

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
分担研究報告書

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

研究分担者 安達玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 森山達哉 (近畿大学農学部)
山本貴之、伊藤花織 (株式会社森永生科学研究所)
松本貴之、森下直樹 (日本ハム株式会社)
秋元政信、加藤重城 (プリマハム株式会社)
上坂良彦、柴原裕亮 (日水製薬株式会社)
山田彰一 (日本水産株式会社)
織田浩司、小泉大輔 (株式会社マルハニチロホールディングス)
谷口嘉之、佐久間恵、中尾義喜 (オリエンタル酵母工業株式会社)
蒲生玲子、有馬優美 (株式会社ニッポンジーン)
中村厚、酒井信夫、穠山浩、手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨：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して、[1]特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良、[2]果実類検知 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の開発、[4]ゴマアレルギーの解析を行った。その結果、[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。2-ME 系 ELISA と亜硫酸ナトリウム系 ELISA の両方を用いて加工食品中の特定原材料の定量を行ったところ、両者の測定結果はほぼ同等であった。また、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 26 種類より、キウイフルーツ検出用 ELISA に用いる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モノクローナル抗体を作製し、2 種類のモノクローナル抗体を確立した。[3] 特定原材料 7 項目検査用 BIST (Bead array in Single Tip) では、各ビ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。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・g/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ールのハーモナイゼーションに関する国際的な検討に参加し、卵と牛乳の検知法に関して国際的な指針を確立した。[4] 昨年度に引き続き、ゴマタンパク質とゴマアレルギー患者血清とのウェスタンブロッティングを行った結果、主要アレルギーである 2S アルブミンの他に、タンパク量として最も多いアレルギーである 11S 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、11S グロブリン isoform 1 及び 2 を 3 個に分割したフラグメントを調製し、患者血清とのウェスタンブロッティングを行った結果、全てのフラグメントに対して反応性が見られたことから、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。

A. 研究目的

わが国では、食物アレルギー患者の原因食品摂取による健康危害を防止する目的で、特定原材料7品目（卵、乳、そば、小麦、落花生、えび、かに）の表示が義務化されており、さらに特定原材料に準ずる18品目も表示が推奨されている。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

現在の特定原材料 ELISA キットには、0.5% SDS 及び2% 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おり、この抽出液を用いて検体(加工食品)からタンパク質を抽出し、ELISAの試料とすることとなっている。また、検量線作成用標準品や希釈液にも2-MEが含まれている。平成20年6月、2-MEが毒物に指定されたため、ELISAキット、検査廃液等を毒物として取り扱うこととなり、検査の現場においては保管や廃棄等の点で不便が生じている。また、食品メーカー等で自主検査への使用を考える際にも導入が難しい状態である。このような状況を考慮し、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う。22年度においては亜硫酸ナトリウム(Na_2SO_3)を含有する抽出液を用い、ELISAキット用の標準品調製に関する検討、実際の加工食品中のアレルギータンパク質量に関する検討を行った。また、今回のような特定原材料定量検査法の改良は、今後も必要に応じて行われるべきものと考えられる。そこで、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した。

[2] 果実類検知 ELISA 法の開発

特定原材料に準ずるものである果実類のうち、キウイフルーツおよびバナナの定量的検出法の開発を目的として、ELISA法構築に関する検討

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

食物アレルギー患者の増加に伴い、特定原材料7品目（卵、乳、そば、小麦、落花生、えび、かに）の表示制度が開始され、さらに特定原材料に準じた18品目も表示が推奨されている。このような状況の下、公的機関や指定検査機関では、表示監視目的でELISA法、ウエスタンブロット法、PCR法などの検知法が実施されている。しかし食品事業者が食品工場等で自主管理に利用できるような安価・迅速・簡易な方法は存在しない。今後、表示が義務化される特定食物アレルギーは増加していくものと考えられるが、食品事業者が自主管理を目的として、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（最終改正：平成22年9月10日消食表第286号、以下通知検査法）に従った検査を行うことは、コスト面、設備等から考えると事業者にとって容易ではない。このため、食品事業者が導入することが比較的容易で、安価、迅速、及び簡易な特定食物アレルギーの検出システムが必要である。このような背景から、多項目同時解析のために開発したツールの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に検討を行った。また世界的な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会議に参加し検討を行った。

[4] ゴマアレルギーの解析

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。即時型食物アレルギー全国モニタリング調査では、食物アレルギー原因食品として、平成13-14年度には25位であったのが、17年度には17位、20年度には16位と、順位を上げている。また、EU、カナダ、オーストラリア・ニュージーランドでは、アレルギー表示品目に指定されている。

ゴマのアレルギータンパク質としては、2Sアル

ブミン、11Sグロブリン、7Sグロブリン、オレオシン等が知られている。2Sアルブミンは主要アレルゲンであり、ゴマタンパク質の20-30%を占める。3種のアイソフォームがあり、そのうち1種類についてはエピトープ解析が行われている。11Sアルブミンはゴマタンパク質の60-70%を占める、最も含有量の多いアレルゲンタンパク質であるが、詳細なエピトープ解析はまだ行われていない。そこで、本研究では11Sグロブリンのエピトープ解析を行う。

B. 研究方法

[1] 特定原材料ELISAキット用タンパク質抽出液の改良

(1) 標準品に関する検討

現行の通知検査法別添4には、各特定原材料の標準品規格が定められている。それぞれ一次標準粉末からタンパク質を抽出して標準品原液とし、さらに一次希釈液、高濃度標準液へと希釈される。現行の一次標準粉末からのタンパク質抽出液を表1に示す。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。

(2) 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。

(3) 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

(1) キウイフルーツ検出法の開発

①キウイフルーツ検出用ELISAの構築

現在までに確立した未変性および変性アクチニジ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。

②キウイフルーツタンパク質量のための標準曲線の作製

ハ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。アクチニジンがシステインプロテアーゼであるため、E-64¹⁾ (プロテアーゼインヒビター)の添加および加熱処理を行った。すなわち、標準粉末1gに0.5% SDS、2%メルカプトエタノールおよびE-64を10 µg/mL含む0.1 M Tris-HCl (pH 8.6)を20 mL加えた。標準品規格に準拠し、振とう機 (90~110 rpm) で一晚抽出した後、抽出液を10,000×gで30分間遠心分離し、上澄液を孔径0.8 µmのマイクロフィルターでろ過した。ろ過した液を、100 °Cで10分間加熱し、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。

③モデル加工食品の作製

②で作製した標準粉末を、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。

④モデル加工食品の定量分析

③で作製したモデル加工食品1g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、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出した後、100℃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。②で調製した50～0.78 ng/mLまでの2倍の希釈段を検量線に用いて、①で構築したサンドイッチELISAで測定した。

（2）バナナ検出法の開発

①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、G. KöhlerとC. Milsteinの方法²⁾に従い変性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・簡便な定量的検出法の開発

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で特定原材料7項目（卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）同時検出を実現するために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。

食物アレルゲン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] ゴマアレルゲンの解析

検討試料として市販の黒ゴマ及び白ゴマを購入

した。これらのゴマをミルサーで粉碎し、0.6Mシヨ糖含有10mMリン酸バッファー(pH 7.5)中でホモジナイズした。ろ過後、10,000×g、15分遠心し、得られたペレットをMilli-Qに懸濁してソニケーションした。再遠心後得られた上清を抽出タンパク質溶液とした。この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。ゴマアレルギー患者血清は、国立病院機構相模原病院 海老澤元宏先生、佐藤さくら先生よりご供与頂いた。市販の抗ゴマタンパク質抗体はGallus Immunotech社のものを使用した。

ゴマ11Sグロブリンのフラグメント発現に関しては、白ゴマ未熟種子を富山大学 山本将之先生よりご供与頂き、11Sグロブリンisoform 1及び2のcDNAを得た。それぞれ全長をカバーする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。可溶性タンパク質として精製することが困難であったため、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。

C. 研究結果

[1] 特定原材料ELISAキット用タンパク質抽出液の改良

（1）標準品に関する検討

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を表2に示す。Aが国立衛研における検討結果、Bが標準品メーカーにおける検討結果である。卵については、2ロットの一次標準粉末について、また落花生については、3ロット（同一の落花生を用いているがアセトンによる脱脂処理のロットが異なる）の一次標準粉末について検討した。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電気泳動像を図1に示す。21年度に報告した国立衛研での検討結果と同様、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。

(2) 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。図2に両ELISA系の測定結果の相関(例)を示す。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、グラフの横軸は2-ME含有抽出液を用いるELISA系での測定値(ppm)、縦軸は亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いるELISA系での測定値(ppm)を示す。両測定結果間の近似直線($Y=aX$)を求めた結果、直線の傾きは、0.8 - 1.1の範囲に入り、両系の測定値の間には良好な相関が見られた。

(3) 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(別紙参照)。評価の際の検討項目としては、(1) 検量線については、従来法と同等の濃度範囲において同等の定量性を有することとした。(2) 従来法との相関については、上記(2)と同様に、従来法と改良検査法との測定値の近似直線を描き、その傾きが0.75-1.25の範囲に入ること、相関係数が0.9以上であることとした。また、検討対象濃度範囲としては、数 $\mu\text{g/g}$ から10,000 $\mu\text{g/g}$ までの広範囲、及び、数 $\mu\text{g/g}$ から数10 $\mu\text{g/g}$ までのより低濃度範囲の2種類とした。なお、近似直線の傾きが0.8以下あるいは1.2以上の場合

は、濃度既知の試料からの回収率についても検討し、50-150%の範囲に入ることを確認することとした。(3) 精度については、併行精度及び日差変動に関して、改良検査法の精度が従来法と同等あるいはより高いことを示すこととした。(4) 改良検査法の検出限界、定量限界については、従来法と同等またはより小さい値であることを示すこととした。(5) 特異性については、偽陽性・偽陰性を示す食品について検討し、従来法と改良検査法との一致点・相違点を明確に示すこととした。

[2] 果実類検知ELISA法の開発

(1) キウイフルーツ検出法の開発

①キウイフルーツ検出用ELISAの構築

アクチニジンに対する26種のモノクローナル抗体よりELISAに用いる抗体を選択し、サンドイッチELISA系を構築した。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。図3に標準曲線の例を示す。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。

②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

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系を用いてキウイフルーツタンパク質の定量分析を行った。結果を表3に示す。各モデル加工食品は10 $\mu\text{g/g}$ のキウイフルーツタンパク質を含有しており、ELISA系による定量結果から回収率(真度)を算出した。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。

(2) バナナ検出法の開発

①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。

[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、各ビ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。えび・かきのタンパク質検出用にはコントロールビーズも同時に封入した BIST を作製し、えび、かき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、Canada, USA, EU, Australia, Japan の国際コミュニティーの中で、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。

[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ングにより解析した。結果を図 4 に示す。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。負荷試験陽性で比較的強い症状を示した A8-0008~0011 の患者血清では、11S グロブリン isoform2 (バンド①A) に強く反応した。負荷試験陽性だが比較的症状の弱かった A8-0012~0014 の患者血清では、タンパク質全体に対する反応性が見られ、11S グロブリンに強く反応するということではなかった。感作陽性（ゴマに対する特異的 IgE を有する）だが負荷試験陰性であった A8-0017, -0018 の患者血清の場合は、全体的にゴマタンパク質に対する反応性が低かった。Control 血清 (A8-0015, -0016) はゴマタンパク質に対してほとんど反応性を示さなかった。

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 (フラグメント間で 20-30aa のオーバーラップあり) 発現させ、患者血清との反応性を検討した。結果を図 5 に示す。電気泳動結果 (図 5-A) より、各フラグメントのバンドが対応する分子量の位置に確認された。市販の抗ゴマタンパク質抗体を用いたウェスタンブロットング (図 5-B) には、isoform 1, 2 ともに 3 種のフラグメント全てに対して抗体が反応性を示した。ゴマアレルギー患者血清を用いた検討においても、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。一方、コントロール血清では、11S グロブリンのフラグメントに対する反応性はほとんど見られなかった。

D. 考察

[1] 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良

今年度は、亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた標準品原液の調製について、標準品メーカーによる検討を行い、昨年度の国立衛研による検討結果と比較した。その結果、タンパク質の濃度及び電気泳動像とも、従来の 2-ME 含有抽出液を用いて調製した場合とほぼ同様の結果となった。このことから、亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いて調製した ELISA キット用標準品が 2-ME 含有抽出液を用いて調製した標準品とほぼ同様の特性を有することが確認された。

また、実際に特定原材料を含有する加工食品を対象として、2-ME 系 ELISA キットによる測定値と亜硫酸系 ELISA キットによる測定値との相関について検討した。近似直線の傾きは 0.8 - 1.1 の範囲に入り、両 ELISA 系の測定値はほぼ同等であることが示された。

今回のような特定原材料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。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する。

[2] 果実類検知 ELISA 法の開発

(1) キウイフルーツ検出法の開発

キウイフルーツの標準品作製では、アクチニジンがシステインプロテアーゼであるため、抽出中の分解が問題となっていた。そこで、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64 の添加、及び、アクチニジンを完全に失活させるための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更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。

(2) バナナ検出法の開発

今回、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さらに増やすとともに、現在までに作製した抗体との組み合わせを検討し、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。

[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

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 専用の特異性の高い抗体を使用する必要がある。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。今後、様々な市販食品を用い、加工食品の前処理工程の簡便化も含めた検証実験を進め、特定原材料等の簡易検査法として確立させたいと考えている。

また、食物アレルギー表示の閾値を設定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。

[4] ゴマアレルギーの解析

21 年度の本研究においては、負荷試験陽性患者 1 名、陰性患者 3 名、負荷試験未実施の患者 3 名、計 7 名の患者血清を用いて、ゴマタンパク質に対する反応性の検討を行い、アレルギー患者血清がゴマ 11S グロブリンに強く反応することを示した。今年度は患者血清数を増やし、更なる検討を行った。その結果、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、それぞれのフラグメントにエピトープが存在することが示唆された。今後はペプチドアレイ等の手法を用い、エピトープの解析を更に進める予定である。

E. 結論

[1] 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液

の改良

特定原材料の定量検査法（ELISA法）に用いるタンパク質抽出液について、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に関する検討を行った。標準品メーカーによる亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いたELISAキット用標準品の調製において、国立衛研での検討結果と同じく、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、両者の相関を示す近似直線の傾きは1に近い値となり、亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた場合も2-ME含有抽出液を用いた場合と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

(1) キウイフルーツ検出法の開発

抗アクチニンモノクローナル抗体を用いたキウイフルーツ検出用 ELISA を構築し、キウイフルーツタンパク質を 10 $\mu\text{g/g}$ となるように添加したモデル加工食品の添加回収試験を行ったところ、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。

(2) バナナ検出法の開発

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

BIST による多項目 ELISA の同時測定の基礎的

検討を行い、10 $\mu\text{g/g}$ のタンパク質を検出可能であった。今後は本研究で得られた抗体を組み合わせ安価、迅速、簡易な食物アレルギーの検出システムの構築の検討を目指す。また、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

昨年度に引き続き、ゴマタンパク質とゴマアレルギー患者血清とのウェスタンブロッティングを行った。その結果、主要アレルギーである 2S アルブミンの他に、タンパク量として最も多いアレルギーである 11S 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、11S グロブリン isoform 1 及び 2 を 3 個に分割したフラグメントを調製し、患者血清とのウェスタンブロッティングを行った結果、全てのフラグメントに対して反応性が見られたことから、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。

F. 研究発表

論文発表

- 1) 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.
- 2) Akiyama H., Imai T., Ebisawa M., Japan Food Allergen Labeling Regulation – History and Evaluation, Advances in Food & Nutrition Research, in press.
- 3) 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)
- 4) 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, *JAOAC Int.*, 93, 442-450 (2010)
- 5) 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).
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 穂山浩, 食物アレルゲン解析の進歩, *小児科診療*, 63, 2423-2432 (2010)
- 3) 田口大夢, 渡辺聡, 平尾宜司, 酒井信夫, 中村厚, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子 エビおよびカニの識別検出 PCR 法の特異性について *日本食品化学学会第 16 回総会・学術集会* (2010. 6)
- 4) 安達玲子, アレルギー物質を含む食品の検査法について *生物化学的測定研究会第 15 回学術集会* (2010. 6)
- 5) 平尾宜司, 田口大夢, 渡辺聡, 天明裕介, 穂山浩, 酒井信夫, 安達玲子, 渡邊敬浩, 松田りえ子, 手島玲子, PCR 法による食物アレルゲン検出技術 *日本食品工学会第 11 回大会* (2010. 8)
- 6) 安達玲子, アレルギー食品の表示制度と通知検査法/「えび・かに」の実態調査 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会技術研修会 (2010. 9)
- 7) Ito K, Yamamoto T, Doi H, Shoji M, Kato M, Akiyama H, Adachi R, Novel ELISA for determine food allergen in processed food. 124th AOAC Annual Meeting and Exposition (2010. 9)
- 8) 安達玲子, アレルギー物質を含む食品の検査法と表示制度の動向について *日本水産学会水産利用懇話会平成 22 年度第 2 回講演会* (2011.2)

G. 知的財産権の登録

なし

H. 参考文献

- 1) Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, Ispano M, Incorvaia C, Giuffrida MG, Ortolani C. J., *Allergy Clin. Immunol.* **101**, 531-537 (1998)
- 2) G. Köhler and C. Milstein. *Nature* **256**, 495-497 (1975)

学会発表

- 1) Akiyama H., The Regulatory Situation in Japan—Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food—, Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies (2010.5)
- 2) 中村厚, 酒井信夫, 川浦知子, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子, 魚肉すり身およびその加工食品に含まれる甲殻類の実態調査 *日本食品化学学会第 16 回総会・学術集会* (2010. 6)

(別紙)

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)

試験室間バリデーションによりその性能が評価され、通知に示す基準を満たすことが示されている定量検査法(あるいはこれと同等と認められた方法)(従来法)に改良を加えた定量検査法(新検査法)については、単一試験室での検討において以下のような性能を評価し、従来法と同等であることを示した場合には、従来法と同様にアレルギー物質を含む食品の検査方法として使用することが認められるものとする。

(1) 検量線

新検査法の検量線の濃度範囲および定量性が従来法と同等であることを示す。

(2) 従来法との相関

複数の試料について、従来法と新検査法を用いて定量し、新検査法が従来法と同等であることを示す。

具体的には、X軸に従来法による定量値、Y軸に新検査法による定量値をとり、その相関をプロットする。このプロットについて、Y切片をゼロとする近似直線($Y=aX$)を算出し、その傾きが0.75-1.25の範囲であること、相関係数が0.9以上であることを示す。

検査方法1種類につき、定量値が数 $\mu\text{g/g}$ から10,000 $\mu\text{g/g}$ 程度の範囲に偏ることなく分布する試料(但し対象濃度範囲における試料確保が困難な場合には10,000 $\mu\text{g/g}$ を超える試料を含んでもよい)について10種以上の検討を行い、従来法と新検査法との相関をプロットするものとする。また、特に数 $\mu\text{g/g}$ -数10 $\mu\text{g/g}$ の範囲については、改めて偏ることなく分布する10種以上の試料の定量値をプロットし(但し対象濃度範囲における試料確保が困難な場合には高濃度試料を希釈して測定した際の測定値を使用してよい)、上記基準を満たす相関が見られることを確認する。

試料としては、市販加工食品、食品材料に特定原材料タンパク質を添加して調製したモデル加工食品、特定原材料を含有する加工食品と特定原材料を含有しない同様の加工食品を混合し、特定原材料タンパク質濃度を調製したもの、あるいは特定原材料を含有しない加工食品に特定原材料タンパク質を添加したもの等を使用する。また、動物性の食品、植物性の食品、加工度の高いもの、酸性を示す食品等、種々の特性を持つ食品を試料として使用することが望ましい。

上記の近似直線の傾きが0.8以下あるいは1.2以上の場合は、上記検討に加えて、3種類以上の試料(ただし、試料に含まれる特定原材料タンパク質濃度レベルには10 $\mu\text{g/g}$ 程度を含むこと)を用いて回収率を検討し、50%以上150%以下の回収率となることを示すことが望ましい。試料としては、食品材料に特定原材料タンパク質を添加して調製したモデル加工食品、特定原材料を含有する加工食品と特定原材料を含有しない同様の加工食品を混合し、特定原材料タンパク質濃度を調製したもの、あるいは特定原材料を含有しない加工食品に特定原材料タンパク質を添加したもの等を使用する。

(3) 精度

1-20 $\mu\text{g/g}$ 程度の特定原材料タンパク質を含有する試料(試料数2-3程度)を使用し、併行精度(試行回数は5回以上)及び日差変動(3-5日間程度)について検討する。F検定を行い、従来法と新検査法との間でこれらの精度及び変動が同等であること、また同等でない場合には新検査法の方の精度が高いことを示す。また、その他、日内変動、分析者間変動、機器間変動等についても検討することが望ましい。

(4) 検出限界、定量限界

これらの値が従来法と同等またはより小さい値であることを示す。

(5) 特異性

偽陽性、偽陰性を示す食品について検討し、従来法との一致点・相違点を明確に示す。

表1. 各特定原材料の一次標準粉末から標準品原液を調製する際の抽出液(現行法)

卵、牛乳	0.5% SDS及び2% 2-MEを含有するPBS (pH 7.4)
小麦	0.5% SDS及び2% 2-MEを含有する0.1M Tris-HCl (pH 8.6)
そば、落花生	0.5% SDS, 2% 2-ME及び0.5M NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH 7.5)
甲殻類	0.5% SDS、2% 2-ME、1% Inhibitor Cocktail、5mM EDTAを含有するPBS (pH 7.4)

表2. 亜硫酸ナトリウム含有抽出液により調製した標準品原液のタンパク定量結果

(A: 国立衛研検討結果、B: 標準品メーカー検討結果)

A

	2-ME (mg/mL)	Na ₂ SO ₃ (mg/mL)	Na ₂ SO ₃ /2-ME (%)
卵(Lot.1)	5.46 ± 0.06	5.19 ± 0.08	95.1
卵(Lot.2)	5.48 ± 0.06	5.56 ± 0.16	101.5
牛乳	2.72 ± 0.05	2.63 ± 0.02	96.8
小麦	5.01 ± 0.13	5.00 ± 0.03	99.8
そば	3.72 ± 0.12	3.22 ± 0.03	86.6
落花生(Lot.1)	4.40 ± 0.15	3.97 ± 0.12	90.2
甲殻類	4.03 ± 0.04	4.04 ± 0.03	100.2

(n = 3) (n = 3)

B

	2-ME (mg/mL)	Na ₂ SO ₃ (mg/mL)	Na ₂ SO ₃ /2-ME (%)
卵(Lot.1)	4.88 ± 0.09	5.01 ± 0.04	102.6
卵(Lot.2)	4.93 ± 0.002	5.13 ± 0.08	104.1
牛乳	2.80 ± 0.10	2.68 ± 0.07	95.5
小麦	5.16 ± 0.03	5.03 ± 0.17	97.6
そば	3.63 ± 0.11	3.33 ± 0.08	91.7
落花生(Lot.1)	3.87 ± 0.08	3.66 ± 0.07	94.6
落花生(Lot.2)	4.23 ± 0.01	3.82 ± 0.04	90.2
落花生(Lot.3)	4.13 ± 0.02	4.02 ± 0.08	97.5
甲殻類	3.28 ± 0.23	3.41 ± 0.17	103.8

(n = 2) (n = 3)

表3. モデル加工食品を用いたキウイフルーツELISA法による回収率の検討結果

モデル加工食品	加熱条件	添加量(µg/g)	定量値(µg/g)	回収率(%)
チューハイ	100°C、10分	10.0	6.4	63.7
野菜ジュース	100°C、10分	10.0	10.7	106.6
ゼリー	100°C、10分	10.0	6.2	62.4
プレーンヨーグルト	100°C、10分	10.0	8.4	84.0
生クリーム	100°C、10分	10.0	8.5	85.1
イチゴジャム	100°C、10分	10.0	7.2	72.2
ブルーベリーソース	100°C、10分	10.0	8.5	84.7
ラズベリーヨーグルト	100°C、10分	10.0	8.5	84.8
ハム	75°C、30分	10.0	6.8	68.5

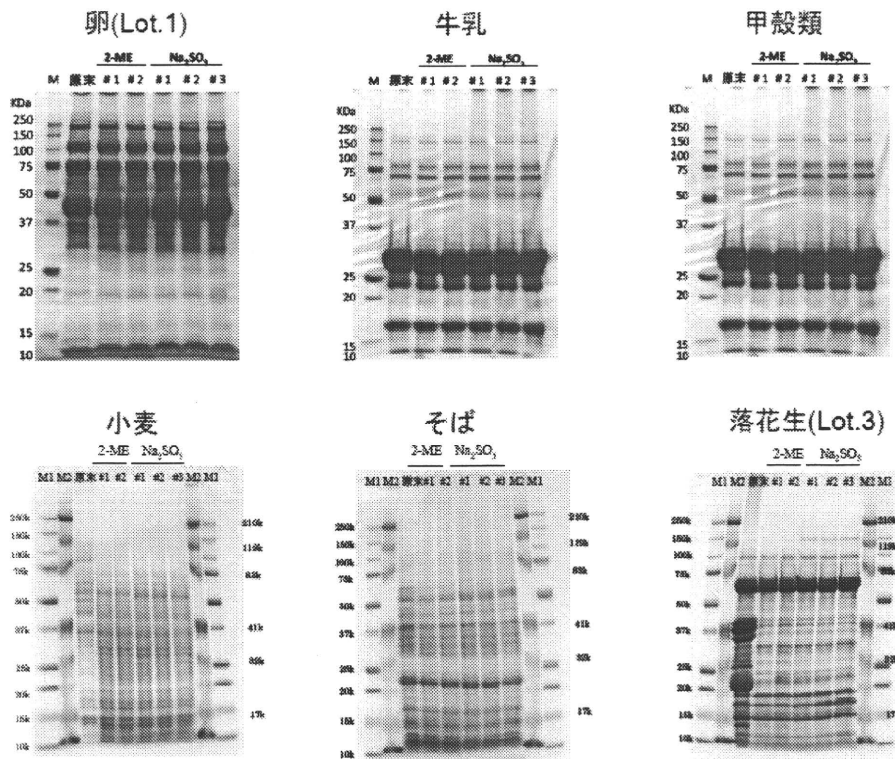


図1. 2-ME 含有抽出液及び亜硫酸ナトリウム含有抽出液により調製した標準品原液の電気泳動像

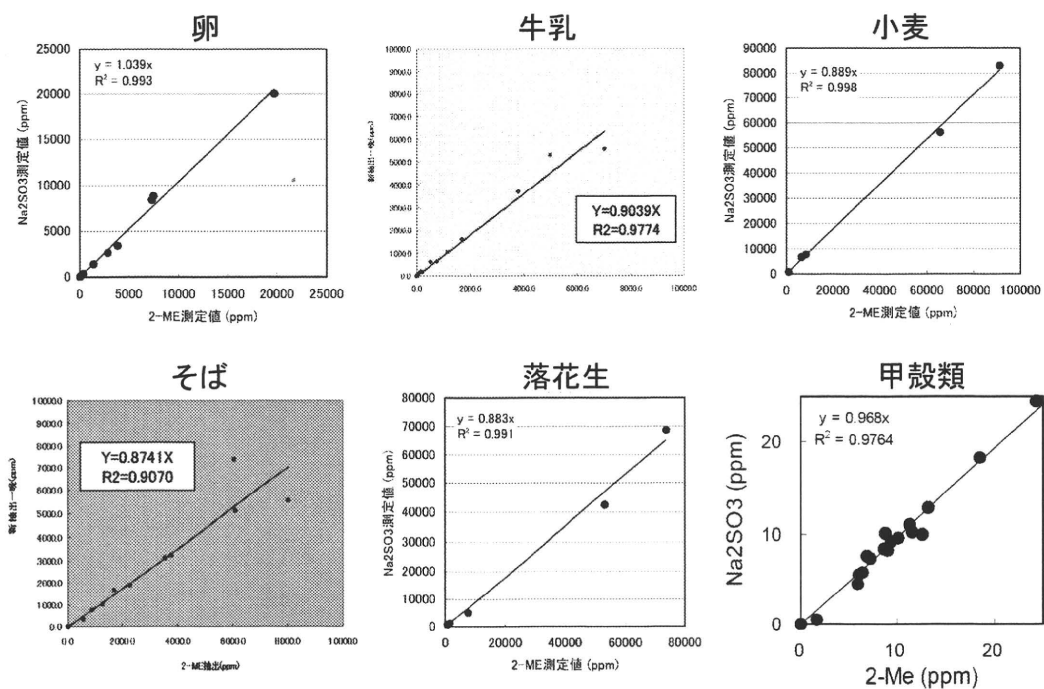


図2. 2-ME 含有抽出液と亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた定量結果の比較(例)

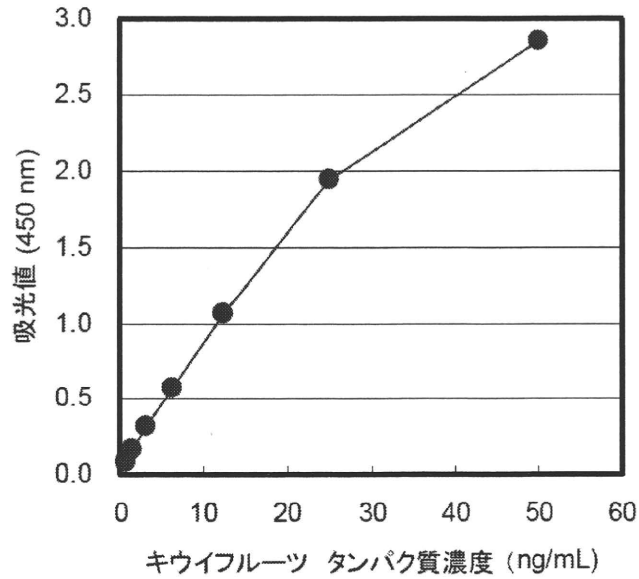


図3. キウイフルーツ ELISA 法の標準曲線(例)

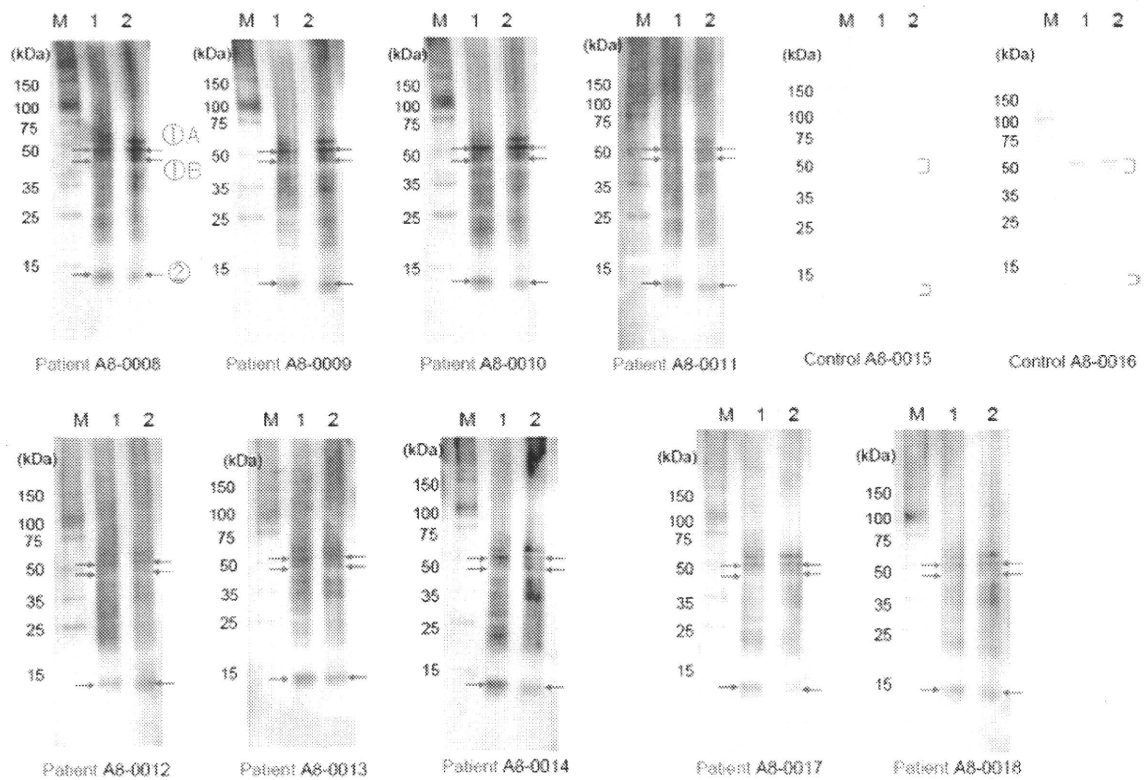


図4. ゴマタンパク質に対するゴマアレルギー患者血清の反応性解析

M: 分子量マーカー、レーン 1: ゴマ抽出タンパク質(洗いゴマ白)、レーン 2: ゴマ抽出タンパク質(洗いゴマ黒)
 Control: 健常人、A8-0008-0011: ゴマ負荷試験陽性(比較的強い症状)、A8-0012-0014: ゴマ負荷試験陽性(比較的弱い症状)、A8-0017-0018: ゴマ負荷試験陰性(感作陽性)

①: 11S グロブリン(A: isoform 2 (Ses i 7)、B: isoform 1 (Ses i 6))、②: 2S アルブミン)

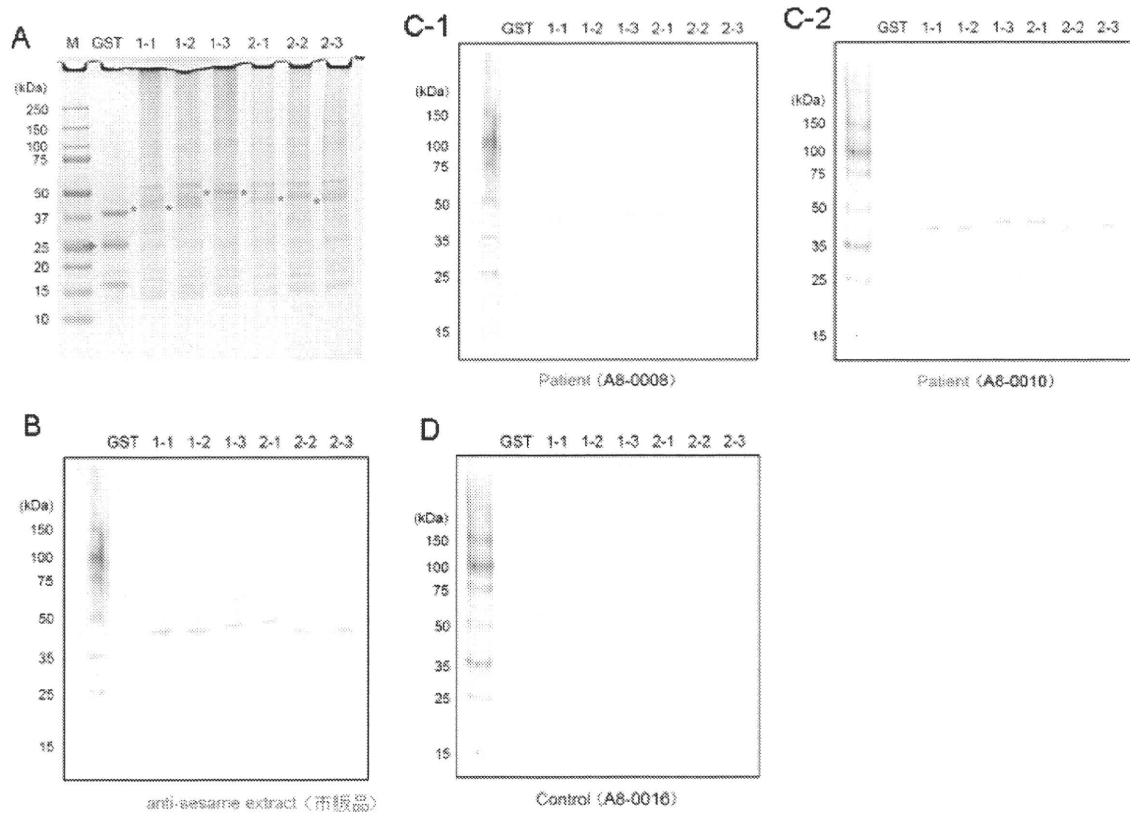


図5. ゴマ 11S グロブリンのフラグメントに対するゴマアレルギー患者血清の反応性解析

M:分子量マーカー、GST:GSTのみ発現させたもの、1-1, 2, 3:ゴマ 11S グロブリン isoform1 (Ses i 6)のフラグメント(1-1:149aa, 1-2:150aa, 1-3:194aa)、2-1, 2, 3:ゴマ 11S グロブリン isoform2 (Ses i 7)のフラグメント(2-1:205aa, 2-2:164aa, 2-3:153aa)

A:タンパク質電気泳動図、B:市販の抗ゴマタンパク質抗体、C-1,2:ゴマアレルギー患者血清、D:Control 血清
 →:GST、*:各フラグメント(GST 融合タンパク質)

食物アレルギーの原因抗原の分布調査

研究分担者 海老澤 元宏 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター アレルギー性疾患研究部
研究協力者 今井 孝成 国立病院機構相模原病院 小児科
杉崎 千鶴子 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター アレルギー性疾患研究部

研究要旨

目的：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うる。変化に即した対応の充実のため、過去の調査結果から原因抗原の変化を明らかにする。

方法：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症例とし、対象は“何らかの食物を摂取後60分以内に症状が出現し、かつ医療機関を受診したもの”である。

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。

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、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。

A. 研究目的

我が国では、食物に起因するアレルギー反応の健康被害を未然に防ぐ目的で、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、容器包装された食品および食品等に対して特定原材料5品目（現在は7品目）に義務表示、特定原材料に準ずるもの19品目（現在は18品目）に推奨表示が課せられた。

それから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うる。臨床の現実にあった臨床および行政の提供のために、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。

B. 研究方法

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（日本アレルギー学会指導医および専門医、日本小児アレルギー学会会員）1000余名の参加協力を得て、調

査方法や調査対象を変えずに行われてきた。調査対象は“何らかの食物を摂取後60分以内に症状が出現し、かつ医療機関を受診したもの”とし、調査項目は名前（イニシャル）、性別、年齢または月齢、原因抗原、臨床症状、転帰などとした。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。

C. 研究結果

1. 即時型食物アレルギーの原因食物の変遷（表1）

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、各年次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、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（13例：0.3%）、タコ（12例：0.3%）、ゴマ、タラ（11例：0.3%）、アジ、ホタテガイ（10例：0.3%）であった。また平成17年調査ではマグロ（14例：0.

6%)、メロン、ゴマ、タイ (9例: 0.4%)、カシューナッツ、アジ (7例: 0.3%)、ブリ (6例: 0.3%) であった。平成20年調査ではゴマ (11例: 0.4%)、アジ (10例: 0.4%)、カシューナッツ (9例: 0.4%)、ピワ (8例: 0.3%)、タラコ、メロン (7例: 0.3%) 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38.3%、39.5%、38.6%と変わらないが、乳製品は15.9%、18.2%、20.9%、小麦は8.0%、8.7%、12.0%と漸増している。またそれ以下でも、ピーナツが2.8%、4.1%、4.8%、イクラが2.2%、4.5%、4.0%と漸増している。

即時型食物アレルギーの原因食物の変遷

平成13・14年度			平成17年			平成20年		
No.	原因食物	例数 %	No.	原因食物	例数 %	No.	原因食物	例数 %
1	鶏卵	440 39.5	1	鶏卵	395 39.5	1	鶏卵	390 38.6
2	乳製品	418 37.9	2	乳製品	418 41.8	2	乳	352 34.6
3	小麦	311 28.4	3	小麦	199 19.9	3	小麦	201 19.6
4	ソバ	178 16.3	4	イクラ	103 10.3	4	ピーナツ	120 11.8
5	エビ	161 14.7	5	ピーナツ	95 9.5	5	イクラ	100 9.8
6	ピーナツ	119 11.0	6	エビ	73 7.3	6	エビ	75 7.3
7	イクラ	81 7.5	7	カツ	74 7.4	7	ピーナツ	59 5.8
8	アジ	76 7.0	8	キウイ	41 4.1	8	大豆	37 3.6
9	キウイ	75 6.9	9	大豆	39 3.9	9	キウイ	33 3.2
10	バナナ	46 4.2	10	カニ	31 3.1	10	カニ	28 2.8
11	カニ	40 3.7	11	バナナ	28 2.8	11	カニ	20 1.9
12	豚肉	32 2.9	12	カボチャ	25 2.5	12	バナナ	17 1.7
13	カボチャ	32 2.9	13	サバ	14 1.4	13	サバ	15 1.5
14	イカ	30 2.8	14	リンゴ	13 1.3	14	キマイモ	14 1.4
15	サバ	24 2.2	15	キマイモ	13 1.3	15	モモ	12 1.2
16	豚肉	23 2.1	16	モモ	10 1.0	16	リンゴ	11 1.1
17	サウ	22 2.0	17	アボカド	9 0.9	17	アボカド	10 1.0
18	ピーナツ	16 1.5	18	アボカド	8 0.8	18	イロ	10 1.0
19	キマイモ	15 1.4	19	アボカド	7 0.7	19	アボカド	6 0.6
20	モモ	14 1.3	20	イカ	6 0.6	20	アボカド	5 0.5
21	アボカド	12 1.1	21	サケ	6 0.6	21	アボカド	4 0.4
22	アボカド	11 1.0	22	ピーナツ	7 0.7	22	アボカド	1 0.1
23	アボカド	11 1.0	23	アボカド	7 0.7	23	アボカド	1 0.1
24	アボカド	11 1.0	24	アボカド	7 0.7	24	アボカド	1 0.1
25	アボカド	11 1.0	25	アボカド	7 0.7	25	アボカド	1 0.1
26	アボカド	11 1.0	26	アボカド	7 0.7	26	アボカド	1 0.1
27	リンゴ	10 0.9						
28	アボカド	10 0.9						
29	アボカド	10 0.9						
30	アボカド	10 0.9						
合計		3492 90.0	合計		2152 93.6	合計		2375 95.0

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。上位5抗原で各年次調査の80.6%、74.9%、81.3%を占めた。

アナフィラキシーショック誘発食物の変遷

平成13・14年度			平成17年			平成20年		
No.	原因食物	例数 %	No.	原因食物	例数 %	No.	原因食物	例数 %
1	鶏卵	440 39.5	1	鶏卵	395 39.5	1	鶏卵	390 38.6
2	乳製品	418 37.9	2	乳製品	418 41.8	2	乳	352 34.6
3	小麦	311 28.4	3	小麦	199 19.9	3	小麦	201 19.6
4	ソバ	178 16.3	4	ピーナツ	14 1.4	4	ピーナツ	12 1.2
5	ピーナツ	119 11.0	5	エビ	9 0.9	5	エビ	9 0.9
6	エビ	14 1.3	6	エビ	9 0.9	6	イクラ	9 0.9
7	イクラ	8 0.7	7	バナナ	5 0.5	7	アボカド	4 0.4
8	モモ	8 0.7	8	イクラ	4 0.4	8	キウイ	4 0.4
9	大豆	7 0.6	9	大豆	3 0.3	9	大豆	4 0.4
10	キウイ	7 0.6	10	アボカド	3 0.3	10	モモ	3 0.3
11	バナナ	4 0.4	11	カニ	3 0.3	11	バナナ	2 0.2
12	キマイモ	4 0.4	12	アボカド	2 0.2	12	アボカド	2 0.2
13	カニ	3 0.3	13	キマイモ	2 0.2	13	カニ	2 0.2
14	イカ	3 0.3	14	アボカド	2 0.2	14	アボカド	2 0.2
15	サウ	3 0.3	15	カニ	2 0.2	15	アボカド	2 0.2
16	アボカド	3 0.3	16	リンゴ	2 0.2	16	アボカド	1 0.1
17	カボチャ	2 0.2	17	アボカド	2 0.2	17	アボカド	1 0.1
18	豚肉	2 0.2	18	アボカド	2 0.2	18	アボカド	1 0.1
19	アボカド	2 0.2	19	アボカド	2 0.2	19	アボカド	1 0.1
20	サバ	1 0.1	20	豚肉	1 0.1	20	アボカド	1 0.1
21	ピーナツ	1 0.1	21	豚肉	1 0.1	21	アボカド	1 0.1
22	アボカド	1 0.1	22	アボカド	1 0.1	22	アボカド	1 0.1
23	アボカド	1 0.1	23	アボカド	1 0.1	23	アボカド	1 0.1
24	アボカド	1 0.1	24	アボカド	1 0.1	24	アボカド	1 0.1
25	アボカド	1 0.1	25	アボカド	1 0.1	25	アボカド	1 0.1
26	アボカド	1 0.1	26	アボカド	1 0.1	26	アボカド	1 0.1
27	アボカド	1 0.1	27	アボカド	1 0.1	27	アボカド	1 0.1
28	アボカド	1 0.1	28	アボカド	1 0.1	28	アボカド	1 0.1
29	アボカド	1 0.1	29	アボカド	1 0.1	29	アボカド	1 0.1
30	アボカド	1 0.1	30	アボカド	1 0.1	30	アボカド	1 0.1
合計		336	合計		231	合計		283

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 (3例: 0.8%)、タコ (2例: 0.5%)、平成17年調査ではカシューナッツ (3例: 1.3%)、メロン、マグロ、カキ (貝) (2例: 0.9%)、平成20年調査ではアーモンド、カシューナッツ、タラコ (2例: 0.7%) であった。

D. 考察

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抗原で上位を占め、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つい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推奨される。

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。

E. 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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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
- 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
2. 学会発表
- 1) Sakura Sato, Hiroshi Tachimoto, Takatsugu Komata, Takanori Imai, Morimitsu Tomikawa, Akinori Shukuya, Akemi Saito, Hiroshi Yasueda, Motohiro Ebisawa , : Prospective analysis of development of asthma from infantile atopic dermatitis associated with food allergy, 2010 EAACI. 2010. 6. 5. London, UK
 - 2) N. Yanagida, T. Utsunomiya, S. Sato, M. Iguchi, T. Komata, T. Imai, M. Tomikawa, M. Ebisawa : Treatment of Hen's Egg- and Cow's Milk-induced Anaphylaxis by Rash Oral Immunotherapy, 2010 AAAAI Annual Meeting. 2010. 2. 26-3. 2. New Orleans, LA
 - 3) T. Holzhauser, B. Ballmer-Weber, M. Ebisawa, G. Ladics, S. Vieths : Investigation of the Endogenous Allergenic Potential of Biotechnology Derived Soybean (Glycine Max) Varieties , 2010 AAAAI Annual Meeting. 2010. 2. 26-3. 2. New Orleans, LA
 - 4) S. Sjolander, F. Bernhardsson, P. Brostedt, M. Borres, A. Tanaka, K. Ito, M. Ebisawa, S. Utsumi, M. Poorafshar : High IgE Reactivity to Subunit G5 from the Soybean Legumin Allergen Gly m 6 in Sera from Soy Allergic Japanese Children, 2010 AAAAI Annual Meeting. 2010. 2. 26-3. 2. New Orleans, LA
 - 5) K. Ito, M. Ebisawa, S. Sato, S. Sjolander, M. Borres : Specific IgE to Gly m 5 and Gly m 6 in Children with Soybean Allergy in Japan , 2010 AAAAI Annual Meeting . 2010. 2. 26-3. 2. New Orleans, LA
 - 6) Ebisawa M, Yanagida N, Sato S, Imai T : Rush oral immunotherapy for the treatment of hen's egg- and cow's milk-induced anaphylaxis , 28th Symposium Collegium Internationale Allergologicum. 2010. 4. 29. Ischia, Italy
 - 7) Ebisawa M : Food Allergy in Japan , 2010. 10. 17. Chongqing, China
 - 8) Ebisawa M : Patterns of allergy in Japan, Symposium on Frontiers in Food Allergen Risk Assessment . 2010. 10. 20-22 . Nice, France
 - 9) Motohiro Ebisawa : FOOD CHALLENGES -GETTING IT RIGHT, APCAACI 2010 . 2010. 11. 7 . Singapore
 - 10) Motohiro Ebisawa : Food allergy; Diagnosis and treatment, WAO International Scientific Conference 2010. 2010. 12. 5. Dubai, UAE
 - 11) Motohiro Ebisawa : Diagnosis of Food Allergy; Probability curves, CRD, and Food provocation tests, 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010. 11. 25. 東京
 - 12) 海老澤元宏, 今井孝成 : 食物アレルギー ; 園・学校での対応, 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010. 11. 27. 東京
 - 13) 武石大輔, 小俣貴嗣, 宇都宮朋宏, 佐藤さくら, 今井孝成, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : ゴマ負荷試験 102 例のまとめ, 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010. 11. 27. 東京
 - 14) 海老澤元宏, 今井孝成 : 社会的対応の充実, 第47回日本小児アレルギー学会. 2010. 12. 4.

横浜

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

研究分担者 堀口逸子 順天堂大学医学部公衆衛生学教室助教

研究要旨

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、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。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. はじめに

食物アレルギーについての社会における理解の状況把握は十分ではない。一方、事例として、同じものを食べていないことによる学校現場での「いじめ」、テーマパークにおいて、発症を回避するために食べ物を持参していることを特別視していると一般客からの「苦情」、また集団生活のなかで「同じものを食べさせたい」といった食物アレルギー患者の保護者の価値観を全うすることによる現場での混乱などがみられる。

食物アレルギー患者にとっての食物選択時に、誤って、また不本意ながらアレルゲンを摂取することによる健康被害の発生は「危機」いわゆる「リスク」ととらえることができる¹⁾。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の危機回避の一助としてこれまで食品表示による研究をすすめてきた。この食品表示はいわゆるリスク回避のためのリスクコミュニケーションのツールとして位置づけられる¹⁾。

一方、リスクコミュニケーションのツールとして、ゲーミングシミュレーションを利用した教材(媒体)が開発され²⁾、著者は、健康危機管理分野においてとそのプログラムの開発と評価を行ってきた³⁻⁵⁾。

ゲーミング・シミュレーションは、学習者が能動的であり、提供された論題の全体像を経験し、それは構成要素が一つ一つ別々ではなく同時に与えられ、プレイ後の議論や分析において無遠慮な発言や断定的な主張ではなく役割によって構造化されることなどがある。教育目的としては、動機づけと興味づけ、情報の提供または強化、意思決定やコミュニケーションなどの技能開発、態度変容、そして知識、態度やリーダーシップ能力などの評価が挙げられている⁶⁾。また、現実の問題状況についてゲームという仮想的状況のなかで役割が与えられ、異なった世界観をもつ主体間でのコミュニケーションを可能とし、多様な意思決定のあり方、解釈のあり方について学習するための手段となりえるとされている⁷⁾。

今回の研究では、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目的としたリスクコミュニケーションの教材開発を試みた。

B. 研究方法

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