20113100 4B

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

(平成 21-22 年度)

食品の安全確保推進研究事業

(平成 23 年度)

# 科学的知見に基づく食物アレルギー患者の安全管理とQOL向上に関する研究

平成 21-23 年度　総合研究報告書

( **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 ------------ 21

2. 食物アレルゲン分析の臨床診断への応用に関する研究

伊藤　浩明 ------------ 33

3. 魚貝類アレルゲンの分子生物学的性状および魚類 ELISA 検知法の開発に関する研究

塩見　一雄 ------------ 38

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 ------------ 65

5. 健康被害防止に関する研究

海老澤　元宏 ------------ 82

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 ------------ 89

III. **研究成果の刊行に関する一覧表**

------------ 93

IV. **研究成果の刊行物・別冊**

------------ 99

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）
平成21-22年度
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）
平成23年度

# 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、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29.2μg、2.7μg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1265.5μg、22.9μg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、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。H23年度は加熱エビ(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：
これまでの食物アレルギー健康被害事例の解析から、発生場所を自宅、園学校、友人宅、外食とキャンプの 5 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。これらをグループ別に解析し、誤食対策をまとめた冊子を作成した。さらに H23年におこった東日本大震災での食物アレルギー患者および家族が体験した貴重な健康被害事例を収集する事が出来た。これを解析し今後の震災時対策として掲載した。

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「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) 食品のアレルゲン性に関する検討：
サケの範囲：「サケ」の範囲は、日本標準商品分類に基づいて決定されているため、陸封性の「マス」は対象外になっている。サケ科サケ属に属するさく河性であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討をした。魚アレルギー患者50名を用いたIgE結合能の相関関係は、ベニザケ-ヒメマス間が一番高かった。さらにサケアレルギー患者 6 名でのELISAインヒビションの結果では、ベニザケとヒメマスはお互いに同等(約100%)の阻害率を示した。これらの結果から両魚種のIgE結合能には交差抗原性があり、その強さは同等と考えられた。
イクラ：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た。

オレンジ：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 IgE 結合性を示した。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：

小麦アレルギー：リコンビナントタンパクを用いたω-5 グリアジン特異的 IgE 抗体検査は、初期診断のみならず予後の推定においても有用な指標となることを報告した。本検査は保険収載されて、臨床診断に用いられている。

ピーナッツアレルギー：リコンビナントタンパクを用いた Ara h 2 特異的 IgE 抗体検査が、特異性に優れた有用な臨床検査になることを報告した。現在、保険収載に向けて申請中である。

大豆アレルギー：Gly m 5、Gly m 6 は主要アレルゲンではあるものの、特異的 IgE 抗体検査の有用性は粗抗原を用いた検査を超えるものではないことを確認した。Gly m 2S albumin 特異的 IgE 抗体検査は、臨床診断に用いる有用性が示唆され、リコンビナントタンパクを用いてより精度の高い臨床検査を検討している。

ゴマアレルギー：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て、診断における特異度としては不十分であった。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) 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：

サケ類の陸封型（ヤマメ）と降海型（サクラマス）のパ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の加熱抽出液を SDS-PAGE で分析した結果、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。次に、ヤマメおよびサクラマスから 3 成分のパルブアルブミンを精製した。3 成分のパルブアルブミンの分子量は、両魚種間でお互いによく一致した。

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：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 PA I および PA II 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 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。

甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein（SCP）の一次構造解析：甲殻類の新しいアレルゲンとして同定された SCP に着目し、3 種甲殻類（ブラックタイガー、クルマエビおよびズワイガニ）の SCP をコードする cDNA をクローニングし、塩基配列解析により全アミノ酸配列（いずれも 192 残基）を決定した。各種甲殻類の SCP はお互いに類似していた。一方、甲殻類と軟体動物（貝類）の SCP との間の相同性はわずか 10-21%で、非常に低かった。

ブラックタイガーSCP の大腸菌における発現：ブラックタイガーの SCP を HisGln（HQ）タグつきタンパク質として大腸菌で発現した。患者血清を用いた ELISA および阻害 ELISA の結果から、rSCP の IgE 反応性は天然 SCP と同等であると判断された。

ブラックタイガーSCP の IgE エピトープ：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。また、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。

クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定:クロアワビに検出された 100 kDa の新規アレルゲンを、塩溶性タンパク質画分から精製し、部分アミノ酸配列分析によりパラミオシンであることを明らかにした。患者血清を用いた ELISA では、患者 18 人中 16 人がクロアワビトロポミオシンに反応し、またトロポミオシンに反応した患者はすべてクロアワビパラミオシンにも反応した。イムノブロッティングにより、IgE 陽性反応を示すパラミオシンは軟体動物にかなり広く分布すると推定された。さらに、阻害イムノブロッティングおよび阻害 ELISA により、パラミオシンはトロポミオシンと抗原交差性を示すという非常に興味深い事実が判明した。

クロアワビパラミオシンの一次構造解析:クロアワビの新しいアレルゲンとして同定したパラミオシンについて、部分アミノ酸配列情報をもとに cDNA 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、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。

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 μg(魚類タンパク質)/g(食品)、定量限界は 0.70 μg/g であった。5 種類のモデル加工食品を用いて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] 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査、[4]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、[5]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、甲殻類の標準品について、タンパク質濃度及、電気泳動像、−80℃保存時の安定性が現行の 2ME 系抽出液により調製した標準品とほぼ同等であることが示された。[2]キウイフルーツ標準品の調製及び保存に問題が無いこと、アクチニジンを標的とするELISA系の2次抗体としてビオチンあるいは HRP のどちらの標識も使用可能であることを示し、今後 HRP の標識方法等に検討を加え実用化を目指すこととした。また、リンゴ標準品を調製し、LTP を標的とする ELISA 系を構築した。今後 LTP 含有量の低い加工食品への対応を検討する。[3] 魚肉すり身を原料とする加工食品へのえび・かに混入の実態調査を行い、比較的高い割合でえび・かに混入しているがその含有量は少ないこと、ほとんどの場合はえびが混入していることを示した。[4]BIST による多品目同時検出、及び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であることを示した。[5]ゴマアレルゲンである 11S グロブリンの全長にわたって患者 IgE と反応する部位が存在し、そのうちの 3 カ所は他種の 11S グロブリンでエピトープであることが報告されている Allergenic Hot Spot であることを示した。

8) 健康被害防止に関する研究

【平成 21 年度】即時型食物アレルギー全国モニタリング調査から得られた表示ミス症例に対し二次調査を行った。対象 25 例のうち、衛生法違反が 15 名(60.0%)、店頭表示ミスが 7 名(28.0%)であり、表示ミスの多くが製造・販売元の認識不足や誤解であった。衛生法違反 15 例のうち、表示の問題を製造・販売元に通報していたのは 53%、保健所へ通報していたのは 20%であった。このことから、食品衛生法アレルギー物質を含む表示の製造・販売業者、消費者(患者)、そして医師に対する普及啓発活動が強く求められる。

【平成22年度】　アレルギー表示の特定原材料（義務７品目、推奨１８品目）の妥当性を平成20年即時型食物アレルギーモニタリング調査からから検証した結果、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、小麦が多かった。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。

【平成23年度】食品衛生監視員のアレルギー表示に関する実態を明らかにするため、神奈川県に所属する食品衛生監視員（以下食監）295名を対象にアレルギー表示に関する調査を行った。

結果は、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) <u>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</u>：

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) <u>食物アレルギーの誘発量の決定</u>

これまで鶏卵・牛乳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。鶏卵、牛乳および甲殻類(エビ)誘発域値について各アレルギー患者の95%（95%陽性値）、99%（99%陽性値）をカバーする閾値について検討した。

2) <u>食物アレルギー健康被害事例の収集・解析</u>

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。アンケートの記入はインターネットをとおして行い、食物アレルギーに関連した健康被害事例を収集解析した。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するために家庭・園・学校など場面ごとに分類しそれぞれについての対策を考えた。

3) <u>アレルギー物質含有食品早見表（早見表）の作成</u>

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安全係数1/1,000から1/10について検討した。

4) <u>食品のアレルゲン性に関する検討</u>

a)特定原材料に準ずる食品群の中で、「サケ」の範囲は、日本標準商品分類に基づいて決定されて

いるため、陸封性の「マス」は対象外になっている。しかし、これらのアレルゲン性に関する検討はこれまで行われていない。そこで、サケ科サケ属に属するさく河性であるベニザケ、ギンザケと陸封性であるヒメマス、ニジマスのアレルゲン性の検討をした。
b)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。そこでイクラとアレルゲン性を共有する食品について検討した。
c)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ため、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：

食物アレルギーの診断には血中抗原特異的 IgE 抗体検査が重要な位置を占めるが、その臨床的評価は必ずしも十分行われていない。そこで既存の食物抗原特異的 IgE 抗体検査を、食物経口負荷試験や明らかなアレルギー症状の既往を元にした正しい臨床診断と照らし合わせて評価した。また、より精度の高い臨床検査の開発を目的とし各食品のアレルゲンコンポーネント特異的 IgE 抗体検査の有用性を検討した。研究対象とした食物アレルゲンは、小麦、ピーナッツ、大豆、ゴマの４種類である。
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：

これまでの研究により、魚類の主要アレルゲンはパルブアルブミン、甲殻類および軟体動物の主要アレルゲンはトロポミオシンであることが明らかにされている。しかし、魚貝類は種類が多いので、これら主要アレルゲンの IgE エピトープや一次構造に関する情報は十分とはいえない。そこで魚貝類アレルギーを分子レベルで理解し、また魚貝類アレルギーの診断・治療に資することを目的として、各種魚貝類アレルゲンに関する分子生物学的性状の解明を行った。一方、加工食品に含まれる魚類タンパク質の検知法について検討した。
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。平成 20 年 6 月、2ME が毒物に指定されたため、2ME に代わる還元剤として亜硫酸ナトリウム($Na_2SO_3$)を用いた抽出液について、標準品に関する検討、及び実際の加工食品の測定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) 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査：魚肉すり身は、原料である魚が甲殻類を餌として摂取しているため、甲殻類タンパク質が混入する可能性を報告している。今回は、魚肉すり身を原料とする加工食品を対象としてえび・かにの混入に関する実態調査を行った。
d) 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。また食物アレルゲン検査法のバリデーションプロトコー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。
e) ゴマアレルゲンの解析：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
a) 平成 13 年に始まった食品衛生法アレルギー物質を含む食品の表示に関して、これまで表示違反に関する調査はなく、それに基づいた本法の検証もない。このため、即時型食物アレルギー全国モニタリング調査から得られた表示ミス症例に対して二次調査を行い、本法の表示ミスの現状を把握する。
b) 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（アレルギー表示）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。
c) 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) 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、加熱（90℃、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℃15 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 1300μg）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、加熱（90℃15 分）微量負荷試験は 30分ごとに以下の1－4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　(0.002mg)
2,A 液 1.0 ml　(0.02mg)
3,A 液 10 ml　(0.26mg)
4,A 液 30 ml　(0.78mg)

これら微量負荷試験が陰性であった場合に、加熱（90℃15 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（1.3mg）
2, B 液 1.0 ml（13.0mg）
3, B 液 10 ml（130.0mg）
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、牛乳 100μl (0.1ml)（FASTKIT エライザ Ver.II で測定した乳タンパク質 2,200μg）牛乳タンパク質量は約 2,200mg を 200ml のジュースに溶した牛乳微量負荷試験用もの（A 液と略す）と牛乳（B 液と略す）100ml で、牛乳微量負荷試験は 30 分ごとに、以下の 1－5 の順に増量し初日は終了とした。（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　(0.006mg)
2.A 液 1.5ml　(0.016 mg)
3.A 液 15 ml　(0.16 mg)
4.B 液 0.05ml　(1.1 mg)
5.B 液 0.1ml　(2.2 mg)

これら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 1－4 の順に 30 分ごとに実施した。（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 mg)
2.B 液 1ml　(22.0 mg)
3.B 液 10ml　(220 mg)
4.B 液 89ml　(≒2000 mg)

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

インターネットをとおして収集した食物アレルギーに関連した健康被害事例を、食物アレルギー対策に役立つ事例集を作成するため家庭・園・学校など場面ごとに分類した。

3) アレルギー物質含有量に基づいた食品早見表の作成

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わけ、含有食品中の(卵・乳・小麦・大豆)タンパク量別に表を作成した。またこの表には、昨年度までに検討した経口負荷試験とのリンクを可能にするための安全係数である 1/100 をかけたタンパク質含有食品が見つけやすいように変換表をつけた。

4) 食品のアレルゲン性に関する検討

a)サケ・マス各魚抗原の抽出は 1 M-KCl PBS バッファーで抽出し、各抗原に対する患者 IgE 結合能とイムノブロットパターンを比較した。次に ELISA inhibition、Immunoblot inhibition を行い抗原性の相違につき検討した。IgE 結合能の相関に関しては病歴から魚アレルギーが疑われて

採血した患者50名から得られたものを使用した。ELISA inhibition と immunoblot 試験においては、サケアレルギーの病歴のある6名とサケアレルギーの病歴はないが、サケ特異的 IgE が高値の患者血清2名を選んで行った。

b)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検討した。イクラ・ウニ抗原はこれまでと同様 1M KCL-PBS バッファーで抽出し、イクラとウニの交叉反応性の検討には ELISAinhibition と Immunoblot inhibition を用いて検討した。

c)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：

a) 小麦: □-5グリアジン特異的IgE抗体検査の臨床診断及び予後の推定における有用性について、後方視的な追跡調査で評価した。

b) ピーナッツ: リコンビナントタンパクを用いた Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3、Ara h 8、Ara h 9 特異的 IgE 抗体検査を開発し、ピーナッツ特異的 IgE 抗体陽性者における特異度を検討した。

c) 大豆: 主要な貯蔵タンパクである Gly m 5、Gly m 6、Gly m 2S albumin を精製して、特異的 IgE 抗体検査の臨床診断における有用性を評価した。

d) ゴマ: 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：

a) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封性（ヤマメ）と降海性（サクラマス）の魚類パルブアルブミン比較：

精製方法：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。

ELISA：加熱抽出液中のパルブアルブミン濃度の測定および精製過程でのパルブアルブミンの検出には可視光 ELISA を用いた。

b) 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

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。

c) 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein（SCP）の一次構造解析：

cDNA ライブラリーの作製：生きているブラックタイガーおよびクルマエビから尾肉を、生きているズワイガニから脚肉を採取し、total RNA を抽出し mRNA Purification Kit (GE Healthcare) を用いて mRNA を精製し、Marathon cDNA ライブラリーを作製した。

ブラックタイガーおよびクルマエビの SCP をコードする cDNA のクローニング：ブラックタイガーSCP については、すでにわかっている部分アミノ酸配列データをもとに 5'RACE を行った。次いで 3'RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。クルマエビ SCP についても、同じ戦略で 5'RACE および 3'RACE を行い、コードする全長 cDNA の塩基配列を解析した。

ズワイガニの SCP をコードする cDNA のクローニング：ズワイガニについては、既報の甲殻類3種（コウライエビ *Fenneropenaeus orientalis*、ザリガニ類 *Pontastacus leptodactylus*、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii*）の SCP のアミノ酸配列および本研究で解析したブラックタイガーSCP のアミノ酸配列から保存性の高い領域を選び、その領域について塩基配列情報のあるブラックタイガーとアメリカザリガニの塩基配列をもとに2つのプライマー（crab-f および crab-r）を設計した。これら2種類のプライマーとアダプタープライマーとを組み合わせて RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

d) ブラックタイガーSCP の大腸菌における発現：

大腸菌における発現および精製：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。

天然 SCP（nSCP）の精製：nSCP は、既報（Shiomi et al. Int Arch Allergy Immunol 2008; 146: 91-98）に従って硫安塩析（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。

e) ブラックタイガーSCP の IgE エピトープ：

ブラックタイガーSCP の IgE 反応性に及ぼす $Ca^{2+}$の影響：ブラックタイガーSCP の IgE 反応性を、キレート剤（EGTA）の非存在下（$Ca^{2+}$保持）および存在下（$Ca^{2+}$除去）での蛍光 ELISA により調べた。

ペプチドの合成：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 種類を合成した

ペプチドの IgE 反応性：ペプチドの IgE 反応性は、蛍光 ELISA によって調べた。ペプチドは 10 μg/mL の濃度で固相化し、上述の蛍光 ELISA 法に準じて行った。

f) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定：

精製方法：クロアワビの筋肉(5 g)を液体窒素を用いて凍結粉砕後、20 mL の 0.5 mM Cys-0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.8）を加えてホモジナイズした。

アミノ酸配列分析：精製した 100 kDa アレルゲン（150 μg）を溶解し、1.5 μg のリシルエンドペプチダーゼを添加して 37 ℃で 18 h 消化した。酵素消化物を逆相 HPLC に供し、流速 1 mL/min で溶出した。溶出液の 220 nm における吸光値を UV 検出器で連続的に測定し、各ピークに対応する溶出液を分取した。分取した溶出液を乾固後、プロテインシークエンサーでアミノ酸配列を分析した。

ELISA および阻害 ELISA：クロアワビから精製した 100 kDa アレルゲン（パラミオシン）およびトロポミオシンの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA によって検討した。

イムノブロッティングおよび阻害イムノブロッティング：6 種軟体動物（クロアワビ、サザエ、ムラサキイガイ、ホタテガイ、スルメイカ、マダコ）の筋肉をそれぞれ液体窒素で凍結粉砕後、4 倍量の 0.9 M KCl-0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.8）を加えてホモジナイズした。阻害イムノブロッティングでは、患者血清（1:100 希釈）に等量の阻害剤（パラミオシンまたはトロポミオシン）溶液（20 μg/mL）を添加して 37 ˚C、2 h 反応後、一次抗体として用いた。

g) クロアワビパラミオシンの一次構造解析

部分アミノ酸配列データをもとに degenerate フォワードプライマー（DegeF1）を設計し、AUAP（abridged universal anchor primer）と組み合わせて 3'RACE を行った。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。

h) 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、豚肉シュウマイ、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) <u>食物アレルギー原因物質の解析及び検査法</u>：

a) 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良：

本研究では、現行の抽出液の組成のうち、「0.5% SDS及び2% 2ME」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て標準品を調製した。また、標準品規格に則り、標準品原液を、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、安定性を検討し、

2ME系標準液の安定性について比較した。
2ME含有抽出液を用いるELISA系と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て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。

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・粉砕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・粉砕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。

(3)バナナ検出法の開発には、バナナアレルゲンであるClass Iキチナーゼ(CIC)を還元カルボキシメチル化し、変性CICとした。BALB/cマウスに変性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。

c) 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

魚肉すり身の加工食品として、ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げの 4 種について、それぞれ市販 12 製品を検体とした。

d) 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 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。

e) ゴマアレルゲンの解析

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。ミキサーで粉砕し、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ブ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) <u>健康被害防止に関する研究</u>

a) 対象は、平成 20 年即時型食物アレルギー全国モニタリング調査にて、即時型食物アレルギー症状の発症原因が“表示ミス”で返信があった 63 名（41 施設）とし、2 次調査を郵送法で行った。

b) 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で抽出された症例を対象とした。

c) 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) <u>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</u>：

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、利用場面を小学校に想定し、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、ルールの説明で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) <u>鶏卵、牛乳、エビの誘発量の決定に関する研究</u>

加熱卵微量負荷試験を行った症例は 128 名、平均卵白特異的 IgE は 17.0±21.7UA/ml、平均オボムコイド特異的 IgE は 12.1±20.0UA/ml であった。陽性は 23 名、平均卵白特異的 IgE は 15.3±14.9UA/ml、平均オボムコイド特異的 IgE は 9.8±14.9UA/ml。

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

牛乳微量負荷試験を行った症例は 82 名、平均牛乳特異的 IgE は 12.4±21.1UA/ml であった。

牛乳普通量負荷試験を行った症例は 122 名、平均牛乳特異的 IgE は 7.7±14.9UA/ml であった。

結果、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 29.2μg、牛乳に関しては 1265.5μg であった。99%のそれらに関する値は卵 2.7μg、牛乳 22.9μg 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、88.4 ㎎と 35.4mg であった。

卵・牛乳・エビでの最小誘発量の検討で陽性者の 95%を含む域値はいずれの食品でも 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。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負荷試験から行う必要性に関する検討では、鶏卵・牛乳とも、特異的 IgE 抗体価の高値やアナフィラキシー誘発歴の存在から、誘発域値が低いと推定することは不可能であることが分かった。

2) <u>食物アレルギー健康被害事例の収集・解析に関する研究</u>

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) <u>アレルギー物質含有量に基づいた食品早見表の作成</u>

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) <u>食品のアレルゲン性に関する検討</u>

a) サケとマスは同科同目同種に属する魚である。魚アレルギー患者 50 名を用いた IgE 結合能の相関係数は、ベニザケ-ヒメマス間が一番高かった。ELISA inhibition での検討では、ベニザケ-ニジマス間ではどの患者でもお互いに 100%阻害を示した。Inhibition immunoblot の結果いずれのタンパク質に対する特異的 IgE 結合も互いに阻害しあうことが判明し、両者の間には共通アレルゲン性が存在し、アレルゲン性はほぼ同一と考えられた。

b) イクラとウニ

イクラとウニの間には ELISA inhibition で共通抗原性があり、immunoblotting inhibition で低分子タンパク質が原因抗原と考えられた。また、イクラ患者の一部でウニによって誘発症状をき

たした症例が存在した。

c) 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。

6) 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：

a) 小麦

臨床現場において小麦アレルギーを疑って特異的IgE抗体検査を行った全233例（そのうち59例が小麦アレルギー確定診断）にω-5グリアジン特異的IgE抗体検査を実施し、プロバビリティーカーブを報告した。小麦アレルギーと確定診断された70例を2年間フォローして、耐性獲得群28例、持続群42例における小麦及びω-5グリアジン特異的IgE抗体価の推移を検討したところ、ω-5グリアジン特異的IgE抗体は耐性獲得と共に高率に陰性化することを見いだした。

小麦アレルギーの診断及び予後の推定におけるω-5グリアジン特異的IgE抗体検査の評価はほぼ完了し、保険適応も取得して臨床診断として定着することが期待される。今後は、グルテニンや水溶性アレルゲンを含めて総合的に小麦アレルゲンを評価して、感度・特異度ともに良好な臨床検査の組み合わせを開発する必要がある。

b) ピーナッツ

ピーナッツ特異的IgE抗体陽性187例において、ピーナッツアレルギー患者（69例）では、ピーナッツ特異的IgE抗体価は大豆よりも高値を示すことを確認した。 コンポーネントを検討した75例（そのうちピーナッツアレルギー42例）では、Ara h 2が感度・特異度ともに良好であり、Ara h 1と組み合わせで評価するとより高い特異度が得られることを確認した。しかし感度・特異度を向上させるためにはAra h 1など複数のコンポーネントを組み合わせた評価が望ましい。さらに、Ara h 8、Ara h 9などはピーナッツに対する口腔アレルギー症候群の診断に有用なマーカーであることが期待され、今後さらに検討を重ねていく必要がある。

c) 大豆

大豆アレルギー19例、無症状感作例36例を検討した。Gly m 5、Gly m 6特異的IgE抗体価は、大豆粗抗原と強く相関し、感度は良好であるものの特異度は大豆と同等であった。Gly m 2S albuminは、大豆アレルギー患者でより高値を示し、特異度の良好なバイオマーカーとして有用性が示唆された。

d) ゴマ

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。

大豆及びゴマは、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) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型（ヤマメ）と降海型（サクラマス）のパルブアルブミン比較

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、ヤマメのパルブアルブミン含量はサクラマスよりかなり高いことが示唆され、このことはELISAによる定量で裏付けられた。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。

b) 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。

c) 甲殻類 sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の一次構造解析

RACE 法により、3 種甲殻類 (ブラックタイガー、クルマエビおよびズワイガニ) の SCP をコードする全長 cDNA をクローニングし、塩基配列解析により全アミノ酸配列 (いずれも 192 残基) を決定することができた。甲殻類 SCP のアミノ酸配列はお互いに 70%以上の相同性を示すが、軟体動物 SCP との相同性は非常に低い (10-21%)。

d) ブラックタイガーSCP の大腸菌における発現

ブラックタイガーSCP を HQ タグつきタンパク質として大腸菌で発現し、rSCP を精製することができた。患者血清を用いた ELISA 結果から、rSCP の IgE 反応性は nSCP と同等であると判断された。さらに阻害 ELISA の結果も、rSCP は nSCP の IgE 結合エピトープを完全に保持していることを支持した。本研究で得た rSCP は HQ タグつきであるが、今後の甲殻類アレルギー研究や甲殻類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。

e) ブラックタイガーSCP の IgE エピトープ

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。$Ca^{2+}$を除去すると立体構造が変化し、IgE 結合能が低下する。

f) クロアワビに見いだされた新規アレルゲンの精製・同定

クロアワビから精製した 100 kDa アレルゲンは、リシルエンドペプチダーゼ分解で得られたペプチド断片のアミノ酸配列分析結果から、パラミオシンであることが判明した。甲殻類ではトロポミオシンのほかに、アルギニンキナーゼ、SCP およびミオシン軽鎖もアレルゲンであることが最近次々に報告されている。軟体動物の場合、トロポミオシン以外のアレルゲンの同定例はない。その意味で、パラミオシンは軟体動物の第 2 のアレルゲンである。

パラミオシンとは患者 18 人中 16 人が反応するので、トロポミオシン同様に主要アレルゲンであると判断された。また、パラミオシンとトロポミオシンの間には抗原交差性が認められる。

g) クロアワビパラミオシンの一次構造解析

イムノブロッティングおよび阻害イムノブロッティングの結果から、パラミオシンはクロアワビ特有のアレルゲンではなく、ムラサキイガイ、スルメイカなど各種軟体動物間で抗原交差性を示すアレルゲンであると推定される。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。

h) 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アミン (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 μg/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

(1) 標準品に関する検討
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℃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。

(2) 加工食品の測定に関する検討
2ME 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系を用いて、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結果、良好な相関が見られた。以上から、両ELISA系の測定値はほぼ同等であることが示された。

(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）。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る。

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 μg/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 μg/mL、6.5-13.2 μg/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。

(3) バナナ検出法の開発
変性 Class I キチナーゼ（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。

c) 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

魚肉すり身を原料とする加工食品であるちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げ、合計48検体について、ELISA法およびPCR法についてえび・かに混入の実態調査を行った。ELISA法で陽性となったものは36検体(75%)であったが、タンパク質濃度は比較的低かった。PCR法で陽性となったものは36検体(75%)であり、35検体はえび、1検体のみかにであった。以上の結果から、魚肉すり身を原料とする加工食品には比較的高い割合で甲殻類が混入しているが、その含有量は少ないこと、ほとんどの場合はえびが混入していることが示された。

d) 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

(1) 特定原材料検査用 BIST に関する検討

7 項目同時検査の可能性が示唆された。また 10 μg/g のタンパク質を検出可能であることが示された。

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。今後、様々な市販食品を用いた検証実験を進め、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。

(2) 蛍光偏光法に関する検討

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。

(3)食物アレルゲン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

Canada、USA、EU、Australia、日本の国際コミュニティーの中で食物アレルゲン検査法のバリデーションプロトコールのハーモナイゼイションを検討し，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。

e) ごまアレルゲンの解析

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

a) 対象25例のうち、衛生法違反が15名(60.0%)、店頭表示ミスが 7 名(28.0%)であり、表示ミスの多くが製造・販売元の認識不足や誤解であった。衛生法違反 15 例のうち、表示の問題を製造・販売元に通報していたのは 53%、保健所へ通報していたのは 20%であった。

食品衛生法アレルギー物質を含む表示の製造・販売業者、消費者(患者)、そして医師に対する普及啓発活動が強く求められる。

b) 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、小麦が俄然多かった。

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。

c) 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) <u>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</u>：

教材は、5 日間のランチメニューを自身のアレルゲン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、使用後 5 問の計 8 問である。食物アレルギーという言葉を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.
8) 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 65, 283-289, 2010.
9) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Morishita N, Matsumoto T, Urisu A,Enzyme-linked immunosorbent assay kit for the determination of soybean protein in processed foods:Interlaboratory evaluation,J AOAC International, 93, 243-248, 2010.
10) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A,Teshima R,A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking induced luciferase expression in cultured mast cells,Allergy,65,1266-1273,2010.
11) 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.
12) 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 154, 236-245, 2010.
13) 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 28, 558-560, 2010.
14) 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 52, 319-326, 2010.
15) Kondo Y, Urisu A,Oral Allergy Syndrome, Allergol Int,58,485-491,2009.
16) Hino S, Matsubara T, Urisu A, Aoki N, Sato C, Okajima T, Nadano D, Matsuda T,Periodate-resistant carbohydrate epitopes recognized by IgG and IgE antibodies from some of the immunized mice and patients with allergy,Biochem Biophysl Res Commun,380,632-637,2009.
17) Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Kato M, Hirata N, Matuyama H, Kakami M, Tsuge I, Ohya Y, Urisu A.,Short-term efficacy of tacrolimus ointment and impact on quality of life ,Pediatric international ,51,385-389,2009.
18) Kondo Y, Ahn J, Komatsubara R, Terada A, Yasuda T, Tsuge I, Urisu A,Comparison of allergen properties in salmon (Oncorhynchus nerka) from landlocked and anadromous species,Allergology International, 58, 295-299, 2009.

19) Ito K, Urisu A.,Diagnosis of Food Allergy Based on Oral Food Challenge Test.,Allergol Int,58,467-474,2009.

伊藤

20) Ebisawa M, Shibata R, Sato S, Borres MP, Ito K. Clinical Utility of IgE Antibodies to ω-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, 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. 128, 673-5, 2011.

23) Komei Ito, Atsuo Urisu. Diagnosis of food allergy based on oral food challenge test. Allergology International 58, 467-474, 2009.

塩見

24) 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)

25) 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.

26) 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.

27) 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.

28) 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.

29) K. Shiomi, S. Yoshida, T. Sawaguchi and S. Ishizaki: A major IgE epitope of rainbow trout collagen α2 chain. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 51, 153-159, 2010.

30) Y. Kobayashi1, 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.

31) A. Emoto, S. Ishizaki and K. Shiomi: Tropomyosins in gastropods and bivalves: identification as major allergens and amino acid sequence features. Food Chem., 114, 634-641, 2009.

安達

32) 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.

33) 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.

34) 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.

35) Akiyama H, Imai T, Ebisawa M, Japan Food Allergen Labeling Regulation – History and Evaluation, *Advances in Food & Nutrition Research*, 62,139-171, 2011.
36) 6) 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.
37) 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.
38) 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.
39) 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.

**海老澤**

40) Ebisawa M, Shibata R, Sato S,Borres MP, Ito K: Clinical Utility of IgE Antibodies to ω -5 Gliadin in the Diagnosis of Wheat Allergy: A Pediatric Multicenter Challenge Study, Int Arch Allergy Immunol. 2011 in press.
41) 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.
42) 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.
43) 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.
44) 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.
45) 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.
46) 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.
47) Akiyama H, Imai T, Ebisawa M.: Japan food allergen labeling regulation-history and evaluation, Adv Food Nutr Res. 62:139-71, 2011.
48) 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. Dec;126(6):1119-1128.e12, 2010.
49) 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.
50) 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.
51) 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 Antonieta Guzm n, Haiqi Li, Ralf G. Heine,