

201131004A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の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 23 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 24(2012)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早見表の作成に関する研究

宇理須 厚雄 ----- 13

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 ----- 18

3. チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状および魚類 ELISA 検知法の開発に関する研究

塩見 一雄 ----- 22

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 ----- 33

5. 健康被害防止に関する研究

海老澤 元宏 ----- 52

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の開発と評価

堀口 逸子 ----- 56

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 59

## IV. 研究成果の刊行物・別冊

----- 61

厚生労働科学研究費補助金  
食品の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  
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、加熱エビ(ブラックタイガー)で微量経口負荷試験を行った。エビ陽性患者 54 名を対象に求めた 90%、95%閾値はそれぞれ 88.4mg、35.4mg 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：

インターネットを通じて食物アレルギーに関する約 400 例の健康被害事例を収集した。これらを自宅・友人宅・園や学校・外出時とグループ分けをして解析し、誤食の対策をまとめた冊子を作成した。H23 年におこった東日本大震災での食物アレルギーの患者および家族が体験した貴重な健康被害事例を収集し解析を行い、今後の震災時対策として掲載した。

3) 加工食品のアレルゲン含有量早見表の作成：

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「加工食品のアレルゲン含有量早見表」を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) オレンジアレルゲンに関する研究：

オレンジは食品表示推奨品目の一つであるが、本邦におけるアレルゲンに関する報告はない。オレンジに対して口腔アレルギーを呈する 4 症例を集めて抗原解析を行った。オレンジ抗原の 13kDa, 23kDa, 37kDa の蛋白バンドに対して患者の多くが反応した。これらのうち 13kDa および 37kDa はスギ抗原添加で結合の抑制がみられたことから両者の共通抗原性の可能性が示唆された。

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：

ゴマは、時にアナフィラキシーを誘発する重要な食物アレルゲンである。その診断における特異的 IgE 抗体検査を評価し、さらにアレルゲンコンポーネントを用いてより診断精度の高い臨床検査の開発を試みた。当科でゴマ経口負荷試験を実施した 76 名（陽性 32 名、陰性 44 名）を元にゴマ特異的 IgE 抗体検査の有用性を評価したところ、ゴマアレルギーを検査だけで診断できる抗体価のカットオフ値は設定できなかった。また、IgE 抗体価は、負荷陽性者における症状誘発閾値量との相関を認めなかった。精製したゴマアレルゲンコンポーネントを用いたイムノキャップでは、主要な貯蔵タンパクである 7S ビシリン、11S グロブリン特異的 IgE 抗体はゴマ粗抗原と強く相関したのに対し、2S アルブミン、Hsp70、LTP ではゴマアレルギー患者で高い抗体価を示す傾向が得られた。今後は、これらのコンポーネントのリコンビナントタンパクなどを用いた臨床検査の有用性を検討していく予定である。

6) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状および魚類ELISA検知法の開発に関する研究：

タイ類には 12 kDa のパルブアルブミン (PA II) の他に 14 kDa のアレルゲン (PA I) が存在することが示唆されていた。チダイから PA I および PA II をゲルろ過および逆相 HPLC により精製し、リシルエンドペプチダーゼ分解ペプチドのアミノ酸配列を分析したところ、両成分はパルブアルブミンのアイソフォームであることが判明した。PA I の IgG (パルブアルブミンに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体) との反応性および魚類アレルギー患者の血清 IgE との反応性は、PA II を含む他の魚類パルブアルブミンと比較するとかなり弱かった。PA I および PA II のアミノ酸配列を cDNA クローニング法により解析したところ、他の魚類パルブアルブミンと比べると PA I はいくつかの位置で特有のアミノ酸残基を持ち、IgG 反応性および IgE 反応性の弱さとの関連が示唆された。 魚類 ELISA 検知法の開発：マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を作製し、魚類を検知するサンドイッチ ELISA 系を構築した。本サンドイッチ ELISA は、マサバパルブアルブミンとの反応性を 100% とした場合、各種魚類パルブアルブミンと 22.6-99.0% の反応性を示し、さらに 22 魚種からの抽出液のすべてと反応した。検出限界は 0.23  $\mu\text{g}$  (魚類タンパク質) /g (食品)、定量限界は 0.70  $\mu\text{g/g}$  で、あった。5 種類のモデル加工食品を用いた試験室間バリデーションに供したところ、添加した魚類タンパク質の回収率は 69.4-84.8%、併行精度は 1.2-3.3%、室間精度は 3.1-10.5% と良好であった。また、各種市販加工食品を分析した場合、偽陰性あるいは偽陽性はほとんど認められなかった。

7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法：

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]ゴマアレルゲンの解析を行った。その結果、[1]亜硫酸ナトリウム系抽出液により調製した卵、牛乳、小麦、そば、落花生、甲殻類の標準品原液及び高濃度標準品について $-80^{\circ}\text{C}$ 保存時の安定性を検討した結果、現行の 2ME 系抽出液により調製した標準品と同様に少なくとも6ヶ月間は安定であることが示された。[2](1)キウイフルーツ検出法の開発として、キウイフルーツ標準品の製造方法を検討及び保存試験を行った。また、二次抗体にビオチン標識抗体あるいは HRP 標識抗体を用いたサンドイッチ ELISA 系を構築し、どちらの系でもモデル食品からのキウイフルーツタンパク質の検出は可能であることを示した。各種食品への交差反応性を調べた結果、HRP 標識抗体を使用した場合にビオチン標識抗体に比べ交差反応性が多い傾向にあったことから、HRP の標識方法などの見直しが必要と考えられた。本キウイフルーツ検出用 ELISA 系の標的タンパク質であるアクチニジンを高濃度を含むキウイフルーツやサルナシで反応性が高かったが、アクチニジン濃度が低い一部のゴールドキウイやマタタビに対する反応性は低いことが示された。(2)リンゴ検出法の開発として、標準品の調製方法を検討した。また2組の抗 LTP マウスモノクローナル抗体の組み合わせを選択し、ELISA を構築した。リンゴタンパク質含有モデル食品を作成し、添加回収試験を行ったところ、回収率は現行のガイドラインの基準である 50~150 % の範囲に入ることが確認された。この ELISA 系ではリンゴジュースや皮を含まない市販食品ではリンゴを検出できない場合があり、LTP 以外の新たな指標タンパク質を選定する必要性が示された。[3]蛍光偏光度測定によるリンゴアレルゲンの簡易検出は可能と考えられた。[4]ゴマアレルゲンである 11S グロブリンの全長をカバーする SPOTs 膜を用いてゴマアレルギー患者血清との反応性を検討したところ、全長にわたって 8 カ所の反応部位が検出された。そのうちの3カ所はゴマ以外の他の6種の11Sグロブリンでもエピトープであることが報告されている Allergenic Hot Spot であった。

## 8) 健康被害防止に関する研究

食品衛生監視員のアレルギー表示に関する実態は不明な点が多いため、同職を対象に調査を行い、その現状を示すことを目的とし、神奈川県に所属する食品衛生監視員 295 名を対象に食品衛生法アレルギー表示に関する調査を行った。205 名より回答があり、回収率は 69.5%であった。アレルギー表示違反発見・処理経験があるものは 36.8%であった。夫々の設問に対して”よく理解している”および”非常によく理解している”の割合をみると、アレルギー表示の目的が 45.9%、表示項目が 36.1%、義務・推奨が 42.4%、表示の方法・注意点が 29.5%、食物アレルギーが 35.1%であった。食品業者のアレルギー表示の理解度は、”理解しているとは言えない”が 40.2%であった。食物アレルギーの理解度も”理解しているとは言えない”が 46.7%であった。今後求められる対応として、食品製造・販売業者への研修等強化が最も多く 46.2%、食品製造・販売業者のコンプライアンス向上への取組強化が 33.7%であった。

アレルギー表示違反は持続的に発生しており、その原因の一つに未だ食品業者側の理解度の問題が大きいことが推察された。さらに、食品業者ばかりでなく、食監が法制や食物アレルギーに対する意識・知識が十分でない点が指摘された。今後こうした現状と問題点が行政側にも広く知られることで、食品業者側の抱える問題の解決以前に、管理する側の充実を進める取り組みが行われることが期待される。

## 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：

食物アレルギーの理解促進のために、昨年度試作したカードゲームを完成させ、小学校での利用可能性を検討した。利用にあたり、ルールブック、説明用ボードを完成させた。また、学校スタッフにおいて利用できるよう指導要綱を完成させた。小学生 233 人に対して実施した、使用前後 2 回にわたる質問紙調査によって、評価を行った。ルールは難しくなく、楽しく学ぶことができていた。専門家は、数と時間に限りがあることから、専門家からの更なる知識を得る前段として、教材の利用可能性が考えられた。

## A. 研究目的

### 1) 食物アレルギーの誘発量の決定

これまでエビ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ない。そこで本年度はエビアレルギー患者の 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。

### 2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

インターネットをとおして食物アレルギーに関連した健康被害事例を収集解析し、家庭・園・学校など場面ごとに分類し、各場面における食物アレルギー対策に役立つ事例集を作成した。

### 3) 加工食品のアレルゲン含有量早見表 (早見表) 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る。これまである程度まで耐性を獲得した患者が、安全に加工食

品を選ぶ際に役立つシステムがなかった。

含有タンパク質量によってレベル別に分類した加工食品早見表を作成すれば、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た。

### 4) オレンジアレルゲンに関する研究

オレンジは食品表示推奨品目の一つであるが、本邦におけるアレルゲンに関する報告はない。今回はオレンジのアレルゲン解析を試みた。

### 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

ゴマは、希にアナフィラキシーに至る即時型ア

レルギーの原因食品である。しかし、ゴマアレルギーの診断におけるゴマ特異的 IgE 抗体検査の評価は十分に行われていない。本研究では、ゴマ特異的 IgE 抗体価と経口負荷試験の結果を評価するとともに、ゴマのアレルゲンコンポーネントを精製して、特異的 IgE 抗体検査の有用性を検討した。

#### 6) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状および魚類 ELISA 検知法の開発に関する研究：

魚類のアレルゲンとしては主要アレルゲンであるパルブアルブミンの他、コラーゲンなども同定されている。さらに、これまでのイムブロッティング実験などにおいて、未知アレルゲンの存在も示唆されている。マダイの抽出液には 12 kDa のパルブアルブミンの他に、一部患者の血清 IgE と反応するがパルブアルブミンモノクローナル抗体とは反応しない 14 kDa のアレルゲンを見いだした (Kobayashi et al. Allergy 2006; 61: 357-363)。その後、マダイと近縁のチダイにも、同様に 12 kDa のパルブアルブミンの他に 14 kDa のアレルゲンが検出された。そこで本研究では、魚類アレルギー、とくにタイ類アレルギーの診断・治療に資することを目的に、チダイに含まれる 14kDa アレルゲンを同定し、その IgE 反応性および一次構造を明らかにすることを試みた。一方、魚類は重要なアレルギー原因食品で、わが国をはじめとした多くの国でアレルギー表示対象となっているが、その検知法は開発されていない。そこで、本研究では、加工食品に含まれる魚類を定量的に検知するサンドイッチ ELISA 法の開発もあわせて行った。

#### 7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法：

a) 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 (2ME) を含む抽出液が使用されている。H23 年度においては亜硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) を含有する抽出液を用いて調製した ELISA キット用標準品の安定性に関する検討を行った。

b) 果実類検知 ELISA 法の開発：特定原材料に準ずるキウイフルーツ、リンゴ、及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。

c) 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：現在、食品事業者が食品工場等で自主管理を目的として上記の検査を行うことは、コスト面、設備面の問題から容易ではない。そのため、導入することが比較的容易で、安価、迅速、簡易な検出法の構築が重要であると考え、システムの構築を目的とした検討を行った。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国際的ハーモナイゼーションの会議に参加し検討を行った。

d) 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、即時型食物アレルギー全国モニタリング調査において最近患者数が徐々に増加している要注意品目である。ゴマのアレルゲンタンパク質として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った。

#### 8) 健康被害防止に関する研究

食品衛生法を管理する側の食品衛生監視員のアレルギー表示に関する実態が調査されたことはない。そこで食品衛生監視員を対象にアレルギー表示に関する調査を行い、その現状を示すことで今後の対策の進展の一助とする。

#### 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：

食物アレルギーへの理解促進を目的としたゲーム教材を開発し、それを利用したプログラムを開発し評価する。

## B. 研究方法

### 1) エビの誘発量の決定に関する研究

負荷試験の方法は加熱したエビ (ブラックタイガー) を用いて負荷試験を行った。エビタンパク質量は FASTKIT エライザ Ver. II で測定した。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

インターネットを通して収集した健康被害事例の発生場所を自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 つのグループに分け、解析を加えたひやりはつと事例集を作成した。また、平成 23 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災の際には食物アレルギーに関する様々な問題が生じた。これらの健康被害事例に関しても収集を試みた。

### 3) アレルギー物質含有量に基づいた食品早見表の作成

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、食品群ごとにわけ食品中の(卵・乳)含有タンパク量別に従い表を作成した。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、昨年度までに検討した安全係数 1/100 をかけたタンパク質含有食品から試すことを表中に付記した。

### 4) オレンジアレルゲンに関する研究

オレンジはミカン目ミカン科ミカン属オレンジ種に属する。オレンジに対して口腔アレルギーを呈する 4 症例を集めて抗原解析を行った。抗原抽出は 2M Sucrose buffer で行い、SDS-PAGE に引き続き Immunoblot を行い主要な抗原の検索を行った。その後スギ抗原を用いて Immunoblot inhibition も試み共通抗原性の有無を検討した。

### 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

ゴマ特異的 IgE 抗体検査の有用性をすりゴマ経口負荷試験の結果と比較して検討した。ゴマの主要な貯蔵タンパクである 7S ビシリン(Ses i 3)、11S グロブリン(Ses i 6, Ses i 7)、2S アルブミン(Ses i 1, Ses i 2)、及び Hsp70、LTP を精製して、それぞれの特異的 IgE 抗体検査の臨床診断における有用性を検討した。

### 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： チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

a) 加熱抽出液の調製：チダイの背側普通肉を 3 倍量の PBS (0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0) とホモジナイズし加熱後に冷却した。遠心分離後に得られた上清を加熱抽出液とし Sephadex G-75 カラムに添加し、PBS で溶出した。ELISA：ウサギ抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体およびマウス抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) とパルブアルブミンとの反応性は可視光 ELISA で調べた

cDNA クローニング：生きているチダイから背側普通肉を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies) を用いて total RNA を抽出し

cDNA ライブラリーを作製した。

### b) 魚類 ELISA 検知法の開発

標準溶液の調製：マアジの筋肉をホモジナイザーで均一化し、凍結乾燥を行った。乾燥終了後、再びホモジナイザーで均一化して得た粉末を魚標準品とした。魚標準品のタンパク質量を 2-D Quant kit (GE Healthcare) で定量したところ、470 mg/g であった。標準品を適宜希釈し、検量線作成のための標準溶液 (0.78-50 ng/mL) を調製した。

サンドイッチ ELISA による測定：組換えマサバパルブアルブミンをウサギに免疫してポリクローナル抗体を取得した。

サンドイッチ ELISA のバリデーション：魚標準品を 10 µg/g の濃度で添加した 5 種類のモデル加工食品 (クリームコロッケ、鶏肉団子、豚肉シユウマイ、野菜チキンスープ、白がゆ) について、3 試験機関でサンドイッチ ELISA により測定した。

### 7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法：

a) 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良：

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。これらの標準品原液を、通知検査法別添4の標準品規格に則り、PBS(pH7.4)で10倍希釈したものを一次希釈液とし、これをさらに0.2% BSA含有PBSで2倍希釈したものを高濃度標準液とした。標準品原液及び高濃度標準液を-80℃にて長期保存し、電気泳動像及びELISAキットにおける吸光度を測定することにより安定性試験を行い、亜硫酸系標準液と2ME系標準液の安定性について比較した。

## b) 果実類検知ELISA法の開発:

(1)キウイフルーツ検出法の開発にはキウイフルーツ(ヘイワード種)の皮果肉を凍結乾燥・粉碎して一次標準粉末とした。

抗アクチニジンモノクローナル抗体を調製し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。また、ELISA の二次抗体にビオチン抗体あるいは HPR 標識抗体を使用し、標識の違いを検証した。

(2)リンゴ検出法の開発にはリンゴ(サンふじ)の芯を除き皮付きのまま凍結乾燥・粉碎して一次標準粉末とした。

抗 Lipid Transfer Protein (LTP)部分ペプチドウサギポリクローナル抗体、抗 LTP-ラットモノクローナル抗体、抗 LTP-マウスモノクローナル抗体を調製し、これらを組み合わせてサンドイッチ ELISA 系の検討を行った。

## c) 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

BIST は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。特定原材料 7 品目について新たに抗体を作製し、7 品目同時測定について検討した。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し相対定量化についても検討した。

2010 年 5 月 9 日から 12 日にカナダのトロントで行われた 6th Workshop on Food Allergen Methodologies に参加し、講演と議論を行った。

## d) ゴマアレルギーの解析

種子ゴマ、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た。ミキサーで粉碎し、0.6M ショ糖含有 10 mM リン酸バッファー (pH 7.5) 中でホモジナイズし、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。

白ゴマ未熟種子をから 11S グロブリンアイソフォーム 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 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粗精製し、患者血清を用いたウェスタンブロッティングを行った。

アイソフォーム 2 について、SPOTs 膜 (Sigma-Aldrich 社)を作成し患者血清との反応性をドットプロット法と同様にして検討することにより、患

者血清中の抗体が認識するエピトープの解析を行った。

## 8) 健康被害防止に関する研究

神奈川県に所属する食品衛生監視員 295 名を対象に食品衛生法アレルギー表示に関する調査を行った。調査項目は、食品衛生法アレルギー物質を含む食品表示(以下アレルギー表示)の理解度、指導・教育の力量、食品業者の理解度、今後求められる対応などを調査項目とした。

## 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:

### 1) 教材の開発

昨年度の試作品から改善したカードゲーム形式ゲームを完成させた。カード内容においては、管理栄養士のアドバイスを参考にした。

### 2) プログラムの開発

開発されたカードゲームは、利用場を小学校に想定し、45 分授業におけるプログラム、いわゆる指導要綱を作成した。また、ルールの説明を使用するボード及びルールブックを作成した。

### 3) ゲームの評価

研究協力を、保健所を通じて呼びかけ、それに応じた小学校において実際の授業において使用した。ゲームの評価は、使用前と後の 2 回にわたる質問紙調査によった。

## C.研究結果、考察、結論

### 1) エビの誘発量の決定に関する研究

加熱エビエビアレルギー患者の 90%をカバーする値は、106.2mg であった。エビ負荷試験陽性患者(54名)での 90%および 95%陽性値はそれぞれ、88.4 mg と 35.4mg であった。

エビでの最小誘発量の検討で陽性者の 95%を含む域値は 10µg を超える量で症状が惹起されることが判明したことから、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。

### 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

インターネットで約 400 例の事例が回収され、その中の 384 例が解析可能であった。その結果は、食品を摂取した後で誘発される例が多かったが、中には接触によって誘発された症例もあった。



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。これらの事例解析と震災時対策を加え「食物アレルギーヒヤリハット事例集 2012」が完成した。

### 3) アレルギー物質含有量に基づいた食品早見表の作成

測定したタンパク量に従い分類した卵・牛乳・小麦・大豆食品早見表を作成しパンフレットとしてまとめた。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。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、この信頼性が高い早見表の作成は、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。

### 4) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討

オレンジ: 4名の患者を用いた Immunoblot の結果、3名以上の患者が反応した蛋白バンドの分子量は 13kDa、23kDa、37kDa であった。これらのうち 13kDa および 37kDa の一部の患者ではスギ抗原添加で結合の抑制がみられ、共通抗原性が示唆された。

### 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:

ゴマ負荷試験陽性 32 例、陰性 44 例におけるゴマ特異的 IgE 抗体価にはオーバーラップが大きく、抗体価のみでゴマアレルギーの診断ができるカットオフ値は求められなかった。

精製したゴマコンポーネントを用いた 43 例（そのうち 14 例がゴマアレルギー）の検討では、ゴマの貯蔵タンパクとして含有量の多い 7S ビシリン、11S グロブリンは、ゴマ(f10)と強い相関を示して特異度が改善されなかった。一方 2S アルブミン、Hsp70、LTP 特異的 IgE 抗体価は、ゴマアレルギー患者ではほぼ 100%の陽性率を示すと同時に、症状陰性者と比較して高い抗体価を示す傾向が認められ、今後の臨床応用に向けた更なる検討が期待された。

ゴマは、まだ抗体検査による診断精度が不十分であり、多くの場合経口負荷試験に依存した臨床診断が不可欠といえる。今後の検討が期待される。

2S グロブリンは、ピーナッツの Ara h 2 に該当するコンポーネントであり、豆類・種子類におけるアレルゲンの鍵を握るタンパクである。今後、これらのリコンビナントタンパクを含めた検討を進め、より詳細なアレルゲン解析を行うと共に、より有効な臨床検査を開発していくことが望まれる。

### 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:

#### a) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

チダイを試料として、12 kDa のパルブアルブミン (PA II) とあわせて 14 kDa アレルゲン (PA I) を精製し、精製品のアミノ酸配列分析により PA I はパルブアルブミンアイソフォームであることを証明した。チダイには 2 成分のパルブアルブミンアイソフォーム (PA I および II) が含まれるが、PA I は IgE 反応性が他の魚類パルブアルブミンより非常に弱く、パルブアルブミンの立体構造 IgE エピトープ解析におけるモデルタンパク質となる。

#### b) 魚類 ELISA 検知法の開発

8 種魚類（ウナギ、マイワシ、マアジ、チダイ、マサバ、カツオ、メバチ、ヒラメ）およびウシガエルから精製したパルブアルブミン（アイソフォームがある場合は主要成分のみ）に対するサンドイッチ ELISA の反応性を評価するために、各種パルブアルブミンを 0.078-250 ng/mL に調製して各 2 重測定した。その結果、魚類パルブアルブミンはいずれも十分に反応した。一方、ウシガエルパルブアルブミンとの反応性はわずか 1.2% で、無視できるレベルであった。

次に、サンドイッチ ELISA の各種食品原材料での検討で、魚 22 種類は期待通りすべて陽性反応を示したが、定量値 (4.0-46100 μg/g) は魚種によって著しく異なった。魚の他には、頭足類 8 種類中の 5 種類（ミズダコ、ヤナギダコ、ヤリイカ、アオリイカ、モンゴウイカ）および魚卵 2 種類（タラコ、イクラ）で 1.2-3.8 μg/g の非常に弱い陽性反応が認められたが、残りの 82 種類はすべて陰性であった。

日水製薬で実施した試験室内バリデーションでサンドイッチ ELISA の精度は高いと判断された。サンドイッチ ELISA を市販の各種加工食品に供した結果、魚を含むというラベルがある食品

21 種類のうち、18 種類については濃度はかなり異なるものの魚類タンパク質が検出された。偽陰性の結果を与えた食品は発酵食品 2 種類(ナンプラー、マグロ酒盗)とコラーゲンパウダーであった。一方、魚を含まない加工食品 16 種類のうち、頭足類を含む 2 種類(イカ煎餅、タコ焼き)と魚卵(タラコ)を含む 1 種類(タラコパスタソース)の計 3 種類で、きわめて弱い(1.2-3.8  $\mu\text{g/g}$ )偽陽性反応がみられた。

当初、マサバパルブアルブミンに対するモノクローナル抗体を用いるサバ ELISA 検知法の開発を目指したが、サバパルブアルブミンのみを特異的に認識するモノクローナル抗体は得られなかった。さらに、魚類パルブアルブミン全般に反応するモノクローナル抗体も得られず、マサバパルブアルブミンに対するモノクローナル抗体を利用する魚類 ELISA 検知法の開発も困難であると判断した。そこで、マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を用いる魚類 ELISA 検知法の開発を目指すこととした。

開発したサンドイッチ ELISA は、市販の加工食品におおむね適用可能であったが、一部で偽陰性または偽陽性がみられた。

マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を利用したサンドイッチ ELISA 系は、感度および特異性に優れ、加工食品中の魚類タンパク質の定量法として非常に有用である。

#### 7) 食物アレルギー原因物質の解析及び検査法:

##### a) 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良

2ME系抽出液と亜硫酸系抽出液の場合で大きな差は見られなかった。標準品原液及び高濃度標準液を $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存しその安定性を検討した。標準品原液および高濃度標準液について安定であることが示された。

##### b) 果実類検知 ELISA 法の開発

###### (1) キウイフルーツ検出法の開発

アクチニジンに対する 26 種のモノクローナル抗体より抗体を選択し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。2 次抗体としてビオチンおよび HRP 標識抗体を用いたモデル加工食品の測定したところ良好な結果が得られた。

グリーンキウイ(*A. deliciosa*)であるゼスプリグリーン(ヘイワード)、ブルーノ、香緑、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)であるアップルキウイ、サルナシ(*A.*

*arguta*)に高い反応性を示したが、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)であるゼスプリゴールド(ホート 16a)、サンゴールド、紅鮮とマタタビ(*A. polygama*)に対する反応性は低かった。*A. chinensis*の一部でアクチニジン濃度が低いと報告されており、そのために本 ELISA 系における反応性が低かったと考えられる。

各種食品に対する交差反応性の検討において、HRP 標識抗体の方がビオチン標識抗体に比べ交差する品目が多かったことから、HRP の標識方法などの見直しが必要と考えられた。

##### 2) リンゴ検出法の開発

抗 LTP 抗体の組み合わせについて検討し、2 次抗体、1 次抗体をそれぞれマウス MAb 7D と 12E、7D と 12H とする 2 種類の組み合わせで ELISA を構築した。リンゴタンパク質(10  $\mu\text{g/mL}$ )含有モデル食品について測定したところ、2 通りの抗体の組み合わせで、測定値はそれぞれ 6.4-12.7  $\mu\text{g/mL}$ 、6.5-13.2  $\mu\text{g/mL}$ となり、良好な結果が得られた。しかし、リンゴを原材料に含む市販食品を検査した結果、皮が付いていない製品ではリンゴを検出することができなかった。これは LTP が皮に比較的多く含有されるタンパク質であるためと考えられる。上記の結果より、LTP を指標とした ELISA 系では、市販食品にリンゴが混入していても検出できない場合がある可能性が示唆された。

##### c) 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

抗体濃度については FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体の 10,000 倍希釈(1nM)が良好であった。

FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体と KLH 結合リンゴ LTP ペプチドの相互作用を用いて、蛍光偏光度で解析することは可能と考えられた。今後、測定結果の CV 値の低下が課題と思われる。

##### d) ゴマアレルギーの解析

ゴマタンパク質を抽出して電気泳動を行ったところ、50 kDa 付近に 11S グロブリンのバンド 2 本、15 kDa 付近に 2S アルブミンのバンド 2 本が確認された。患者血清を用いたウェスタンブロッティングにおいて、ゴマ負荷試験陽性患者血清中の IgE 抗体は、11S グロブリン、2S アルブミンに強く結合した。

次に、ゴマ 11S グロブリンのアイソフォーム 2 について、その全長をカバーする 59 本のペプチドをスポットした SPOTs 膜を用い、この膜上のペプチドとゴマアレルギー患者血清との反応性を検討した。患者血清と反応する部分は 11S グロブリンの分子全体に

わたって分布していることが示された。

11S グロブリンについては、これまでに、6種(カシューナッツ、クルミ、ヘーゼルナッツ、大豆2種、ピーナッツ)の11S グロブリンのエピトープの比較により、エピトープとなりやすい Allergenic Hot Spot と呼ばれる配列が報告されている。Hot Spot No.1-3 については、SPOTs 膜解析において患者血清との反応性を示した部位と一致しているが、Hot Spot No.4 については一致しなかった。3カ所の Hot Spot が本研究におけるゴマ 11S グロブリンに関する SPOTs 膜解析の結果と一致したことは非常に合理的な結果であり、今後エピトープ解析を進めていく上で大変有用な知見である。

#### 8) 健康被害防止に関する研究

各項目における”よく理解している”および”非常によく理解している”割合は、アレルギー表示の目的が 45.9%、表示項目が 36.1%、義務・推奨が 42.4%、表示の方法・注意点が 29.5%、食物アレルギーが 35.1%であった。食品業者のアレルギー表示の理解度は、”理解しているとは言えない”が 40.2%であった。食物アレルギーの理解度も”理解しているとは言えない”が 46.7%であった。今後求められる対応として、食品製造・販売業者への研修等強化が最も多く 46.2%、食品製造・販売業者のコンプライアンス向上への取組強化が 33.7%であった。

アレルギー表示の違反は未だに定期的に発生しており、食品業者側の理解度の問題が大きいことが推察された。さらに、食監の意識・知識が十分でない点が指摘された。今後食品業者側の問題ばかりでなく、管理する側の充実を進める取り組みが行われることが期待される。

#### 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：

教材は、5日間のランチメニューを自身のアレルギーに注意を払いバラエティに富んだ和食、洋食、中華、エスニック、軽食の5種類を揃えることをゴールとした。

2 県小学校 3 年生から 6 年生までの 233 人が参加した。

質問は、使用前 3 問、使用后 5 問の計 8 問である。食物アレルギーという言葉聞いたことがない子どもが 24.9%であった。また、食物アレルギーがある子どもは 4.7%、わからないと回答した子どもは 37.3%であった。家族や友だちに食物アレルギーの人がいるかどうかでは、いるの

は 45.9%、わからないが 42.1%であった。

ゲーム後、ルールについて、わかりやすかった 67.0%、まあまあわかりやすかった 28.3%であった。楽しかった 89.3%、まあまあ楽しかった 9.9%であった。メニューの選択に関して、むずかしかった 17.2%、少しむずかしかった 54.1%であった。友だちに食物アレルギーかどうかたずねられるかでは、できると思う 34.8%、たぶんできると思う 47.2%であった。もし、自身が食物アレルギーの場合に、すすめられたメニューを断ることができるかどうか、ではできると思う 58.8%、たぶんできると思う 30.9%であった。

今回のゲーミングシミュレーションを利用した教材においては、食物アレルギーの理解促進とまた、表示制度においてもふれることができること、また、繰り返し利用可能であり、例えば、休み時間に子どもだけで学ぶことも可能である。このことから、食物アレルギーの理解促進のためのひとつのツールとして利用可能性は高いと考えられた。

また、食品加工・流通企業など表示制度に関わる人材への食物アレルギーとその表示制度に関する教育においても利用可能性があると考えられた。

#### D.健康危険情報

特になし

#### E.研究発表

##### 宇理須

- 1) Watanabe S, Taguchi H, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Urisu A, Teshima R. Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. J Agric Food Chem 7, 2108-2115, 2012.
- 2) 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, 59, 3510-3519, 2011.
- 3) Sicherer SH, Urisu A, Natural History and Prevention, Food Allergy, Ed: John M James, Wesley Burks and Philippe

Eigenmann, Pub ;ELSEVIER, 251-264, 2011.

- 4) Caubet JC, Kondo Y, Urisu A, Nowak-Węgrzyn A, Molecular diagnosis of egg allergy, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 11, 210-215, 2011.
- 5) Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama T, Morikawa A, Kondo N, Japanese guideline for food allergy. *Allergol Int*, 60, 221-236, 2011.
- 6) Kondo Y, Tanaka K, Inuo C, Tsuge I, Urisu A, A patient with salmon roe allergy showing taxonomy-unrelated cross-reactivity with sea urchin roe. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 107, 283-284, 2011.
- 7) Wakasa Y, Hirano K, Urisu A, Matsuda T, Takaiwa F, Generation of transgenic rice lines with reduced contents of multiple potential allergens using a null mutant in combination with an RNA silencing method, *Plant Cell Physiol*, 52, 2190-2199, 2011.

#### 伊藤

- 20) Ebisawa M, Shibata R, Sato S, Borres MP, Ito K. Clinical Utility of IgE Antibodies to  $\omega$ -5 Gliadin in the Diagnosis of Wheat Allergy: A Pediatric Multicenter Challenge Study. *Int Arch Allergy Immunol* 158, 71-76, 2012.
- 21) Ito K, Futamura M, Moverare R, Tanaka A, Kawabe T, Sakamoto T, Borres MP. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clinical and Molecular Allergy* 10, 1, 2012.
- 22) Ito K, Sjölander S, Sato S, Moverare R, Tanaka A, Söderström L, Borres M, Poorafshar M, Ebisawa M. IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese children. *J Allergy Clin Immunol*. 128, 673-5, 2011.

#### 塩見

- 23) S. Ishizaki, Y. Sakai, T. Yano, S. Nakano, T. Yamada, Y. Nagashima, K. Shiomi, Y. Nakao and H. Akiyama: Specific detection

of potentially allergenic salmonid fish residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (accepted)

- 24) F.-F. Guo, H. Kubota and K. Shiomi: Purification, immunological properties and molecular cloning of two allergenic parvalbumins from the crimson sea bream *Evynnis japonica*. *Food Chem.*, 132, 835-840, 2012.
- 25) 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.
- 26) M. Kanamori, H. Tanaka, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: New extraction method suitable for immunoblotting analysis of fish allergens. *Eur. Food Res. Technol.*, 233, 991-997, 2011.
- 27) Y. Kobayashi, K. Ohsaki, K. Ikeda, S. Kakemoto, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi: Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol. Int.*, 60, 144-150, 2011.

#### 安達

- 28) Watanabe S, Taguchi H, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Urisu A, Teshima R, Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, in press.
- 29) 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.* 59, 3510-3519, 2011.
- 30) Sakai Y, Kotoura S, Yano T, Kurihara T, Uchida K, Miyake K, Akiyama H, and Tanabe S, Quantification of Pork, Chicken and Beef using a Novel Reference Molecule. *Bioscience, Biotechnology, and*

*Biochemistry* 75, 1639-1643, 2011.

- 31) Akiyama H, Imai T, Ebisawa M, Japan Food Allergen Labeling Regulation – History and Evaluation, *Advances in Food & Nutrition Research*, 62,139-171, 2011.
- 32) Suzuki A, Nguyen HPD, Nakamura K, Akiyama H\*, Kasahara Y, Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 18, 18-24, 2011.

#### 海老澤

- 33) Ebisawa M, Shibata R, Sato S, Borres MP, Ito K: Clinical Utility of IgE Antibodies to  $\omega$ -5 Gliadin in the Diagnosis of Wheat Allergy: A Pediatric Multicenter Challenge Study, *Int Arch Allergy Immunol*. 2011 in press.
- 34) Ebisawa M: Chapter 9 Food-induced Anaphylaxis and Food Associated Exercise-induced Anaphylaxis: Food Allergy: Expert Consult Basic (editorial supervisor: Drs. John M. James, Wesley Burks, and Philippe Eigenmann), 113-127. Elsevier 2011.
- 35) Borres MP, Ebisawa M, Eigenmann PA.: Use of allergen components begins a new era in pediatric allergology, *Pediatr Allergy Immunol*. 22(5):454-61. 2011.
- 36) Sato S, Tachimoto H, Shukuya A, Ogata M, Komata T, Imai T, Tomikawa M, Ebisawa M.: Utility of the peripheral blood basophil histamine release test in the diagnosis of hen's egg, cow's milk, and wheat allergy in children, *Int Arch Allergy Immunol*. 155 Suppl 1:96-103, 2011.
- 37) Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama T, Morikawa A, Kondo N; Japanese Society of Allergology.: Japanese guideline for food allergy, *Allergol Int*. Mar;60(2):221-36, 2011.
- 38) Ito K, Sjölander S, Sato S, Movérare R, Tanaka A, Söderström L, Borres M, Poorafshar M, Ebisawa M.: IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese children, *J Allergy Clin Immunol*. Sep;128(3):673-5, 2011.
- 39) Sackesen C, Assa'ad A, Baena-Cagnani C, Ebisawa M, Fiocchi A, Heine RG, Von Berg A, Kalayci O.: Cow's milk allergy as a global challenge, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Jun;11(3):243-8, 2011.
- 40) Akiyama H, Imai T, Ebisawa M.: Japan food allergen labeling regulation-history and evaluation, *Adv Food Nutr Res*. 62:139-71, 2011.

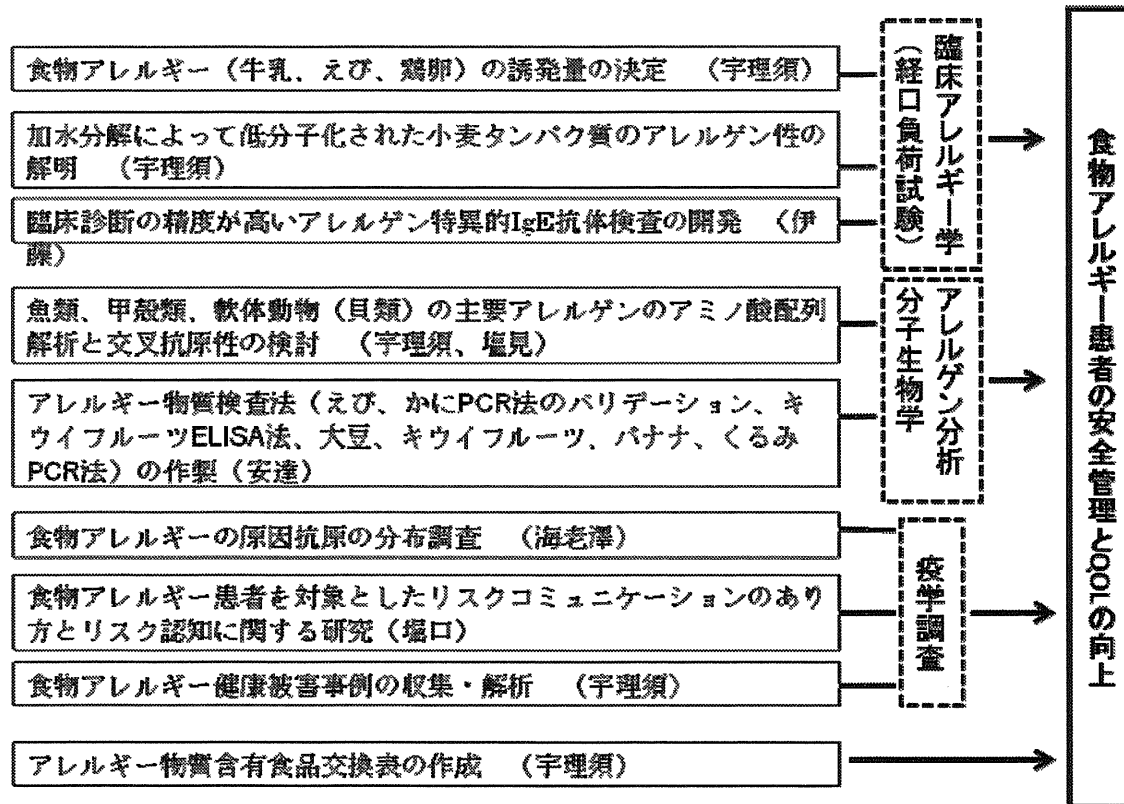
#### 堀口

- 41) 堀川翔, 赤松利恵, 伊能由美子, 堀口逸子, 丸井英二 小学校の教職員を対象とした食の安全教育の現状と課題の質的検討 *栄養学雑誌* 69 巻 2 号 P67-74, 2011.
- 42) 堀川翔, 赤松利恵, 堀口逸子, 杉浦淳吉, 丸井英二: 小学校における食の安全教育を担う教職員の特徵—学校栄養士, 家庭科教諭, 養護教諭を対象とした調査— *栄養学雑誌*, 69(5) 253-260, 2011.

#### F.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



厚生労働科学研究費補助金（食品の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

## 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早見表の作成に関する研究

研究分担者	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	(藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 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、加熱エビ(ブラックタイガー)で微量経口負荷試験を行った。エビ陽性患者 54 名を対象に求めた 90%、95% 閾値はそれぞれ 88.4mg、35.4mg 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：

インターネットを通じて食物アレルギーに関する約 400 例の健康被害事例を収集した。これらを自宅・友人宅・園や学校・外出時とグループ分けをして解析し、誤食の対策をまとめた冊子を作成した。H23 年におこった東日本大震災での食物アレルギーの患者および家族が体験した貴重な健康被害事例を収集し解析を行い、今後の震災時対策として掲載した。

3) 加工食品のアレルゲン含有量早見表の作成：

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「加工食品のアレルゲン含有量早見表」を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) オレンジアレルゲンに関する研究：

オレンジは食品表示推奨品目の一つであるが、本邦におけるアレルゲンに関する報告はない。オレンジに対して口腔アレルギーを呈する 4 症例を集めて抗原解析を行った。オレンジ抗原の 13kDa, 23kDa, 37kDa の蛋白バンドに対して患者の多くが反応した。これらのうち 13kDa および 37kDa はスギ抗原添加で結合の抑制がみられたことから両者の共通抗原性の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

1) 食物アレルギーの誘発量の決定

これまでエビアレルギーにおいて症状が誘発されうる微量の摂取量に関する検討はなされていない。そこで本年度はエビアレルギー患者の 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。

2) 食物アレルギー健康被害事例の収集・解析

インターネットをとおして食物アレルギーに関連した健康被害事例を収集解析し、家庭・園・学校など場面ごとに分類し、各場面における食物アレルギー対策に役立つ事例集を作成した

3) 加工食品のアレルゲン含有量早見表(早見表)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る。これまで

ある程度まで耐性を獲得した患者が、安全に加工食品を選ぶ際に役立つシステムがなかった。

含有タンパク質量によってレベル別に分類した加工食品早見表を作成すれば、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 1/100 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た。

#### 4) オレンジアレルゲンに関する研究

オレンジは食品表示推奨品目の一つであるが、本邦におけるアレルゲンに関する報告はない。今回はオレンジのアレルゲン解析を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) エビの誘発量の決定に関する研究

負荷試験の方法は加熱したエビ(ブラックタイガー)を用いて負荷試験を行った。エビタンパク質量は FASTKIT エライザ Ver. II で測定した。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

インターネットを通して収集した健康被害事例の発生場所を自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの5つのグループに分け、解析を加えたひやりはっと事例集を作成した。また、平成23年3月11日に発生した東日本大震災の際には食物アレルギーに関する様々な問題が生じた。これらの健康被害事例に関しても収集を試みた。

#### 3) アレルギー物質含有量に基づいた食品早見表の作成

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、食品群ごとにわけ食品中の(卵・乳)含有タンパク量別に従い表を作成した。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、昨年度までに検討した安全係数 1/100 をかけたタンパク質含有食品から試すことを表中に付記した。

#### 4) オレンジアレルゲンに関する研究

オレンジはミカン目ミカン科ミカン属オレンジ種に属する。オレンジに対して口腔アレルギーを呈する4症例を集めて抗原解析を行った。抗原抽出は 2M Sucrose buffer で行い、SDS-PAGE に引き続き Immunoblot を行い主要な抗原の検索を行った。その後スギ抗原を用いて Immunoblot inhibition も試み共通抗原性の有無を検討した。

### C. 研究結果

#### 1) エビの誘発量の決定に関する研究

FASTKIT エライザ Ver. II で測定したエビタンパク質量は 177mg/g であった。加熱エビエビアレルギー患者の90%をカバーする値は、106.2mg であった。エビ負荷試験陽性患者(54名)での90%および95%陽性値はそれぞれ、88.4mgと35.4mg であった(図1)。

#### 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

インターネットで約400例の事例が回収され、その中の384例が解析可能であった。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。これらを場面ごとに分類した「ひやりはっと事例集2012」が完成した(図2)。災害時における食物アレルギー対策もひやりはっと事例集に加えることができた。

#### 3) 加工食品のアレルゲン含有量早見表の作成

測定したタンパク量に従い分類した卵・牛乳・小麦・大豆食品早見表をパンフレットとしてまとめた(図3)。

#### 4) オレンジアレルゲン解析

4名の患者を用いた Immunoblot の結果、3名以上の患者が反応した蛋白バンドの分子量は 13kDa, 23kDa, 37kDa であった(図4)。これらのうち13kDaおよび37kDaの一部の患者ではスギ抗原添加で結合の抑制がみられた(図5)。

### D. 考察

#### 1) エビの誘発量の決定に関する研究

エビ陽性患者54名を対象に求めた90%、95%閾値はそれぞれ88.4mg、35.4mg であった。10 $\mu$ g を超える量で症状が惹起されることが判明した。このことから、大多数のエビアレルギー患者は、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。しかし、症例数が少ないことから今後も引き続き検討を行っていく必要があると思われた。

#### 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

インターネットから回収、解析出来た 384 例と、その後回収されたアンケートが 130 例あり、これら場面ごとに解説し対策をまとめた事例集が完成した。震災時の貴重な体験談も掲載することができた。これらは来るべき災害の対策に役立つものと思われる。

#### 3) 加工食品のアレルゲン含有量早見表の作成

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早見表を作成し、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が過去に安全に食べられた食品が表中に見つかれば、それと同じレベルのタンパク含有食品の摂取が可能と分かり、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、この信頼性が高い早見表の作成は、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。

#### 4) オレンジアレルゲンの解析

オレンジの 13kDa は分子量からプロフィリンであると考えられた。スギ抗原の添加により一部の患者でオレンジ 13kDa と 37kDa への結合が抑制されたことからこれら蛋白とスギ花粉抗原との共通抗原性が示唆された。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。

### E. 結論

1) エビアレルギー患者 54 名を対象に求めた 90%、95% 閾値はそれぞれ 88.4mg、35.4mg であった。10 $\mu$ g を超える量で症状が惹起されることが判明した。

2) インターネットなどを介して食物アレルギーの健康被害事例が収集され、場面ごとに解析し対策を記載した「ひやりはつと事例集 2012」が完成した。そこには震災時対策も記載できた。

3) 卵・牛乳・小麦・大豆に関して加工食品中のアレ

ルゲン含有量がわかる早見表を作成し、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される。

4) オレンジの摂取で口腔アレルギー症候群をきたす患者の血清の IgE は、13kDa, 23kDa, 37kDa の蛋白バンドに反応した。13kDa と 37kDa はスギ花粉との共通抗原性が示唆された。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1, 論文発表

- 1) Watanabe S, Taguchi H, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Urisu A, Teshima R. Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* 7, 2108-2115, 2012.
- 2) 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*, 59, 3510-3519, 2011.
- 3) Sicherer SH, Urisu A, Natural History and Prevention, Food Allergy, Ed: John M James, Wesley Burks and Philippe Eigenmann, Pub ;ELSEVIER, 251-264, 2011.
- 4) Caubet JC, Kondo Y, Urisu A, Nowak-Węgrzyn A, Molecular diagnosis of egg allergy, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 11, 210-215, 2011.
- 5) Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama T, Morikawa A, Kondo N, Japanese guideline for food allergy. *Allergol Int*, 60, 221-236, 2011.
- 6) Kondo Y, Tanaka K, Inuo C, Tsuge I, Urisu A, A patient with salmon roe allergy showing taxonomy-unrelated cross-reactivity with sea urchin roe. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 107, 283-284, 2011.

- 7) Wakasa Y, Hirano K, Urisu A, Matsuda T, Takaiwa F, Generation of transgenic rice lines with reduced contents of multiple potential allergens using a null mutant in combination with an RNA silencing method, *Plant Cell Physiol*, 52, 2190-2199, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## 2. 学会発表

- 1) 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、小麦アレルギー児に対する加水分解小麦経口負荷試験の検討, 第 22 回, 日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 平成 22 年 5 月 8 日 9 日.
- 2) 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、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検討, 第 22 回, 日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 平成 22 年年 5 月 8 日 9 日.
- 3) 田中健一、犬尾千聡、湯川牧子、高松伸枝、近藤康人、柘植郁哉、小倉和郎、平田典子、成瀬徳彦、小松原亮、鈴木聖子、安藤仁志、宇理須厚雄、野村孝泰、土井悟、安田俊隆、ウニアレルギー 3 例におけるアレルギー解析, 第 60 回, 日本アレルギー学会秋季学術大会、学術大会, 東京, 平成 22 年 11 月 25 日-27 日.
- 4) 田中健一、犬尾千聡、湯川牧子、高松伸枝、近藤康人、柘植郁哉、小倉和郎、平田典子、成瀬徳彦、小松原亮、鈴木聖子、安藤仁志、宇理須厚雄、野村孝泰、土井悟、安田俊隆、ウニ抗原とイクラ抗原との交差抗原性についての検討, 第 47 回, 日本小児アレルギー学会, 横浜, 平成 22 年 12 月 4 日 5 日.
- 5) 鈴木聖子、小倉和郎、成瀬徳彦、小松原亮、平田典子、安藤仁志、宇理須厚雄、田中健一、犬尾千聡、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, 第 47 回, 日本小児アレルギー学会, 横浜, 平成 22 年 12 月 4 日 5 日.

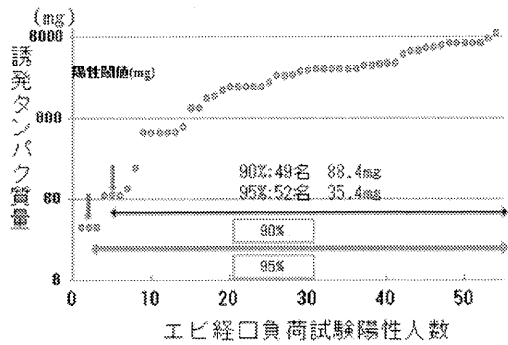


図1 エビ殻口負荷試験陽性患者 54 名の陽性閾値



図2 食物アレルギーヒヤリハット事例集

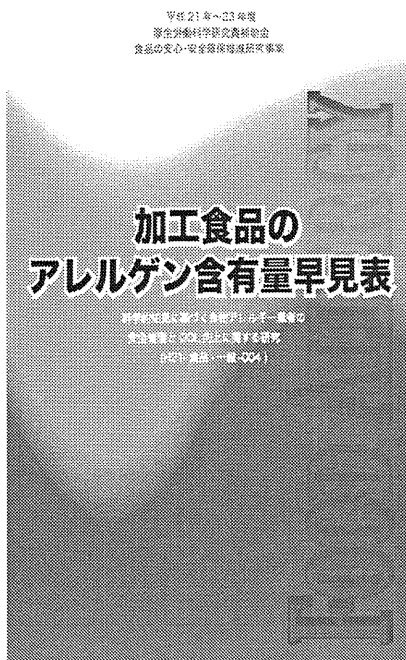


図3 加工食品のアレルゲン含有量早見表

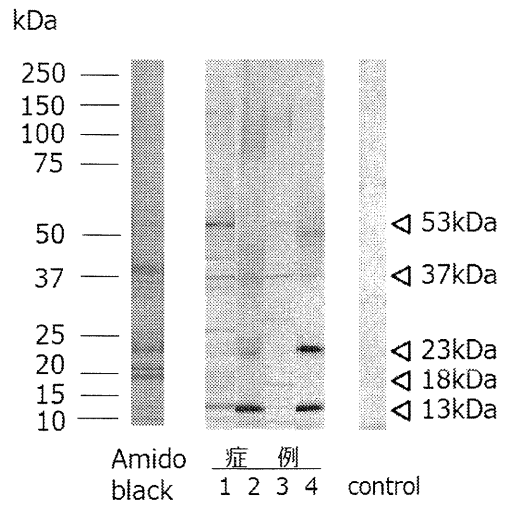


図4 オレンジ果肉 SDS-PAGE と immunoblot

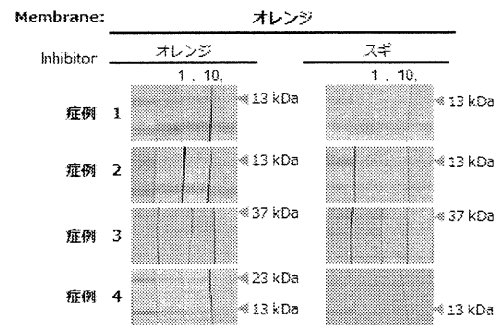


図5 スギ抗原添加によるオレンジ IgE 結合の抑制

## 食物アレルギー分析の臨床診断への応用に関する研究

研究分担者 伊藤浩明（あいち小児保健医療総合センター アレルギー科）  
 研究協力者 漢人直之（あいち小児保健医療総合センター アレルギー科）

### 研究要旨

ゴマは、時にアナフィラキシーを誘発する重要な食物アレルギーである。本研究では、その診断における特異的 IgE 抗体検査を評価し、さらにアレルギーコンポーネントを用いてより診断精度の高い臨床検査の開発を試みた。当科でゴマ経口負荷試験を実施した 76 名（陽性 32 名、陰性 44 名）を元にゴマ特異的 IgE 抗体検査の有用性を評価したところ、ゴマアレルギーを検査だけで診断できる抗体価のカットオフ値は設定できなかった。また、IgE 抗体価は、負荷陽性者における症状誘発閾値量との相関を認めなかった。精製したゴマアレルギーコンポーネントを用いたイムノキャップでは、主要な貯蔵タンパクである 7S ビシリン、11S グロブリン特異的 IgE 抗体はゴマ粗抗原と強く相関したのに対し、2S アルブミン、Hsp70、LTP ではゴマアレルギー患者で高い抗体価を示す傾向が得られた。今後は、これらのコンポーネントのリコンビナントタンパクなどを用いた臨床検査の有用性を検討していく予定である。

### A. 研究目的

ゴマは、希にアナフィラキシーに至る即時型アレルギーの原因食品である。しかし、ゴマアレルギーの診断におけるゴマ特異的 IgE 抗体検査の評価は十分に行われていない。本研究では、ゴマ特異的 IgE 抗体価と経口負荷試験の結果を評価するとともに、ゴマのアレルギーコンポーネントを精製して、特異的 IgE 抗体検査の有用性を検討した。

### B. 研究方法

1) ゴマの経口負荷試験は、すりゴマを用いた 0.1-0.2-0.5-1-2-(5)g の 20 分ごと漸増法で、全例入院下で実施した。検討対象者は 2006 年 1 月～2011 年 8 月に実施した 76 例（陽性 32 例、陰性 44 例）で、内訳を表 1 に示す。

2) ゴマコンポーネントは、表 2 に示すものを各種クロマトグラフィーで精製し、イムノキャップ担体に結合して特異的 IgE 抗体を測定した。対象患者は、負荷試験又は明らかな誘発症状の既往で確定診断されているゴマアレルギー血清 14 検体と、ゴマ特異的 IgE 抗体陽性でもアレルギー症状なく摂取可能な患者血清 29 例である。

表 1 ゴマ経口負荷試験実施者の背景

	陽性	陰性	合計
人数	32	44	76
男:女	25:7	27:17	52:24
年齢中央値 (幅)	4.6 2.2-9.2	4.6 1.5-14.4	4.6 1.5-14.4
ゴマIgE UA/ml	29.8 0.34 - 100	11.7 0.34 - 100	28.0 0.34 - 100
総IgE IU/ml	729 29-16444	479 40 - 4544	1735 29 - 16444
総負荷量 g	1.8 0.1 - 8.8	3.8 1.8 - 8.8	3.8 0.1 - 8.8

表 2 ゴマコンポーネントの精製

コンポーネント	アレルギー名	精製法
2S albumin	Ses i 1, Ses i 2	陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過
7S vicilin	Ses i 3	硫酸沈殿、ゲルろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー
11S globulin	Ses i 6, Ses i 7	硫酸沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー
Hsp70		アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー
LTP		モモLTP特異的IgE抗体に結合するゴマ分画を、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過