で発現してIgE反応性を天然品と比較すること、3)ブラックタイガーSCPのIgEエピトープに関する知見を蓄積すること、4)クロアワビパラミオシンの一次構造を解析することを目的とした。

### 7) アレルギー物質検査法

本研究においては、食物アレルギー患者の安全管理とQOLの更なる向上を目的とし、食物アレルギー原因物質の解析及び検査法に関する以下の研究を実施した。1)特定原材料ELISAキット用タンパク質抽出液の改良。および、このような検査法改良に対

応するための改良検査法の評価に関するガイドライン案を作成、2)果実類(キウイフルーツおよびバナナ)検知ELISA法の開発、3)アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法として開発したツールの1つであるBIST(ビスト:Bead array in Single Tip)を特定原材料等の簡易検査へ応用するための検討、4)ゴマアレルギーの11Sグロブリンのエピトープ解析を目的に検討を行った。

### 8) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

平成13年に食品衛生法アレルギー物質を含む食品の表示が始まり、9年が経過する中で、国民の食生活や社会生活環境の変化とともに、食物アレルギーの原因抗原にも変化が見られる。過去の調査結果から我が国の食物アレルギー原因抗原の変化を明らかにし、今後の対策の一助とすることを目的とする。

### 9) 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、ルールの設定を図った。

## B. 研究方法

### 1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定に関する研究

①卵:負荷試験の方法は加熱(90℃、15分)鶏卵殻口負荷試験で行った。( )内はFASTKIT エライザ Ver. IIで測定した卵タンパク質量を示す。100mlのジュースに溶かし、そのうちの0.1ml(卵タンパク1300 $\mu$ g)を50mlのジュースに溶かしたA液と、90℃15分加熱全卵(卵タンパク質1300mg)を50mlのジュースに溶かしたB液で、以下の順に増量した

微量加熱卵負荷試験(FASTKIT エライザ Ver. IIで測定した卵タンパク質量 mg)

1、A液 0.1 ml (0.002)

2、A液 1.0 ml (0.02)

3、A液 10 ml (0.26)

4、A液 30 ml (0.78)

微量負荷試験が陰性であった場合に行った、加熱(90℃15分)鶏卵負荷試験(FASTKIT エライザ Ver. IIで測定した卵タンパク質量 mg)

1、

B液 0.1 ml (1.3)

2、 B 液 1.0 ml (13.0)

3、 B 液 10 ml (130.0)

4、 B 液 38.9 ml (505.0mg)

②牛乳：牛乳 100  $\mu$  l (0.1ml) (FASTKIT エライザ Ver. II で測定した乳タンパク質 2,200  $\mu$  g) を 200ml のジュースに溶した牛乳微量負荷試験用 (A 液と略す) と牛乳 (B 液と略す) で、以下の 1-5 の順に行った。(FASTKIT エライザ Ver. II で測定した乳タンパク質量 mg)

1. A 液 0.6ml (0.006)

2. A 液 1.5ml (0.016)

3. A 液 15 ml (0.16)

4. B 液 0.05ml (1.1)

5. B 液 0.1ml (2.2)

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以下の順に実施した。(FASTKIT エライザ Ver. II で測定した乳タンパク質量 mg)

1. B 液 0.1ml (2.2)

2. B 液 1ml (22.0)

3. B 液 10ml (220)

4. B 液 89ml ( $\approx$ 2000)

③今回は加熱エビ負荷試験陽性域値に関しても検討を行った。加熱エビ経口負荷試験に関しては、漸増法で行い、誘発症状が出たところまでの合計摂取量で表した。

## 2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究

発生場所を自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 つのグループに分け、各グループにおける共通した原因に関する情報を拾い出すためのアンケートをインターネットホームページに掲載し、アンケートを回収した。

## 3) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成

日本全国で販売されている約 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含有量を FASTKIT エライザ ver. II (日本ハム) で測定し、そのうち分類できる食品群ごとに関し、含有食品中の(卵・乳)タンパク量別に表を作成した。またこの際に、経口負荷試験とのリンクを可能にするため、牛乳および鶏卵経口負荷試験の結果から求めた推定安全量(積算)に、昨年度検討した安全係数 1/100 をかけたタンパク含有食品から試すことを表中に付記した。

## 4) イクラの交叉反応性についての検討

イクラアレルギー患者でウニ IgE 高値の患者

を選び、イクラとウニ間での共通抗原性について ELISA inhibition と Immunoblot inhibition を用いて検討した。

## 5) 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(小麦とピーナッツ)

①小麦：2005 年 4 月から 2009 年 1 月に小麦経口負荷試験又は明らかな誘発症状の病歴から小麦アレルギーと確定診断されている患児を対象に小麦及び r $\omega$ 5G-IgE を測定し、2010 年 6 月までの小麦アレルギーの耐性獲得状況と抗体価の推移を評価した。

②ピーナッツ：ピーナッツに対する即時型反応が病歴又は経口負荷試験で確認されている症例 (PA 群)、又はピーナッツ特異的 IgE 抗体陽性で負荷試験陰性又は日常的に摂取可能であることが確認されている症例(感作群) 187 例 (PA 群 69 例、感作群 118 例) について、両者の抗体価を比較した。また、PA 群 42 例、感作群 33 例について Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3 (以上は貯蔵タンパク)、Ara h 8(PR-10)、Ara h 9 (Lipid transfer protein) 特異的 IgE 抗体を ImmunoCAP 法 (ファディア社) で測定した。

## 6) 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

①サケ類の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)のバルブアルブミン比較：ヤマメおよびサクラマスの背側普通肉から得られた加熱抽出液を Sephacryl S-100 カラム (2.5 x 105 cm) に添加し、PBS で溶出した。SDS-PAGE : SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (GE Healthcare) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare) を使用した。ELISA : 加熱抽出液中のバルブアルブミン濃度の測定および精製過程でのバルブアルブミンの検出には可視光 ELISA を用いた。精製バルブアルブミンの分子量は 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) を用いて分析した。

②甲殻類：ブラックタイガー SCP を HisGln (HQ) タグつきタンパク質として大腸菌で発現した。一方、天然 SCP (nSCP) の精製は、既報 (Shiomi et al. Int Arch Allergy Immunol 2008;146:91-98) に従って硫酸塩析 (70-90%飽和) およびヒドロキシアパタイト HPLC により精製した。HQ タグつきの組換え SCP (rSCP) と nSCP の IgE 反応性は、SCP を認識することが判明している 5 人の患者からのプール血清を用い、ELISA および阻害

ELISA で比較検討した。

③ブラックタイガーSCP の IgE 反応性に及ぼす  $\text{Ca}^{2+}$  の影響をみる為、キレート剤 (EGTA) の非存在下 ( $\text{Ca}^{2+}$  保持) および存在下 ( $\text{Ca}^{2+}$  除去) での蛍光 ELISA により調べた。また、CD スペクトルの測定には JASCO J-720 spectropolarimeter を用いた。ブラックタイガーSCP の全長をカバーするように、10 残基ずつずらした 20 残基 (C 末端ペプチドのみ 23 残基) のペプチド 18 種類を PMMS-8 peptide synthesizer (島津製作所) を用いて合成し、プレートを用いた蛍光 ELISA によりペプチドの IgE 反応性を調べた。

④貝類: クロアワビパラミオシンの cDNA クローニングは、まず、部分アミノ酸配列データをもとにフォワードプライマー (DegeF1) を設計し 3'RACE を行った。PCR 増幅産物の塩基配列を直接解析し、得られた配列をもとに設計した遺伝子特異的リバープライマーと部分アミノ酸配列データをもとに設計したフォワードプライマー (DegeF2) との組み合わせにより RT-PCR を行った。PCR 増幅産物は pT7Blue-2 T-Vector (Novagen) にサブクローニング後、塩基配列を解析した。次いで、RT-PCR により明らかになった塩基配列をもとに 5'RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

#### 7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法

①特定原材料ELISAキット用タンパク質抽出液の改良:

標準品に関する検討: 本研究では、「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、標準品メーカーと国立衛研の両者で行い、その結果を比較した。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晚抽出し、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。

加工食品の測定に関する検討: 従来の 2-ME 含有抽出液を用いる ELISA 系と、今回検討対象である亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いる ELISA 系を用いて、実際に加工食品中の特定原材料タンパク質の定量を行い、両者の定量結果を比較した。

従来法と改良検査法の同等性評価のガイドライン案に関する検討: 従来使用されている特定原材料定量検査法と、その改良法との間で、検量線、定量値の相関、精度、検出限界・定量限界、特異性等を比較検討し、従来法と改良法との同等性を示すためのガイドライン案を検討した。

#### ②果実類検知ELISA法の開発

キウイフルーツ検出法の開発: 現在までに確立した未変性および変性アクチニンに対するモノクローナル抗体、計 26 種類より、キウイフルーツ検出用 ELISA に使用可能な抗体の組み合わせを選択した。

キウイフルーツタンパク質定量のための標準曲線の作製: ヘイワード種のキウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*) の可食部分を凍結乾燥し、標準粉末とした。その後、プロテアーゼインヒビターの添加および加熱処理を行い、キウイフルーツ標準品原液とした。2-D Quant kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) により、タンパク質を定量した後、50 ~ 0.78 ng/mL までの 2 倍の希釈段を作製し、キウイフルーツの標準曲線用試料とした。

モデル加工食品の作製: 前述の標準粉末を、タンパク質の定量値から 10 µg/g となるように各種食品に添加後、加熱調理し、モデル加工食品とした。

モデル加工食品の定量分析: モデル加工食品 1 g に、特定原材料に対する ELISA 法 (通知検査法) で用いられている抽出液を 19 ml 加え、振盪機 (90 ~ 110 rpm) で一晚抽出した後、100°C で 10 分間加熱した。冷却後、抽出液を 3,000 × g で 20 分間遠心分離し、上澄液を No.5A のろ紙でろ過後、希釈液により 20 倍希釈したものを検液とした。50 ~ 0.78 ng/mL までの 2 倍の希釈段を検量線に用いて、サンドイッチ ELISA で測定した。

#### バナナ検出法の開発

抗変性バナナ Class I キチナーゼ (以下、CIC) モノクローナル抗体の作製: CIC を還元カルボキシメチル化し、変性 CIC とした。免疫用動物に BALB/c マウスを選択し、変性 CIC を免疫し、脾臓細胞とミエローマ細胞 (P3X63Ag8.653) との細胞融合の後、限界希釈法によるクローニングを行った。

③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

特定原材料検査用 BIST は、それぞれ異なる抗体を固定した 1mm 径ビーズを複数個、キャピラリーに封入して作製した。この BIST で新たに作製した抗体を用いて、同時測定の可能性について検討した。本



研究ではえび・かに識別能を有する抗体を調製し、これらを用いたえび・かに検出系の構築を試みた。また段階的にシグナル強度の異なるビーズを作製してコントロールビーズとすることにより、特定原材料検査結果の相対定量化についても検討した。

食物アレルギー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の検討では、5月9日から12日にカナダのトロントで行われた Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies に参加し、講演と議論を行った。

#### ④ゴマアレルギーの解析

検討試料として市販の黒ゴマ及び白ゴマを購入し得られた抽出液を非還元条件下電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。また、ゴマ 11S グロブリンのフラグメント発現に関しては、11S グロブリン isoform 1 及び 2 の cDNA の 3 種のフラグメント (20-30aa のオーバーラップあり) を発現するベクターを調製し、各フラグメントをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として大腸菌に発現させた。不溶性タンパク質として発現させた各フラグメントを大腸菌から粗精製し、ゴマアレルギー患者血清を用いたウェスタンブロッティングを行った。

#### 8) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

対象は、平成 13・14 年、平成 17 年、平成 20 年にそれぞれ行われた即時型食物アレルギー全国モニタリング調査にて、抽出された症例とした。尚、即時型食物アレルギー全国モニタリング調査はアレルギーを専門とする医師の参加協力を得て、調査方法や調査対象を変えずに行われてきた。今回は年次別の原因食物およびアナフィラキシーショック原因食物に関して分析する。

#### 9) 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

教材の目的は、食物アレルギー患者の食生活の疑似体験をとおして、食物アレルギー患者に対する誤認と偏見をなくし、食物アレルギーについての理解促進を図る。教材の対象年齢は、家庭科学習が始まる小学校 5 年生を中心として、小学生以上を想定している。

教材開発では、ゲーミングシミュレーションの研究やこれまで健康危機分野でゲーム開発を行ってきた研究協力者、そして、食物アレルギー患者を抱える NPO 団体との議論、また管理栄養士有資格者との議論によった。

コミュニケーションを図ることからゲーミングシミュ

レーションとしてカードゲーム形式を採用することにした。

### C. 研究結果、考察、結論

#### 1) 鶏卵、牛乳、エビの誘発量の決定に関する研究

加熱卵微量負荷試験を行った症例は 128 名(平均年齢  $4.2 \pm 2.5$  歳)、平均卵白特異的 IgE は  $17.0 \pm 21.7$  UA/ml、平均オボムコイド特異的 IgE は  $12.1 \pm 20.0$  UA/ml であった。陽性は 23 名(平均年齢  $3.4 \pm 1.3$  歳)、平均卵白特異的 IgE は  $15.3 \pm 14.9$  UA/ml、平均オボムコイド特異的 IgE は  $9.8 \pm 14.9$  UA/ml。

加熱卵普通量負荷試験を行った症例は 168 名(平均年齢  $4.7 \pm 2.7$  歳)、平均卵白特異的 IgE は  $12.9 \pm 19.8$  UA/ml、平均オボムコイド特異的 IgE は  $9.8 \pm 17.6$  UA/ml であった。陽性は 89 名(平均年齢  $5.2 \pm 2.7$  歳)、平均卵白特異的 IgE は  $18.3 \pm 24.0$  UA/ml、平均オボムコイド特異的 IgE は  $14.6 \pm 22.0$  UA/ml であった。

牛乳微量負荷試験を行った症例は 82 名(平均年齢  $4.7 \pm 3.0$  歳)、平均牛乳特異的 IgE は  $12.4 \pm 21.1$  UA/ml、牛乳普通量負荷試験を行った症例は 122 名(平均年齢  $4.9 \pm 2.9$  歳)、平均牛乳特異的 IgE は  $7.7 \pm 14.9$  UA/ml であった。

加熱卵と牛乳の最小誘発量の検討では、陽性者の 95% を含む域値は  $29.2 \mu\text{g}$ 、牛乳に関しては  $1265.5 \mu\text{g}$  であった。99% のそれらに関する値は卵  $2.7 \mu\text{g}$ 、牛乳  $22.9 \mu\text{g}$  であった。このことから、大多数の患者は、加工食品の表示をみて購入すれば安全に食べる事が出来ると考えられた。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は限界があることも判明した。

経口負荷試験を安全に行うために微量から開始した方が良いと思われる症例は、一度も摂取歴がない食品の検査の場合、誤食による誘発歴があっても域値が不明な場合、負荷試験が陽性となる可能性が高い患者での誘発閾値を明らかにしたい場合等が考えられた。

エビ負荷試験陽性者 20 名で 90% の患者の最小誘発エビタンパク質量は、 $88.4 \text{ mg}$  であった。

結論：大多数の卵・牛乳・エビに対するアレルギー患者は、加工食品の表示をみて購入すれば安全に食べる事が出来ると考えられた。

#### 2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に

## 関する研究

インターネットで回収された約 400 事例の中、384 例の解析が可能であった。患者からの情報収集を開始した結果、トラブル発生場所は自宅からの事例が多かった。約 40%が表示食品のチェックをきちっと行っていけば予防ができたと回答した。また、感作経路が経口ではなく経皮からの感作が疑われる例もあった。

これらを合わせて現在解析中である。最終的にはアンケートで集まった事例を参考にして、平成 23 年度に場面ごとの手引を作成する。

結論：トラブル発生場所は自宅が多く、中には皮膚からの感作が疑われるような症例もあった。約 40%が表示食品のチェックを行っていけば予防ができたと回答した。

### 3) アレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の作成

卵・牛乳・小麦・大豆など含有タンパク質量によってレベル別に分類した食品交換表を作成し、パンフレットとして作成した。食物アレルギー患者の QOL 向上に役立つ。また安全係数を乗じることで、経口負荷試験とのリンクも可能であると考えている。

しかし、このパンフレットの問題点は、メーカーが食品の規格を変えるごとに見直しが必要になる事であり、食品メーカー側との連携協力が不可欠という点である。

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。

結論：卵・牛乳・小麦・大豆の含有タンパク質量をレベル別に分類した食品交換表を試作した。今後さらにブラッシュアップして公表する予定である。

### 4) イクラの交叉反応性についての検討

イクラとウニの間には ELISA inhibition で共通抗原性が証明され immunoblot inhibition で低分子タンパク質が原因抗原と考えられた。

イクラとウニとの間に共通抗原性があり、その原因として両者の低分子タンパクの相同性が考えられた。今後、両者の共通抗原性について検討が必要であると思われた。

結論：イクラアレルギー患者の多くがウニとの間に共通抗原性を示した。

### 5) 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（小麦とピーナッツ）

小麦：診断時の平均年齢 3 歳、評価検査時の平均年齢 5 歳であった。小麦アレルギー持続群は 47 例、耐性群は 40 例で、両群間に診断・評価時の年齢や経過観察期間の有意差は認めなかった。

診断時の小麦 IgE は持続群 (24.6 U<sub>A</sub>/ml) に対して耐性群 (14.3) は有意に低値(p<0.05)であった。評価時、持続群(19.2)は診断時と有意な変化を認めなかったが、耐性群(6.1)は診断時と比較して有意に低下した。しかし、両群ともに診断時・評価時に高い抗体価を示す症例が多く、抗体価で耐性獲得を予測する事は困難と思われた。

診断時の rω-5G-IgE も、持続群(2.6)と耐性群(1.28)に有意差(p<0.05)を認め、評価時には持続群(1.43)、耐性群(0.49)と耐性群において診断時と比較して有意に低下した。さらに、耐性群において、診断時に抗体価がクラス 1 以上であった 33 例中 20 例(60.6%)がクラス 0 まで陰性化した。

小麦アレルギー診断時の IgE 抗体価や経年的な抗体価の低下は、小麦アレルギーの予後と有意な関連を認め、さらに rω-5G-IgE はより明確な耐性化の指標となることが示唆された。特に耐性群において rω-5G-IgE 抗体価が陰性化する症例を多く認めた事は、他の食物アレルゲンには見られない特徴であると思われた。こうした現象がおきる機序については今後の検討課題であるが、食物アレルギーの耐性化と IgE 抗体価の変化について、アレルゲンコンポーネント毎に検討していくことの重要性を示している。

ピーナッツ:PA 群では、全例でピーナッツ IgE 抗体価が大豆特異的 IgE 抗体価よりも高値を示した。コンポーネント特異的 IgE 抗体の中では、Ara h 2 が最も優れた診断精度を示し、0.35U<sub>A</sub>/ml 以上で感度 76.2%、特異度 75.8%であった。Ara h 1 は特異度 81.8%であるものの感度は 50.0%に留まった。

Ara h 8 陽性者は 2 人のみであったが、いずれも Ara h 1、Ara h 2 が陰性で口腔症状のみを認めた症例であった。Ara h 9 が高値を示した 1 例も Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3 陰性例であったが、症状ではアナフィラキシーを認めた。

今回の結果からは、ピーナッツと大豆の IgE 抗体価を比較することで、真のピーナッツアレルギーと感作例を鑑別する参考になることが示唆された。

さらに、ピーナッツに特異性の高いリコンビナ

ントのピーナッツコンポーネントを用いた IgE 抗体検査は、高い診断感度と特異性を示した。特に Ara h 2 と Ara h 1 は欧米からの報告と同様に高い診断精度を示しており、臨床検査として早期に導入されることを期待したい。

Ara h 8 は、花粉症に関連する口腔アレルギー症候群に関与すると考えられている。今回陽性を示した 2 例も花粉感作に関連するピーナッツアレルギーであることが示唆される。

Ara h 9 は LTP であり、モモの Pru p 3 を代表として野菜・果物の摂取によって直接感作されたアレルギーで時にアナフィラキシーを呈することが知られている。今回の 1 例も LTP をアレルゲンとするピーナッツアレルギーと考えられた。

結論：小麦における  $\omega$ -5 グリアジンや、ピーナッツの各種コンポーネント特異的 IgE 抗体検査は、食物アレルギーの診断精度向上のみならず、食物アレルギーの新たな病型分類や予後の推定、食事指導に有用な情報をもたらすものと考えられた。

#### 6) 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

魚類：ヤマメ 3 個体、サクラマス 3 個体から調製した加熱抽出液を SDS-PAGE で分析したところ、10 kDa 付近のパルブアルブミンは明らかにヤマメの方が多いたことが判明した。抗カエルパルブアルブミン抗体を用いた ELISA による定量で、ヤマメおよびサクラマス普通肉中のパルブアルブミンを定量した結果、ヤマメでは 1.8-7.8 mg/g、サクラマスでは 0.28-0.52 mg/g となり、SDS-PAGE の結果とよく対応していた。パルブアルブミンを認識する患者血清は明らかにヤマメ抽出液に対して強く反応した。次に両魚種のパルブアルブミンをカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよび逆相 HPLC により精製した。両魚種ともにパルブアルブミンは 3 つのピークに検出された(ヤマメ PA I、PA II、PA III、サクラマス PA I、PA II、PA III と呼ぶ)。これらパルブアルブミンの分子量を分析した結果、ヤマメの PA I、PA II および PA III は、それぞれサクラマスの PA I、PA II、PA III と非常に近い値であった。これらの結果から、組成比はやや異なるかもしれないが、両魚種のパルブアルブミンは同じ 3 成分のアイソフォームで構成されていると考えられる。

本研究結果から、少なくともパルブアルブミン

を認識する魚類アレルギー患者にとっては、ヤマメの方がサクラマスよりアレルギー発症の可能性が高いといえる。*Oncorhynchus nerka* の陸封型(ヒメマス)と降海型(ベニザケ)は同等の IgE 反応性を示すという Kond et al. (Allergol Int 2009;58:295-299)の結果も考慮すると、サケ類の表示奨励は降海型に限っている現行のアレルギー表示制度は見直しの必要があるかもしれない。結論：ヤマメおよびサクラマスは同じ 3 成分のパルブアルブミンアイソフォームを含む。パルブアルブミン含量はヤマメの方が明らかに高いので、アレルギーの点ではヤマメの方が重要である。

甲殻類：患者血清を用いた ELISA により、rSCP は nSCP とほぼ同等の IgE 反応性を示すと判断された。また、事前に患者血清を nSCP あるいは rSCP とインキュベートすると、nSCP との反応性も rSCP との反応性も同程度に阻害された。

結論：本研究で得た rSCP は、今後の甲殻アレルギー研究や甲殻アレルギーの診断において、標準アレルゲンとして有用であると思われる。

SCP の IgE エピトープに関する検討：患者血清とブラックタイガーSCP の反応性を EGTA 非存在下および存在下で ELISA により調べたところ、いずれの患者血清も EGTA 存在下で反応性が約半分に低下した。一方、EGTA 存在下では  $\alpha$ ヘリックス含量の減少がみられ、立体構造がやや変化していることが確認された。ブラックタイガーSCP の全長をカバーする 18 種類の合成ペプチドは、患者血清を用いた蛍光 ELISA の結果からすべて IgE 反応陰性と判断された。SCP は  $Ca^{2+}$  結合性タンパク質であるが、ブラックタイガーSCP からキレート剤(EGTA)を用いて  $Ca^{2+}$  を除去すると、IgE 反応性は約半分に低下することを見いだした。CD スペクトルの測定により、ブラックタイガーSCP の立体構造は  $Ca^{2+}$  除去により少し変化することが判明した。 $Ca^{2+}$  除去による IgE 反応性の低下とあわせて、 $Ca^{2+}$  結合によって保持されている立体構造が IgE エピトープとして重要であることを意味している。しかし、 $Ca^{2+}$  除去によっても IgE 反応性が完全に消失するわけではないので、一次構造エピトープも存在する可能性が考えられた。そこで、ブラックタイガーSCP の全長をカバーするオーバーラップペプチドを合成して IgE 反応性を ELISA で評価したが、IgE 反応性を示すペプチドは認められなかった。これらの結果から、ブラックタイガーSCP の IgE エピ



トープは立体構造のみに依存していると考えられた。

結論:ブラックタイガーSCPのIgEエピトープは、アミノ酸配列ではなく立体構造に依存している。Ca<sup>2+</sup>を除去すると立体構造が変化し、IgE結合能が低下する。

貝類:クロアワビパラミオシンをコードする完全長 cDNA (3025 bp) をクローニングすることができた(塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースの accession No. AB571843 に登録済み)。クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンとは約 70%という高い相同性を示したが、アレルゲンとして同定されているダニ類やアニサキスのパラミオシンとの相同性は約 35%であった。

クロアワビパラミオシンは他の軟体動物のパラミオシンと交差性を示すだけでなく、クロアワビトロポミオシンとも交差性を示すという興味深い事実が明らかにされている。そこで、クロアワビパラミオシンおよびムラサキイガイパラミオシンのアミノ酸配列を BLAST でクロアワビトロポミオシンの配列と比較した。その結果、クロアワビパラミオシンの 3 つの領域 (<sup>181</sup>LKLQVDDLSRQ<sup>192</sup>、<sup>315</sup>LNTRIAQLEDE<sup>325</sup>、<sup>681</sup>LFNENVRLADE<sup>691</sup>)、ムラサキイガイパラミオシンの 3 つの領域 (<sup>184</sup>LKAAVDDLTRQ<sup>194</sup>、<sup>318</sup>LSIKIQELED<sup>328</sup>、<sup>684</sup>LQAEVNRLADE<sup>694</sup>) はクロアワビトロポミオシンの 249-259 の領域 (LQKEVDRLEDE) に類似していることが判明した。領域 249-259 は brown shrimp トロポミオシンで報告されている IgE エピトープの一つで、この領域のアミノ酸配列は甲殻類のトロポミオシン、クロアワビを含む軟体動物のトロポミオシンのすべて保存されている。したがって、甲殻類と軟体動物のトロポミオシンの間での抗原交差性の少なくとも一部は、アミノ酸配列が保存されている領域 249-259 によって説明可能である。同様に、クロアワビおよびムラサキイガイの上記 3 つの領域は、パラミオシンとトロポミオシンとの間の交差性の説明になるかもしれない。もしそうなら、軟体動物パラミオシンは甲殻類トロポミオシンとも交差することが考えられるので、今後の検討が望まれる。

結論:クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列はムラサキイガイパラミオシンと高い相同性を示し、抗原交差性を裏付けている。しかし、ダニ類

やアニサキスのパラミオシンとの配列相同性は低く、交差性はないと思われる

## 7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法

### ① 特定原材料ELISAキット用タンパク質抽出液の改良

標準品に関する検討: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。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する場合が見られたが、全体としては両抽出液間で大きな差は見られなかった。また、標準品メーカーによるSDS-PAGE電気泳動の結果、どの品目の場合も、タンパク質の泳動パターンについて抽出液の違いによる大きな差は見られず、両抽出液それぞれを用いて調製した標準品はほぼ同等であることが確認された。

加工食品の測定に関する検討:2-ME含有抽出液を用いるELISA系、及び亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いるELISA系の両方を用いて、実際に加工食品中の特定原材料の定量を行い、両者の結果を比較した。卵、牛乳、小麦、そば、落花生、甲殻類の6品目それぞれについて、両系の測定値の間には良好な相関が見られた。

従来法と改良検査法の同等性評価のガイドライン案に関する検討:上記の結果も考慮に入れ、アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン案を作成した(詳細後述)。

検量線、従来法との相関、精度、検出限界・定量限界、特異性の各項目について検討し、従来法と改良検査法との間で比較し、同等性を評価することとした。本ガイドライン案が改良検査法の評価法として認められた際には、特定原材料の定量検査法について、偽陽性反応等に対応するための改良が現在と比較してより円滑に行われるようになり、ELISAキットによる検査の正確性の向上、ひいては食物アレルギー患者の安全確保につながるものと考えられる。

結論:2-ME を含有する従来の抽出液に代わるものとして、亜硫酸ナトリウム含有抽出液に関する検討を行った結果、従来の 2-ME 含有抽出液を用いて調製した場合と同様の結果が得られ、再現性が確認された。また、加工食品を検体とし、2-ME 含有抽出液を用いた場合のELISAの測定値と亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた場合の測定値とを比較したところ、ほぼ同等の測定結果が得られることが示された。

また、今回のような特定原材料定量検査法の改良に対応するため、従来法と改良検査法との同等性を評価するガイドライン案を作成した。

#### ②果実類検知 ELISA 法の開発

キウイフルーツ検出法の開発:キウイフルーツから調製した標準粉末からタンパク質を抽出し、標準曲線を作成した。この標準曲線を用いることにより、0.78-50 ng/mL の範囲でキウイフルーツタンパク質を定量することが可能であった。

モデル加工食品中のキウイフルーツタンパク質の定量分析:10 µg/g のキウイフルーツタンパク質を含有する 9 種類のモデル加工食品を調製し、上記ELISA系を用いてのキウイフルーツタンパク質の定量分析を行った。その結果、9 種のモデル加工食品を測定した場合の回収率は 62.4-106.6 %の範囲に入っていた。これは通知検査法に示されている、定量検査法が満たすべき回収率の基準(50-150%)に合致するものであった。

キウイフルーツの抽出時にシステインプロテアーゼ阻害剤の添加、及び、抽出後の加熱処理を行い、安定した標準品の作製が可能となった。また、モデル加工食品からの回収率が、通知検査法の基準範囲に収まったことから、本ELISA系の定量検査法としての有用性が示された。今後は、キウイフルーツの品種間の反応性の違いや、他の食品への交差反応性の確認、各種モデル食品における回収率の異なる検証を行った後、キウイフルーツ検出用 ELISA キットとしての製品化を図るとともに、性能検証のための多機関バリデーションに向けた検討を進める。

結論:回収率は 62.4~106.6 %となり、通知検査法に記載されている定量検査法の基準範囲内に収まっていたことから、定量検査法としての有用性が示された。

#### バナナ検出法の開発

抗変性バナナ Class I キチナーゼ(以下、CIC)モノクローナル抗体の作製:変性CICをマウスに免疫することにより、現在までに抗変性 CIC モノクローナル抗体を 2 種類確立した。今後は、モノクローナル抗体の種類を増やし、抗体の組み合わせを選択することにより、バナナ検出用 ELISA の開発を進める。また、他の植物由来キチナーゼとの交差反応性についても検証する。

結論:バナナ検出用 ELISA を構築するため、抗変性 CIC モノクローナル抗体を 2 種類確立した。

#### ③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

特定原材料7項目検査用 BIST では、各ピーズ上で特異的な抗原抗体反応が起きていることが判明し、7項目同時検査の可能性が示唆された。BISTによる多項目 ELISA の同時測定実現には、使用する抗体の性能が大きく影響しており、新規検査法として確立するためには、BIST 専用に特異性の高い抗体を使用する必要があった。BISTの特長を活かした小型の全自動測定装置を使用することで、従来の ELISA 法より迅速で簡便な検査の実現が期待できる。

結論:BIST による多項目 ELISA の同時測定の基礎的検討を行い、10 µg/g のタンパク質を検出可能であった。

また、Canada, USA, EU, Australia, Japan の国際コミュニティの中で、食物アレルギー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を検討し、卵と牛乳の検知法に関して国際的な指針を確立した。食物アレルギー表示の閾値を設定をしているのは世界でわが国のみであり、この閾値の設定がわが国のアレルギー表示の適正化が進んでいる要因と国際的に評価されている。

結論:国際的なアレルギー検査法及び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しては、今後も引き続き検討に積極的に参加する。

#### ④ゴマアレルギーの解析

市販の白ゴマ及び黒ゴマよりタンパク質を抽出し、ゴマアレルギー患者血清との反応性をウェスタンブロットリングにより解析した結果、全体として、患者血清は、11S グロブリン、2S アルブミンを含む複数のゴマタンパク質に対して反応性を示した。次に、11S グロブリンのアミノ酸配列の中で患者血清中の抗体が認識するエピトープ配列の位置を絞り込むため、11S グロブリンの isoform 1(438aa)と isoform 2(474aa)をそれぞれ 3 つのフラグメントに分割して発現させ、患者血清との反応性を検討した結果、isoform 1, 2とも全てのフラグメントに対して血清が反応した。これらの結果から、3 種のフラグメントの全てにエピトープとなり得るアミノ酸配列が存在する可能性が示された。結論:ゴマの負荷試験陽性で比較的強い症状の出る患者さんの血清では、やはり11Sグロブリンに強く反応することが示され、11Sグロブリンのアレルゲンとしての重要性が示唆された。

また、11Sグロブリン isoform 1 及び 2 の全長を 3 個に分割したフラグメントに対するウェスタンブロットリングの結果、全てのフラグメントに対してゴマアレルギー患者の血清が反応したことから、ゴマ11Sグロブリンのエピトープはタンパク質全長にわたって複

数存在することが示唆された。

#### 8) 食物アレルギーの原因抗原の分布調査

##### ①即時型食物アレルギーの原因食物の変遷

各年次とも鶏卵、乳製品、小麦が3大原因食物であった。上位3抗原で徐々に増加傾向を認めた。また上位10抗原は、平成20年の順位をもとにすると、ピーナツ、イクラ、エビ、そば、大豆、キウイ、カニで順位の変化はあれども固定している。食品衛生法に基づく特定原材料等の25品目に該当しない抗原は、平成13・14年調査ではメロン、マグロ、タコ、ゴマ、タラ、アジ、ホタテガイであった。また平成17年調査ではマグロ、メロン、ゴマ、タイ、カシューナッツ、アジ、ブリであった。平成20年調査ではゴマ、アジ、カシューナッツ、ピワ、タラコ、メロンであった。

主要原因食物に関して年次ごとの増減を見ると、鶏卵は変わらないが、乳製品および小麦は漸増している。またそれ以下でも、ピーナツ、イクラが漸増している。

##### ②アナフィラキシーショック誘発食物の変遷

各年次とも鶏卵、乳製品、小麦が3大原因食物であった。また上位5抗原は、平成13・14年および17年ではソバ、ピーナツが続くが、平成20年調査では、ソバの代わりにエビが第5位となった。食品衛生法に基づく特定原材料等の25品目に該当せず2例以上の報告があった抗原は、平成13・14年調査ではブリ、タコ、平成17年調査ではカシューナッツ、メロン、マグロ、カキ(貝)、平成20年調査ではアーモンド、カシューナッツ、タラコであった。

我が国の即時型食物アレルギーの主要原因食物はこの9年間同一の10抗原で変化がなかった。特に3大原因食物である鶏卵、牛乳、小麦は年次ごとに寡占傾向を示しており、これら3抗原の臨床情報や行政管理、社会対応やサービスの拡充が引き続き求められる。

しかし、詳細に見ると、牛乳、小麦、ピーナツ、イクラなどの特定の原因食物の頻度は漸増してきていた。その原因は不明であるが、非常に興味深く、今後も引き続き継続して調査を行い変化の傾向を見定める必要がある。

アナフィラキシーショック原因食物に関しても同様の傾向が見られ、鶏卵、牛乳、小麦に対する対策の拡充を進めることが勧奨される。

また一部特定原材料等に挙げられていない食物の中で、頻度は高くないが定期的に報告される抗

原やアナフィラキシーショックを誘発する抗原があり、今後特定原材料等への議論が必要であろう。

結論:我が国の即時型食物アレルギーおよびアナフィラキシーショック誘発原因食物はこの9年間で、特定の食物で一定の傾向を示しているが、大きな変化を示していない。引き続き鶏卵、牛乳、小麦が圧倒的に多く、今後の臨床、行政の施策は主要原因食物に重点を置き注力すると良い。

#### 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

カードゲームのルールを確定し、ルールブックを完成させた。

ゲームの利用場所を学校等と考え、ファシリテーション役となる教員向けのルールブックの作成となった。しかし、実際に学習現場で利用するためには指導要綱などが必要になり、ゲームに参加した児童生徒向けリーフレットなどを必要であろう。

結論:ビジュアルに試作品や遊び方のリーフレットを完成させた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

- 1) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R, Convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. Allergy. 2010; 65: 1266-1273.
- 2) Kondo N, Nishimuta T, Nishima S, Morikawa A, Aihara Y, Akasaka T, Akasawa A, Adachi Y, Arakawa H, Ikarashi T, Ikebe T, Inoue T, Iwata T, Urisu A, Ebisawa M, Ohya Y, Okada K, Odajima H, Katsunuma T, Kameda M, Kurihara K, Kohno Y, Sakamoto T, Shimojo N, Suehiro Y, Tokuyama K, Nambu M, Hamasaki Y, Fujisawa T, Matsui T, Matsubara T, Mayumi M, Mukoyama T, Mochizuki H, Yamaguchi K, Yoshihara S; Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology, Japanese pediatric guidelines for the treatment management of bronchial



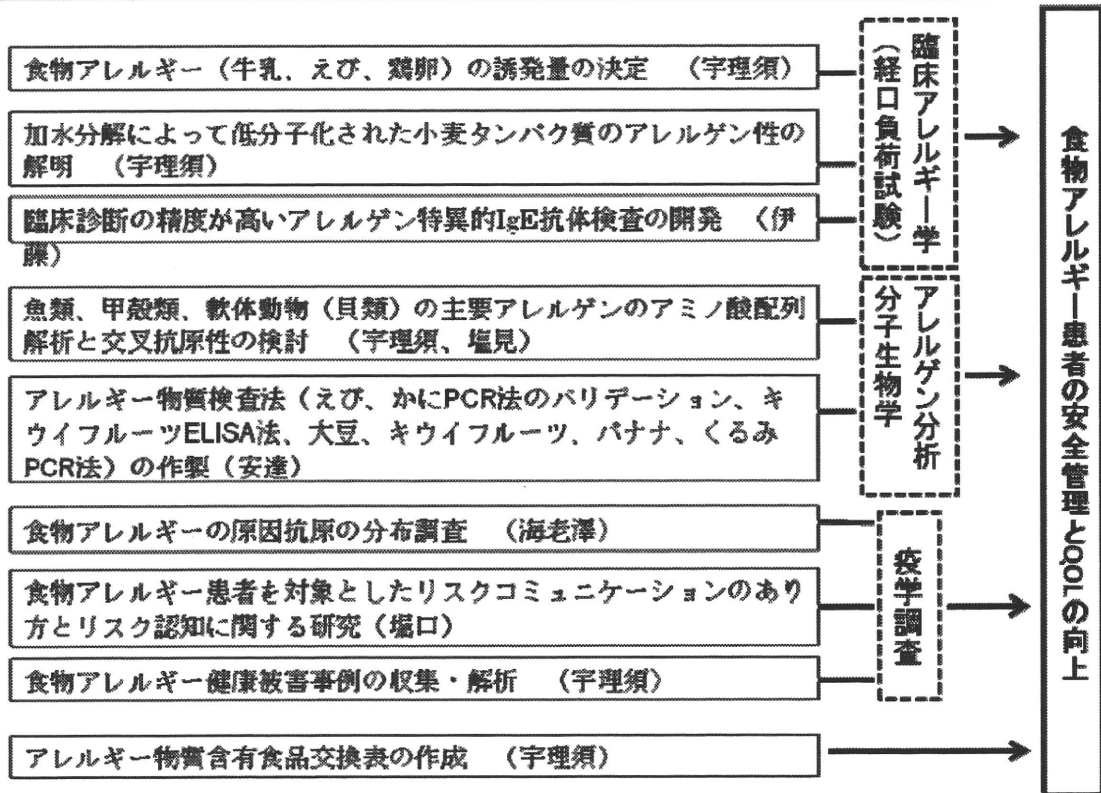
- asthma 2008. *Pediatr Int.* 2010; 52:319.
- 3) Benhamou AH, Caubet JC, Eigenmann PA, Nowak-Węgrzyn A, Marcos CP, Reche M, Urisu A, State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy.* 2010; 65: 283-289.
  - 4) Tsuge I, Kondo Y, Nakajima Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Urisu A, Hyper IgM syndrome and complement Clq deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease, *Clinical and Experimental Rheumatology* 2010; 28: 558-560.
  - 5) Torii S, Torii A, Itoh K, Urisu A, Terada A, Fujisawa T, Yamada K, Suzuki H, Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Nonaka A, Hatanaka M, Fujiwara S, Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum markers of atopic dermatitis in children., *Int Arch Allergy Immunol* 2010;154: 236-245.
  - 6) 伊藤浩明 食物アレルギー経口負荷試験ガイドライン 2009 解説 資料 1-7. 日本小児アレルギー学会誌 24(3), 365-368, 2010.
  - 7) 高岡有理、二村昌樹、坂本龍雄、伊藤浩明 遷延する牛乳アレルギーの予後に関連する因子の検討. *アレルギー* 59(11), 1562-1571, 2010
  - 8) 柴原裕亮, 上坂良彦, 阿部晃久, 山田彰一, 潮 秀樹, 塩見一雄: ELISA 法による食品中の頭足類アレルギーの検出. *日本食品科学工学会誌*, 57, 198-204 (2010)
  - 9) 清木興介, 織田浩司, 柴原裕亮, 蒲生玲子, 有馬優美, 酒井信夫, 中村 厚, 安達玲子, 塩見一雄, 梶山 浩, 手島玲子: 加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討. *食品衛生学雑誌*, 51, 133-138 (2010)
  - 10) K. Shiomi, S. Yoshida, T. Sawaguchi and S. Ishizaki: A major IgE epitope of rainbow trout collagen  $\alpha 2$  chain. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 51, 153-159 (2010)
  - 11) 塩見一雄: 魚介類アレルギーに関する最新の分子生物学的知見. *食品衛生学雑誌*, 51, 139-152 (2010)
  - 12) Y. Kobayashi, K. Ikeda and K. Shiomi: Elucidation of IgE-binding epitopes of Ani s 1, the major *Anisakis simplex* allergen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 174, 128-131 (2010)
  - 13) 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, イカによる食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの一例. *アレルギー*, 59, 1634-1641 (2010)
  - 14) M. Suzuki, Y. Kobayashi, Y. Hiraki, H. Nakata and K. Shiomi: Paramyosin of the disk abalone *Haliotis discus discus*: identification as a new allergen and cross-reactivity with tropomyosin. *Food Chem.*, 124, 921-926 (2011)
  - 15) Taguchi H, Watanabe S, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Sakata K, Urisu A, Teshima R. Differential detection of shrimp and crab for food labeling using polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*, in press.
  - 16) Akiyama H., Imai T., Ebisawa M., Japan Food Allergen Labeling Regulation – History and Evaluation, *Advances in Food & Nutrition Research*, in press.
  - 17) Sakai Y., Ishihata K., Nakano S., Yamada T., Yano T., Uchida K., Nakao Y., Urisu A., Adachi R., Teshima R., Akiyama H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, *J Agric Food Chem.*, 58, 8145-8151 (2010)
  - 18) Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B, Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M, Wehling P, Taylor S.L, Poms R.E, Delahaut P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, *J.AOAC Int.*, 93, 442-450 (2010)
  - 19) 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.* 93(4), 1255-1261 (2010).
- 20) 中村厚, 酒井信夫, 川浦知子, 小林政人, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子, すり身およびその加工食品中に自然混入する甲殻類の実態調査, *日本食品化学学会誌*, 17, 213-220 (2010)
- 21) 清木興介, 織田浩司, 柴原裕亮, 蒲生玲子, 有馬優美, 酒井信夫, 中村厚, 安達玲子, 塩見一雄, 穂山浩, 手島玲子, 加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討, *食品衛生学雑誌*, 51, 133-138 (2010)
- 22) 安達玲子, アレルギー物質を含む食品の検査法, *食品衛生学雑誌*, 51, J-359-361 (2010)
- 23) 穂山浩, 安達玲子, 手島玲子, アレルゲン解析と検知法, *ぶんせき*, 8, 397-404 (2010)
- 24) 穂山浩, 未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究, *食品衛生学雑誌*, 51, J-411-414 (2010)
- 25) 穂山浩, 食物アレルゲン解析の進歩, *小児科診療*, 63, 2423-2432 (2010)
- 26) Sato S, Tachimoto H, Shukuya A, Kurosaka N, Yanagida N, Utsunomiya T, Iguchi M, Komata T, Imai T, Tomikawa M, Ebisawa M : Basophil Activation Marker CD203c Is Useful in the Diagnosis of Hen's Egg and Cow's Milk Allergies in Children , *International Archives of Allergy and Immunology.* 152(1) ; 54-61. 2010
- 27) Sato Y, Akiyama H, Matsuoka H, Sakata K, Nakamura R, Ishikawa S, Inakuma T, Totsuka M, Sugita-Konishi Y, Ebisawa M, Teshima R. : Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy., *J Agric Food Chem.* 58(12) ; 7180-6. 2010
- 28) Alessandro Fiocchi, (Chair), Jan Brozek, Holger Sch nemann, (Chair), Sami L. Bahna, Andrea von Berg, Kirsten Beyer, Martin Bozzola, Julia Bradsher, Enrico Compalati, Motohiro Ebisawa, Maria Antonietta Guzm n, Haiqi Li, Ralf G. Heine, Paul Keith, Gideon Lack, Massimo Landi, Alberto Martelli, Fabienne Ranc , Hugh Sampson, Airton Stein, Luigi Terracciano and Stefan Vieths : World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines , *Pediatr Allergy Immunol.* 21 (Suppl. 21) ; 1-125. 2010
- 29) Fiocchi A, Schünemann HJ, Brozek J, Restani P, Beyer K, Troncone R, Martelli A, Terracciano L, Bahna SL, Rancé F, Ebisawa M, Heine RG, Assa'ad A, Sampson H, Verduci E, Bouygue GR, Baena-Cagnani C, Canonica W, Lockey RF. : Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA): A summary report. , *J Allergy Clin Immunol.*126(6) ; 1119-1128.e12. 2010
- 30) 緒方美香, 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2報) -牛乳アレルギー-, *アレルギー.* 59 (7) ; 839-846. 2010
- 31) 堀口逸子, 黒瀬琢也, 日高良雄, 丸井英二. 感染性胃腸炎対策研修プログラムにおけるゲーミングシミュレーション利用の評価. *厚生生の指標* 56 (10) 2009 ; 41-43
- 32) 堀口逸子, 吉川肇子, 角野文彦, 丸井英二 新型インフルエンザ大流行に備えた危機管理研修教材の開発とその有用性の検討ーゲーミング・シミュレーションを利用してー. *厚生生の指標* 55(3) 2008 ; 11-15
- 33) 堀口逸子, 吉川肇子, 丸井英二. クロスロードを用いたリスクコミュニケーショントレーニング 食の安全をテーマとして. *厚生生の指標* 55(7) 2008 ; 28-33

#### 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. 分担研究報告書

## 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)
	田中 健一	(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、鶏卵（90℃15分）および牛乳で微量経口負荷試験を行った。加熱鶏卵陽性患者 112 名を対象に求めた 95%、99% 閾値はそれぞれ 29.2  $\mu\text{g}$ 、2.7  $\mu\text{g}$  であった。牛乳アレルギー患者 102 名で求めた 95%、99% の患者をカバーする最小誘発閾値はそれぞれ 1265.5  $\mu\text{g}$ 、22.9  $\mu\text{g}$  であった。このことから、大多数の患者は、加工食品の表示をみて購入すれば安全に食べる事が出来ると考えられた。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は限界があることも判明した。また、エビ負荷試験陽性者 20 名で 90% の患者をカバーする最小誘発エビタンパク質量は 88.4 mg であった。

また、特異的 IgE 抗体価や病歴から、誘発域値を推定することは不可能であることが分かった。よって、経口負荷試験を安全に行うために微量から開始した方が良いと思われる症例は、①一度も摂取歴がない食品の検査の場合、②誤食による誘発歴があっても域値が不明な場合、③負荷試験が陽性となる可能性が高い患者での誘発閾値を明らかにしたい場合等が考えられた。

### 2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究：

これまでに収集した食物アレルギー健康被害事例の解析に基づき、発生場所を自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 つのグループに分け、各グループにおける共通した原因に関する情報を拾い出すためのアンケートを作成しインターネットを利用して、現在までに約 400 例のアンケートが回収できた。そのうち解析が可能であった 384 例の解析において、トラブル発生場所は自宅が多く、中には皮膚からの感作が疑われるような症例もあった。約 40% が表示食品のチェックをきちっと行っていれば予防ができたと回答した。

### 3) アレルギー物質含有量に基づいた加工食品交換表の作成：

卵・牛乳・小麦・大豆など含有タンパク質量によってレベル別に分類した食品交換表を作成し、パンフレットとして作成した。ある程度食べられるようになった食物アレルギー患者の QOL 向上に役立つと期待している。しかし、このパンフレットの問題点は、メーカーが食品の規格を変えるごとに見直しが必要になる事であり、食品メーカー側との連携協力が不可欠という点である。

### 4) イクラの交叉反応性についての検討：

イクラとウニとの間に共通抗原性があり、その原因として両者の低分子タンパクの相同性が考えられた。また、イクラアレルギーの一部の症例がウニによる誘発症状があったことから、今後、両者の共通抗原性について検討が必要であると思われる。

## A. 研究目的

### 1) 食物アレルギーの誘発量の決定

これまで鶏卵・牛乳アレルギーにおいて症状が誘発される微量の摂取量に関する検討はなされていらない。そこで昨年度までの中間報告で、鶏卵あるいは牛乳アレルギー患者の 95% (95%陽性値) あるいは 90% (90%陽性値) をカバーする閾値について検討した。加熱鶏卵陽性患者(95名)での 90%、95%陽性値はそれぞれ 719.3  $\mu$ g(1/1250 個)、194.5  $\mu$ g(1/4500 個)で、最小誘発加熱鶏卵タンパク質量は 1.75  $\mu$ g(1/500,000 個)であった。また、牛乳陽性患者(72名)での 90%陽性値は 1951.5  $\mu$ g(牛乳 0.06mL)、95%陽性値は 285  $\mu$ g(牛乳 0.009mL)で、最小誘発牛乳タンパク質量は 10  $\mu$ g(0.0003mL)であった。

今年度はさらに症例数を増やして検証する。また甲殻類の誘発域値についても検討を行う。

### 2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

事例の場面ごとでの対策マニュアルを作成するため、昨年度までに我々は、収集した食物アレルギー健康被害事例の解析に基づき、発生場所を自宅、園・学校、友人宅、外食とキャンプの 5つのグループに分け、各グループにおける共通した原因に関する情報を拾い出すためのアンケートを作成した。

今年度は、作成したアンケートをインターネットホームページに掲載し、患者からの情報収集を開始した。

### 3) アレルギー物質含有食品交換表(交換表)の作成

食物アレルギー患者のほとんどは加齢に従いある程度まで原因食品を食べられるようになってくる。これまでそういった患者が、安全に加工食品を選ぶ際に役立つシステムがなく誤食につながっていた。

含有タンパク質量によってレベル別に分類した食品交換表を作成すれば、このような問題を解決できると期待し、昨年度までに行った研究では、経口負荷試験から求めた推定安全ゾーンから安全に摂取できるための完全係数 1/1,000 から 1/10 について検討した。その結果安全係数は 1/100 が良いと思われた。今年度は、これらの結果を踏まえて、卵・牛乳タンパク含有食品表を完成させる。

### 4) イクラの交叉反応性についての検討

イクラは乳幼児期に即時型反応をきたす主要な原因の一つで、多くの症例は初回の摂取で症状をきたす。このことから交差抗原性を有する食品による感作が既に成立している個体が、イクラを食べた時に発症すると考えられるが、これまで鶏卵やその他の魚卵とイクラとは有意な共通抗原性は見出されていない。

予備実験としてイクラアレルギー患者 10 名の血清を用いて、卵黄、サケ、タラコ、カズノコ、ウニ抗原と ELISA inhibition を行った結果、ウニを阻害抗原として使用した場合に最も高率にイクラ IgE 結合能を抑制した。この結果から、今回イクラとウニに焦点を絞り、両者の交叉反応性の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 牛乳、鶏卵の誘発量の決定に関する研究

負荷試験の方法は昨年度までと同様の方法で、加熱(90°C、15分)鶏卵経口負荷試験で準備した食品は以下に示す A 液と B 液である。90°C15分加熱全卵(FASTKIT エライザ Ver. II で測定した卵タンパク質 1300mg)を 100ml のジュースに溶かし、そのうちの 0.1ml(卵タンパク 1300  $\mu$ g)を 50ml のジュースに溶かした A 液と、90°C15分加熱全卵(卵タンパク質 1300mg)を 50ml のジュースに溶かした B 液で、加熱(90°C15分)微量負荷試験は 30 分ごとに以下の 1-5 の順に増量し初日は終了とした(加熱卵微量負荷試験)。

(FASTKIT エライザ Ver. II で測定した卵タンパク質量 mg)

- 1、A 液 0.1 ml (0.002)
- 2、A 液 1.0 ml (0.02)
- 3、A 液 10 ml (0.26)
- 4、A 液 30 ml (0.78)

これら微量負荷試験が陰性であった場合に、加熱(90°C15分)鶏卵負荷試験を以下の 1-4 の順に 30 分ごとに実施した(加熱卵普通量負荷試験)。

(FASTKIT エライザ Ver. II で測定した卵タンパク質量 mg)

- 1、B 液 0.1 ml (1.3)
- 2、B 液 1.0 ml (13.0)
- 3、B 液 10 ml (130.0)
- 4、B 液 38.9 ml (505.0mg)

牛乳経口負荷試験で準備した負荷試験用食品は、