

平成29年度 食品健康影響評価技術研究 成果発表会

日時：平成29年10月2日（月）
14：00～16：30

場所：食品安全委員会 中会議室
（東京都港区赤坂5-2-20
赤坂パークビル22階）



～プログラム～

ページ

(1) 家畜とヒトとの間における薬剤耐性菌の循環
に関する分子疫学および時空間比較ゲノム解析
(主任研究者：荒川 宜親)
14：05～14：50

1

(2) 食品に対する乳児期のアレルギー性反応獲得
メカニズムと発症リスク評価
(主任研究者：木戸 博)
14：50～15：35

23

(3) 食品由来のアクリルアミド摂取量の推定に関
する研究
(主任研究者：河原 純子)
15：35～16：20

41

家畜とヒトとの間における薬剤耐性菌の循環に関する 分子疫学および時空間比較ゲノム解析



荒川 宜親（あらかわ よしちか）

国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻微生物・免疫学講座
分子病原細菌学／耐性菌制御学分野 教授

1983年9月 名古屋大学医学部卒業
1989年3月 名古屋大学大学院医学系研究科病理系細菌学専攻博士課程修了
医学博士（名古屋大学）
1989年4月 名古屋大学助手（医学部細菌学）
1994年6月 名古屋大学助教授（医学部細菌学）
1996年7月 国立予防衛生研究所 細菌・血液製剤部 部長
2002年4月 国立感染症研究所 細菌第二部 部長
2011年4月 名古屋大学大学院医学系研究科 教授（現職）

（その他兼務等）

内閣府食品安全委員会専門委員、国立感染症研究所名誉所員、厚生労働省厚生科学審議会感染症部会
薬剤耐性（AMR）に関する小委員会委員、日本細菌学会評議員、日本臨床微生物学会理事ほか

<研究成果概要>

家畜とヒトとの間の薬剤耐性遺伝子の伝達様式を解明するために、本研究では、家畜（主に豚）や市販生食肉（主に鶏肉）から、多数の第三世代セファロスポリン耐性大腸菌を分離し比較解析を実施した。ゲノム解析で新たに得られた100を超えるプラスミドゲノムデータとともに公開されているゲノムデータベースに登録されたゲノム情報とを用いて、時空間ゲノム比較解析を行った。

その結果、第三世代セファロスポリン耐性に関与するIncFとIncI1型プラスミドは、ヒトと家畜が保有する大腸菌でそれぞれクローナル伝播、拡散していることが強く示唆された。特にCTX-M-8の遺伝子を仲介するIncI1プラスミドは、最初にニワトリで出現し、小売の鶏肉を介してヒトに伝達された可能性が示唆された。一方、2016年に日本の長野県で購入した国産鶏肉検体から検出されたコリスチン耐性大腸菌に保持されたmcr-1媒介性IncI2プラスミドは、かなり以前に日本国外で最初に出現した可能性があるプラスミドが日本への侵入後にゲノム構造が徐々に変化し、日本国内に広がりつつある可能性が示唆された。

様々な抗菌剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドのゲノム構造は非常に多様化しており、複雑になってきているため、抗菌薬の耐性遺伝子と家畜およびヒトから回収されたプラスミドの関連性に関するより効果的な遺伝子解析のために、新しい解析アルゴリズムを作成する必要がある。いずれにせよ、我々は、最初、南アメリカで鶏において出現し、現在、鶏肉を通して世界中に広がりつつあると考えられるCTX-M-8遺伝子を担うIncI1プラスミドの遺伝的関連性を明らかにすることができた。

「家畜とヒトとの間における薬剤耐性菌の循環に 関する分子疫学及び時空間比較ゲノム解析」

(課題番号:1504)

研究代表者 荒川宜親(名古屋大学)
研究分担者 川村久美子(名古屋大学)
長野則之(信州大学)
鈴木匡弘(愛知県衛生研究所)

研究協力者 皆川洋子 (愛知県衛生研究所)
木村幸司、和知野 純一、山田景子、長野由紀子
(名古屋大学大学院医学系研究科)
法月千尋、林 謙吾、大野宏枝、吉田真歩 (同上 修士課程)
加藤 愛、鈴木めい (名古屋大学医学部 保健学科4年)
大崎裕介、齋藤さとみ、小坂駿介、林 航、谷口 唯
(信州大学大学院 医学系研究科 修士課程)
三浦義明、竹内 仁、柴田篤志、佐久間一紀、竹内政行、佐藤幹雄
(愛知県 食品衛生検査所)

代表的な薬剤耐性菌

ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)

多剤耐性緑膿菌(MDRP)

多剤耐性結核菌(MDR-TB)

広範囲多剤耐性結核菌(XDR-TB)

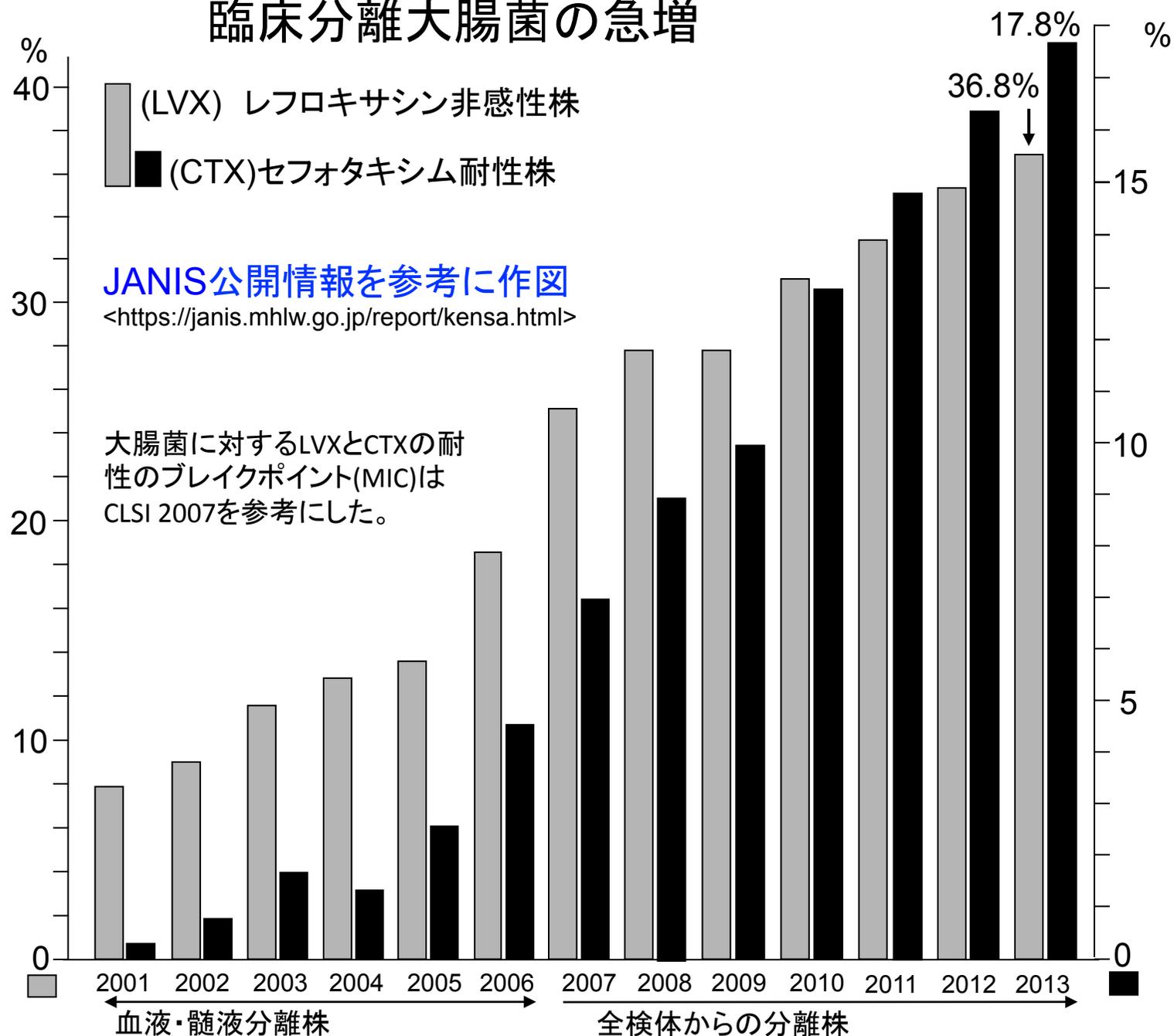
多剤耐性アシネトバクター(MDRA)

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)

コリスチン耐性大腸菌(MCR-1産生株)

セフトキシム耐性とレボフロキサシン非感性とを獲得した 臨床分離大腸菌の急増

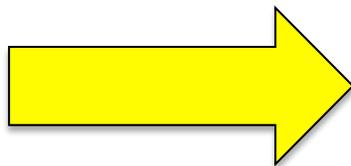


解析の対象とする耐性菌株の選定

★ヒトと家畜とから、共通に分離される頻度が高い
薬剤耐性遺伝子を保有する耐性菌

★プラスミド媒介性の薬剤耐性遺伝子を保有する耐性菌

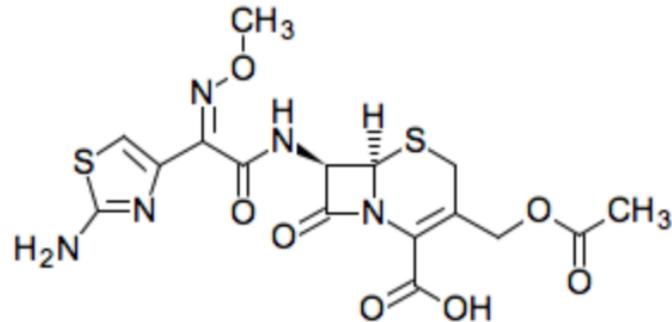
★比較ゲノム解析に活用できる十分なデータ数が確保
できる耐性菌



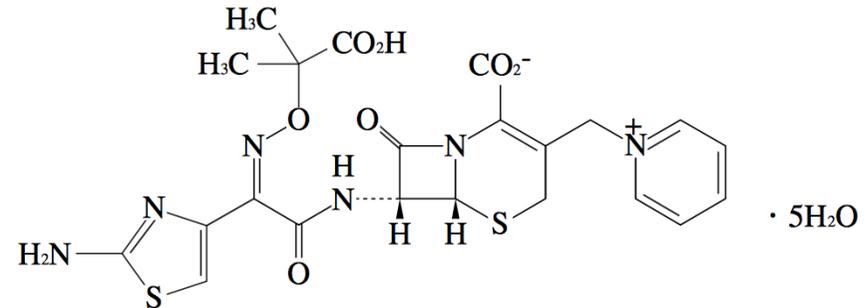
ESBL産生大腸菌

ESBL産生大腸菌とは

☆ 第三世代セファロスポリンに耐性を獲得した大腸菌



CTX(セフトாகキシム)

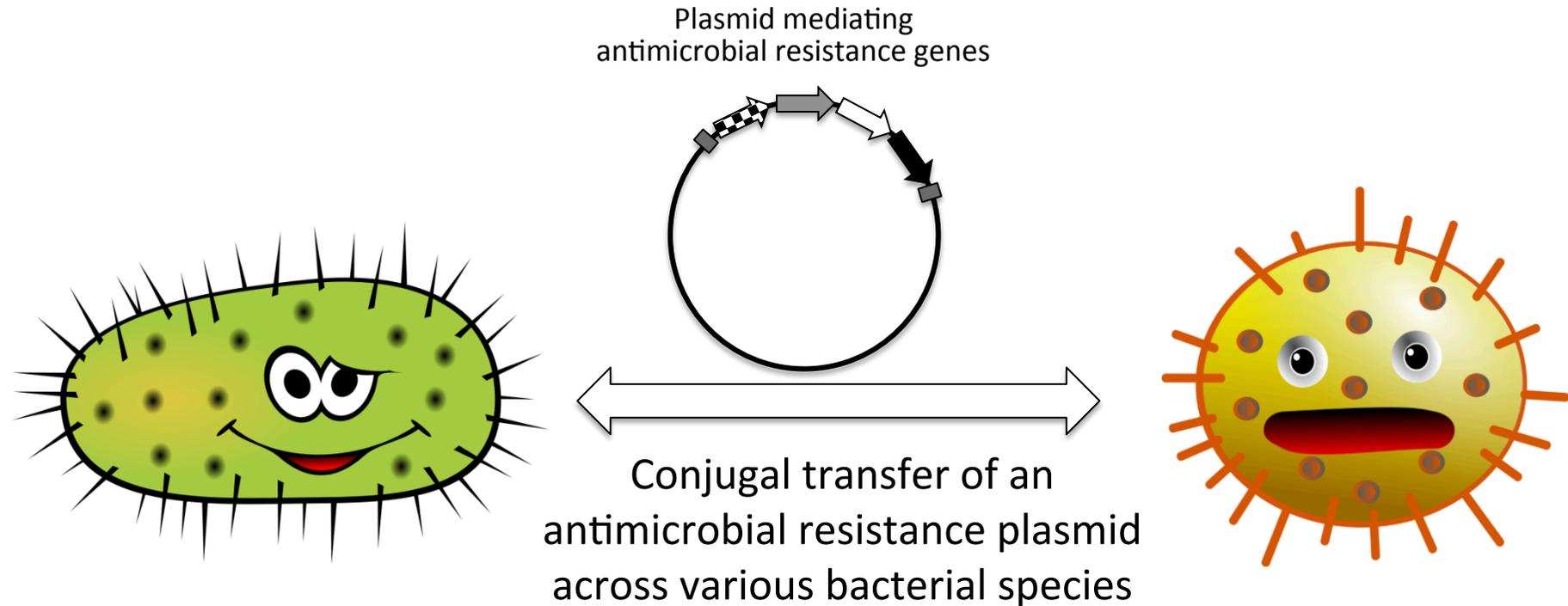


CAZ(セフトアジジム)

☆ 第三世代セファロスポリン耐性はESBLの産生による

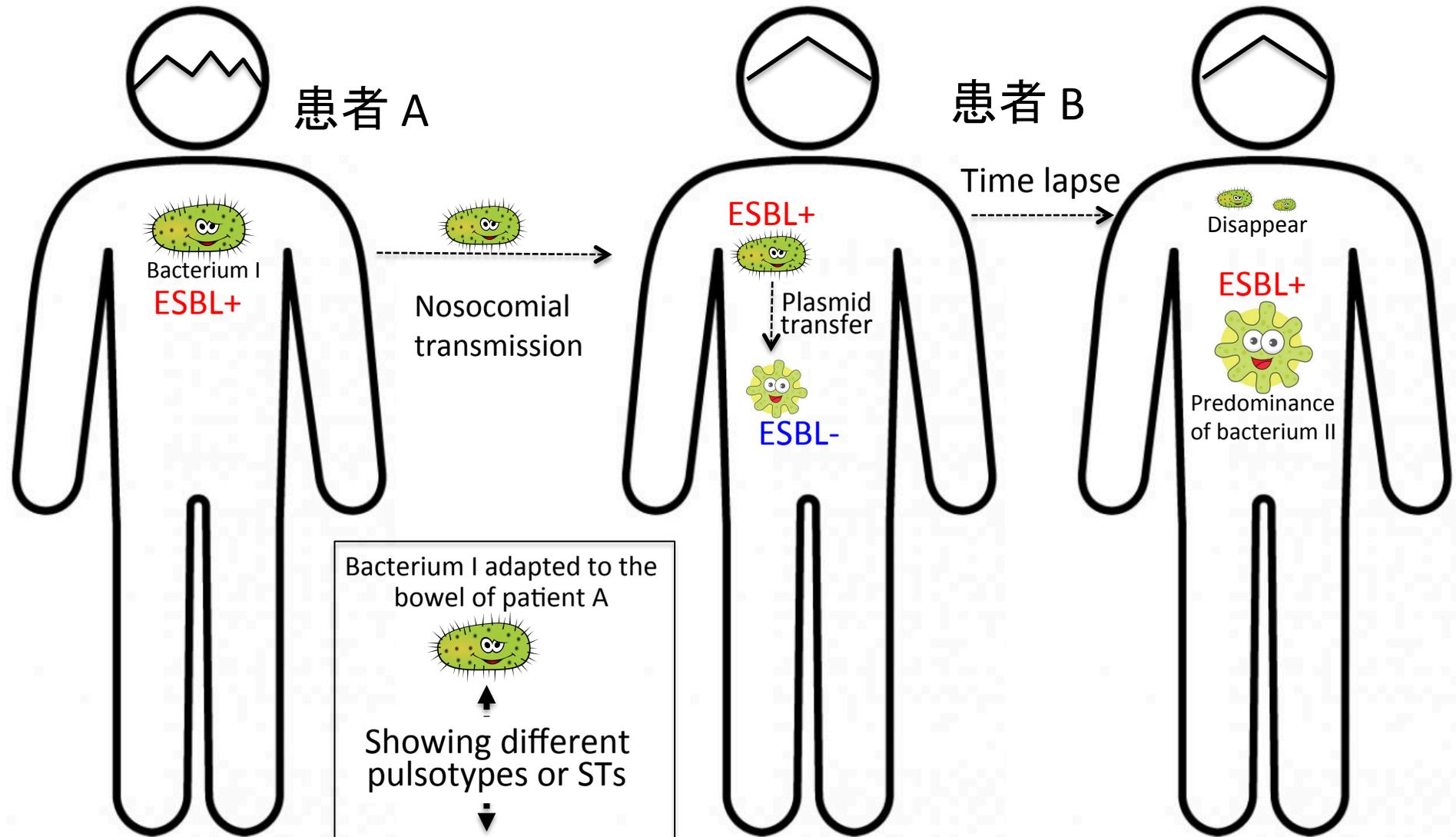
☆ ESBLとは、ペニシリナーゼにより分解されにくい広域セファロスポリンであるセフトாகキシム(CTX)やセフトアジジム(CAZ)などのいわゆる「第三世代セファロスポリン」を効率よく分解する能力を獲得した、**基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended-spectrum β-lactamases)**の略である。

薬剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドが遺伝的に異なる細菌の間を伝達



In this case, various different bacterial species producing the same ESBL are isolated from human, food, livestock and/or the environment.

同じ耐性遺伝子を持つ、異なる菌種の耐性菌が別々の患者から分離される事例



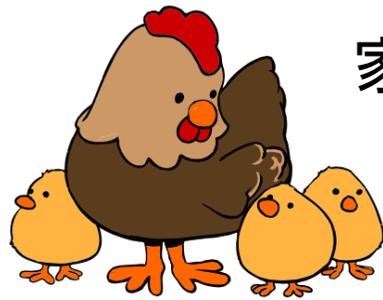
Bacterium I adapted to the bowel of patient A

Showing different pulsotypes or STs

Bacterium II adapted to the bowel of patient B

In this case, genetically very similar plasmids will be found in bacterial isolates I and II.

家畜や食肉と人から同じ耐性遺伝子を持つ 異なる菌種の耐性株が分離される背景



ESBL+

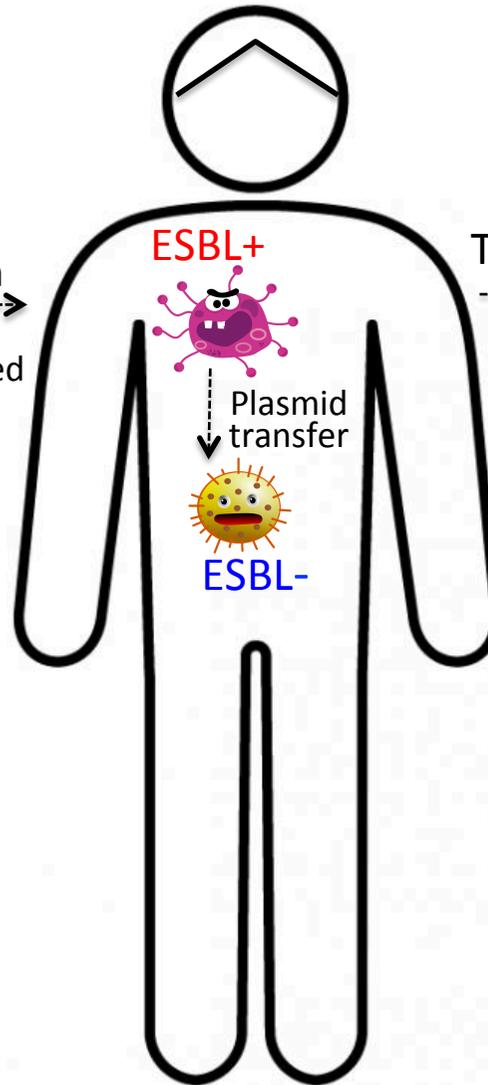


Raw meat

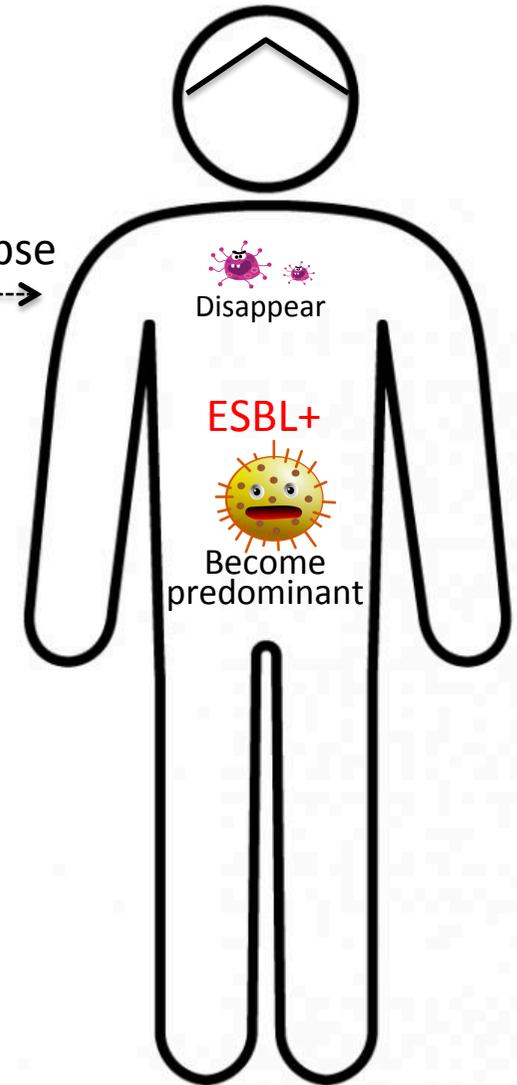


Ingestion of contaminated
meat or foods including
vegetables

Transmission



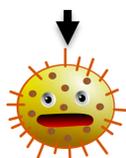
Time lapse



Bacterium having genetic back-
ground more adapted to livestock



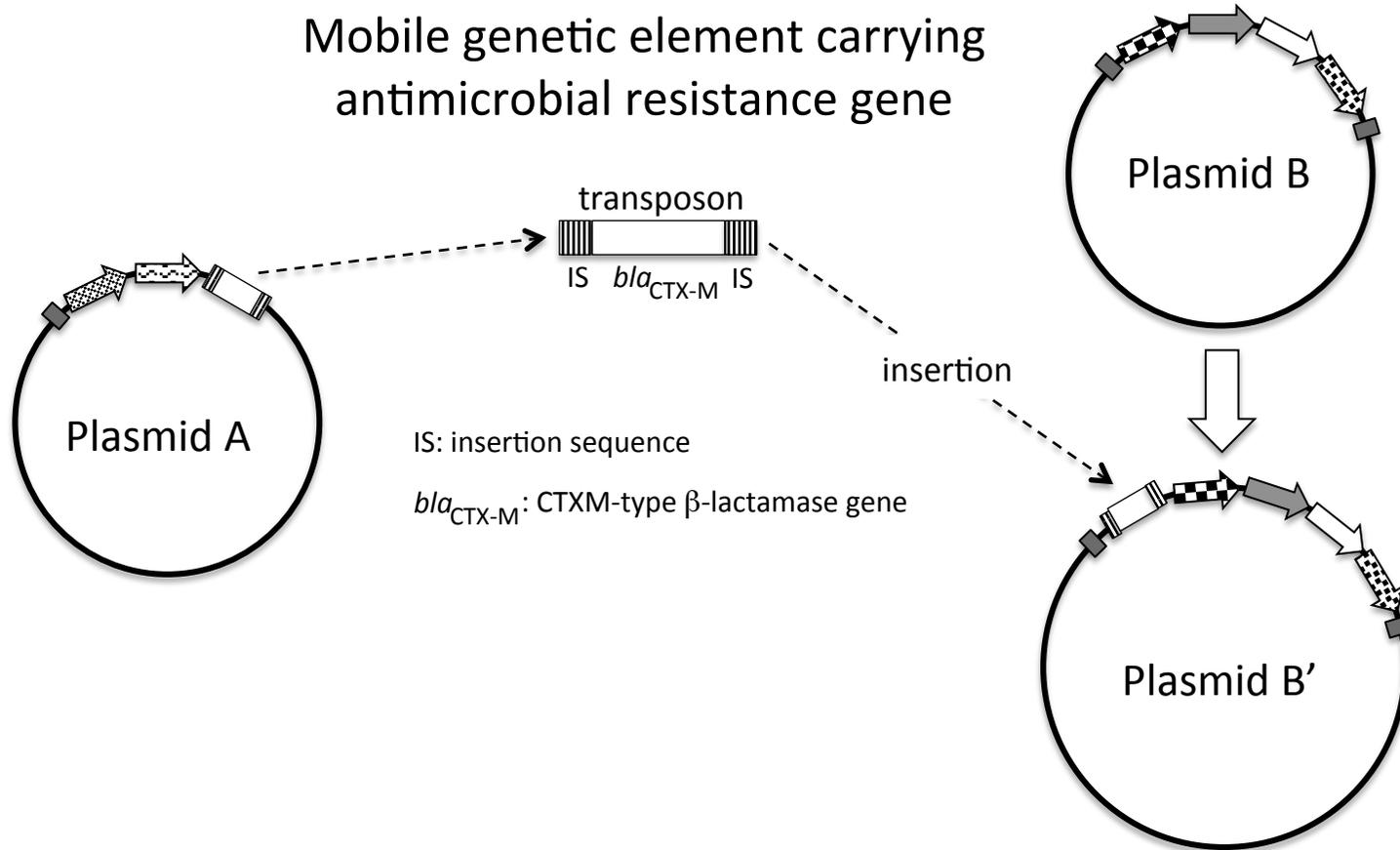
Often showing **different
genotypes or STs**



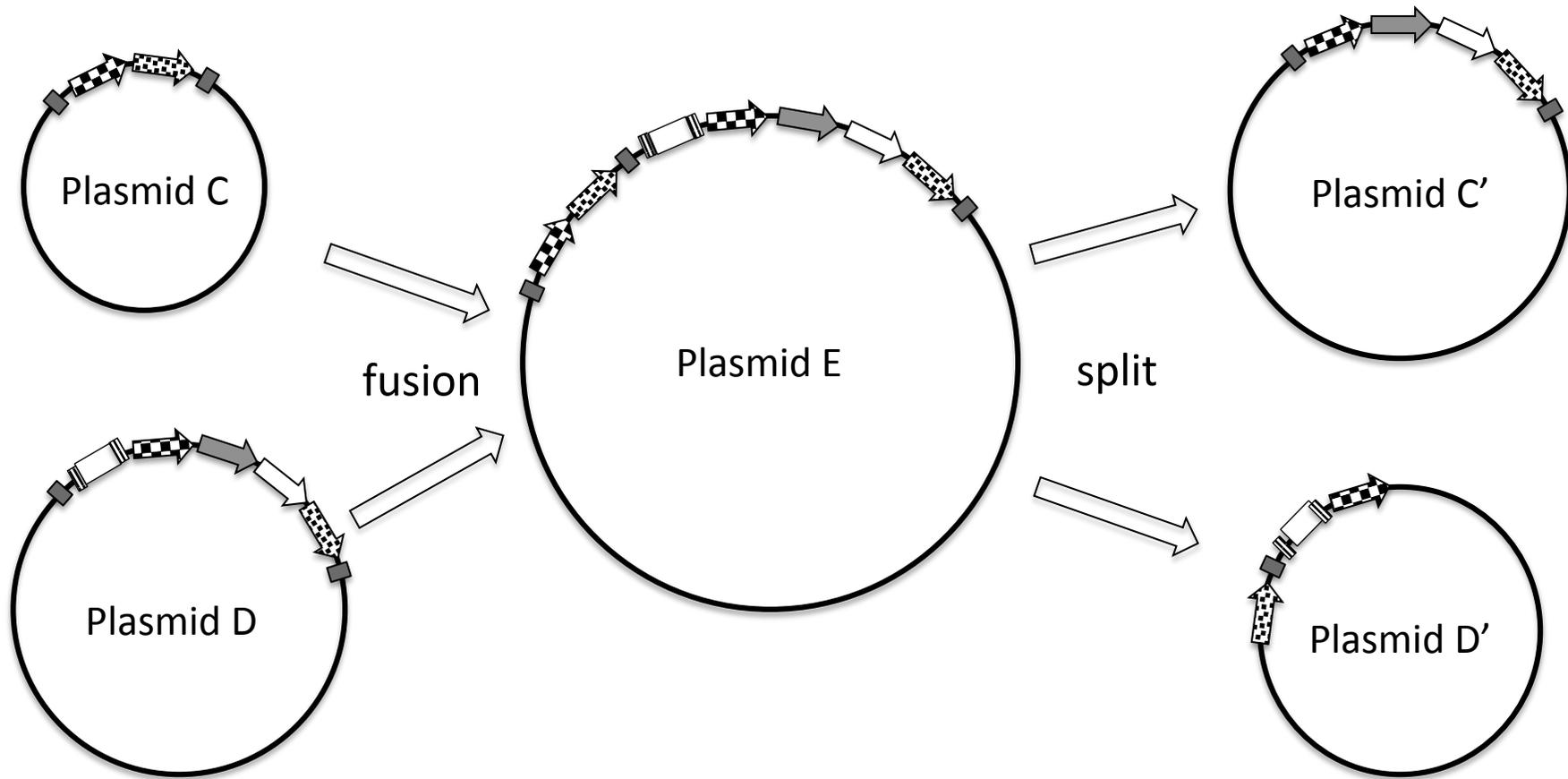
Bacterium having genetic back-
ground more adapted to human

In this case, genetically very similar plasmids
will be found in the two genetically different bacterial
isolates recovered from livestock (raw meat) and human.

異なるプラスミド間での耐性遺伝子の転移

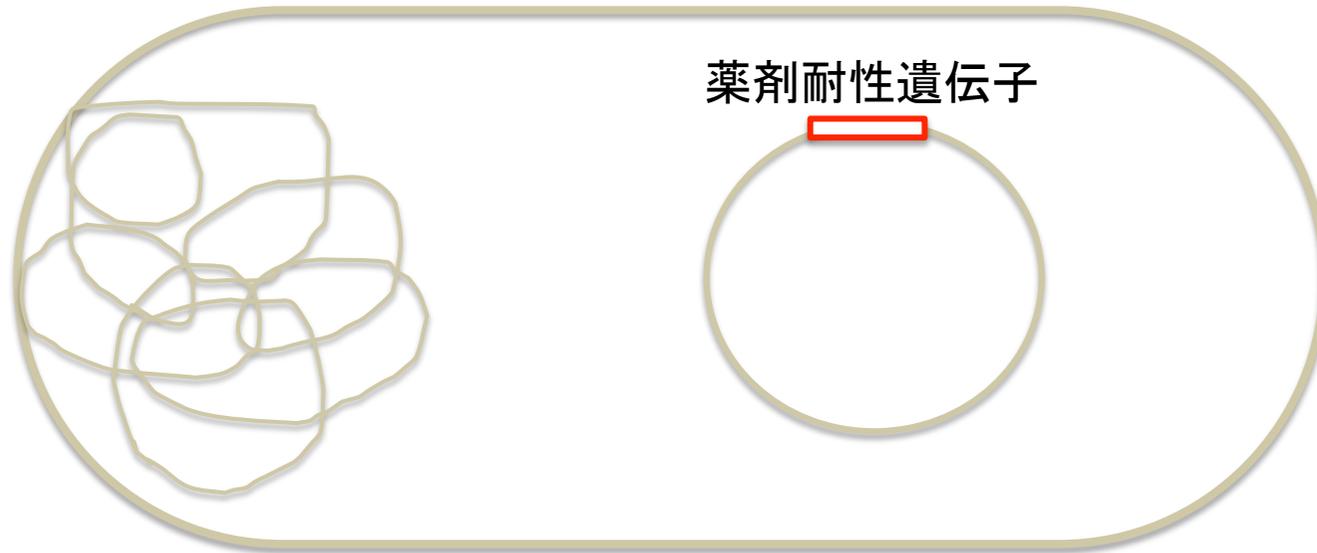


薬剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドの融合と分離

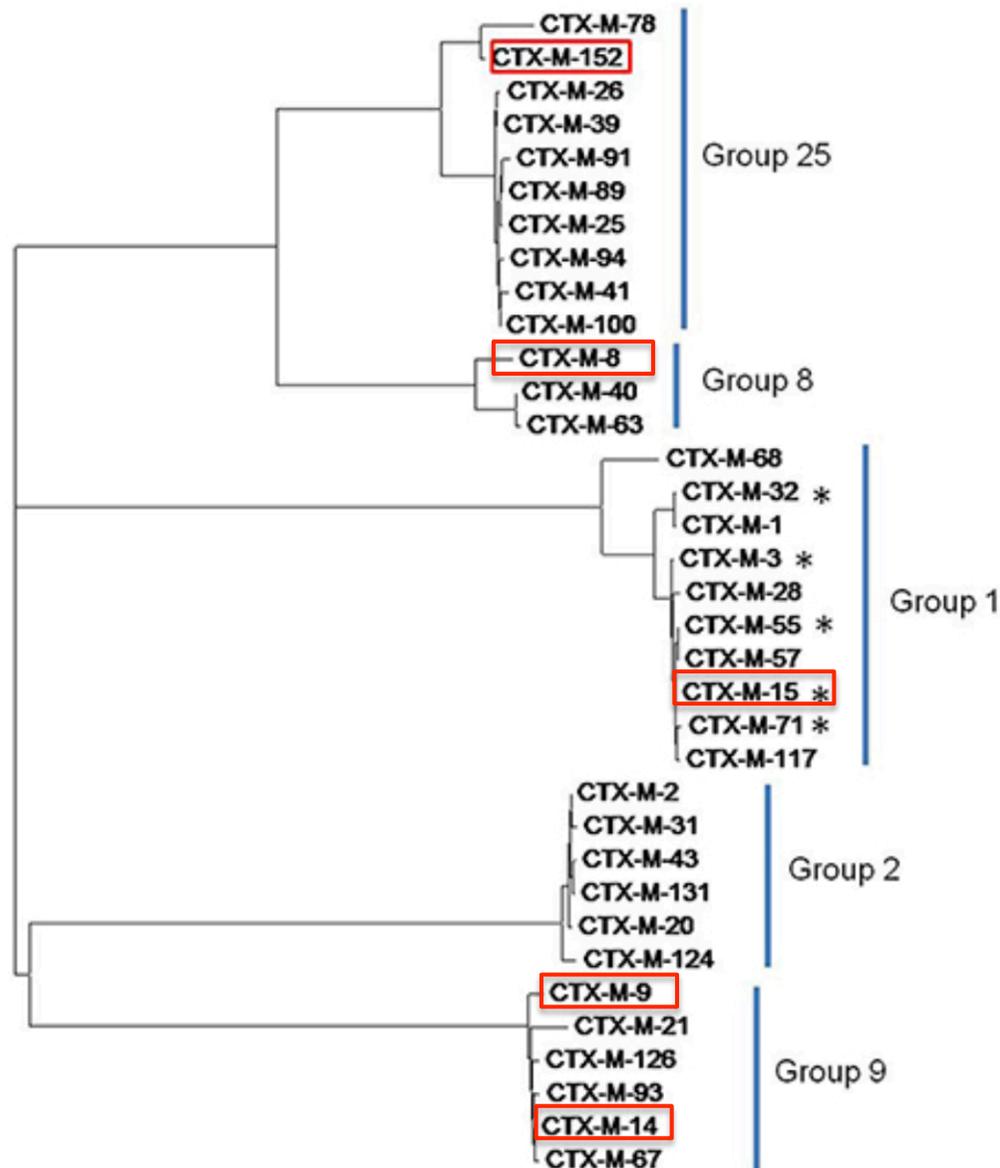


薬剤耐性遺伝子の型

CTX-M型



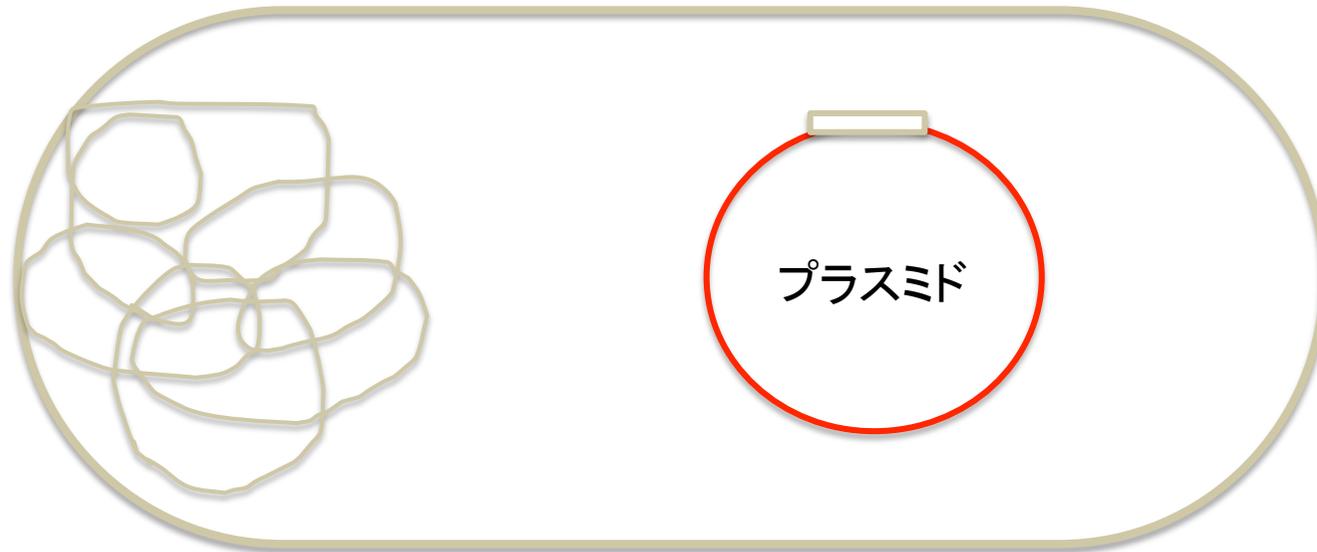
CTX-M型ESBLの遺伝的グループ



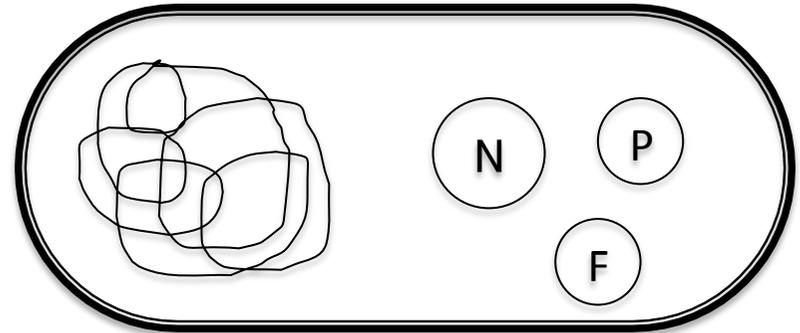
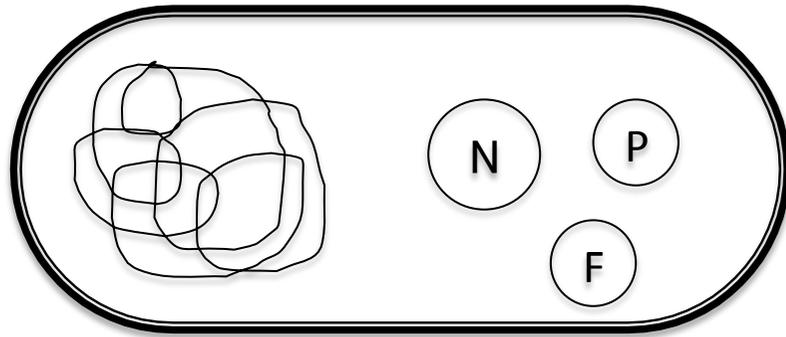
Mudsser Azam, Arif T. Jan and Qazi M. R. Haq
Front. Microbiol., 23 February 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00176>

プラスミドの不和合性型

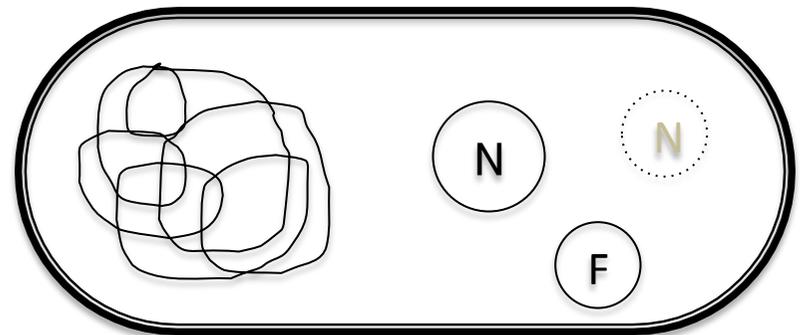
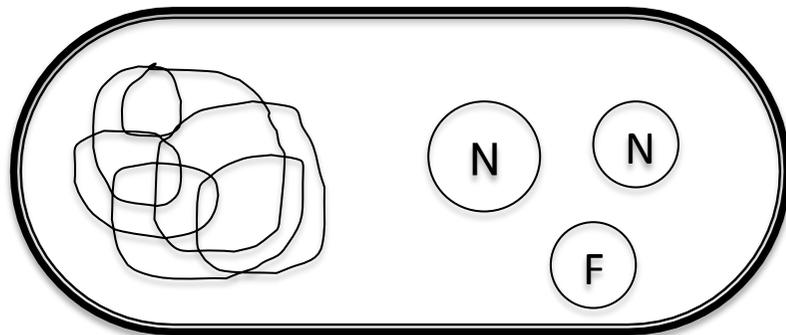
Inc型



プラスミドの不和合性型



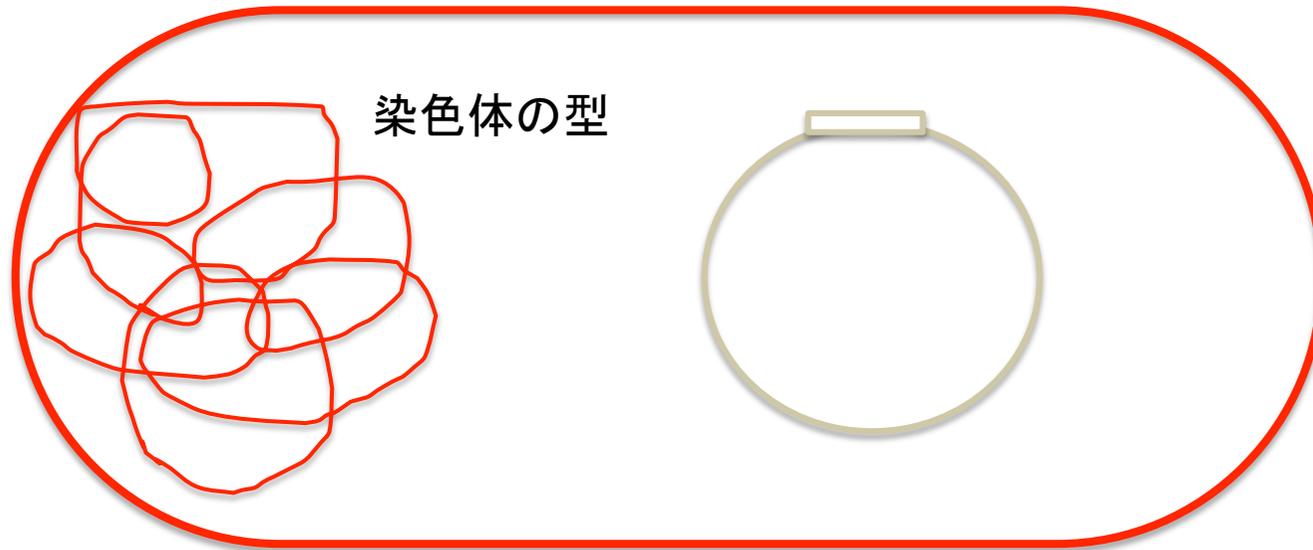
NとPとFは共存できる。



同じN型は、共存できない。

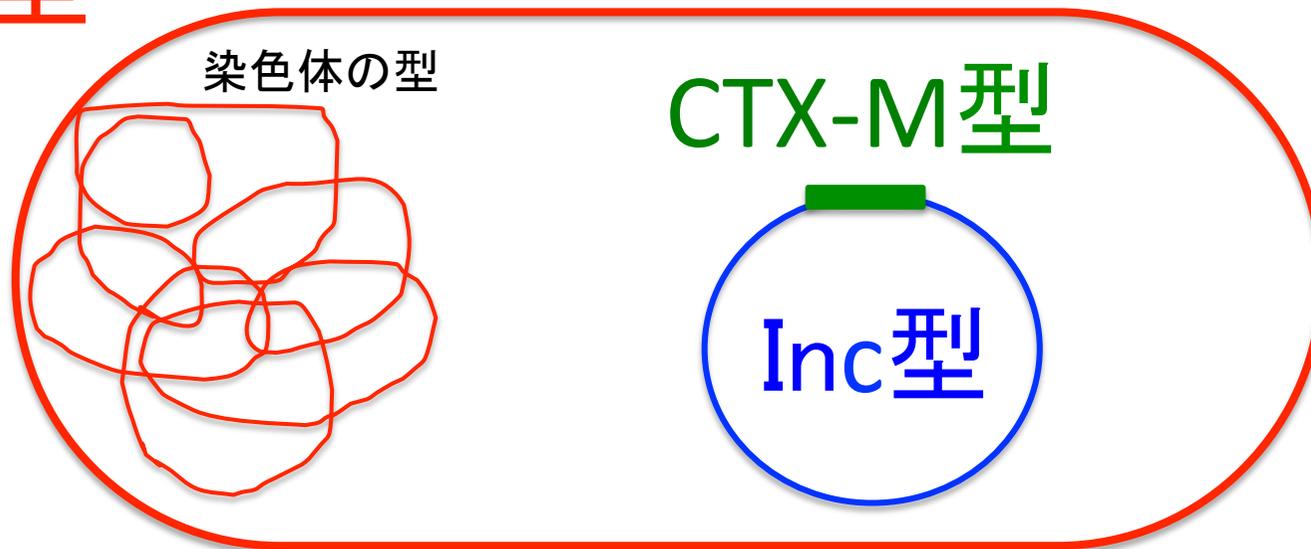
細菌の菌株の遺伝子型

ST型



薬剤耐性菌を型別する3つのレベル

ST型



家畜および食品からのESBL産生大腸菌の分離
および、細菌学的、遺伝的解析

以下に、研究体制を示す。

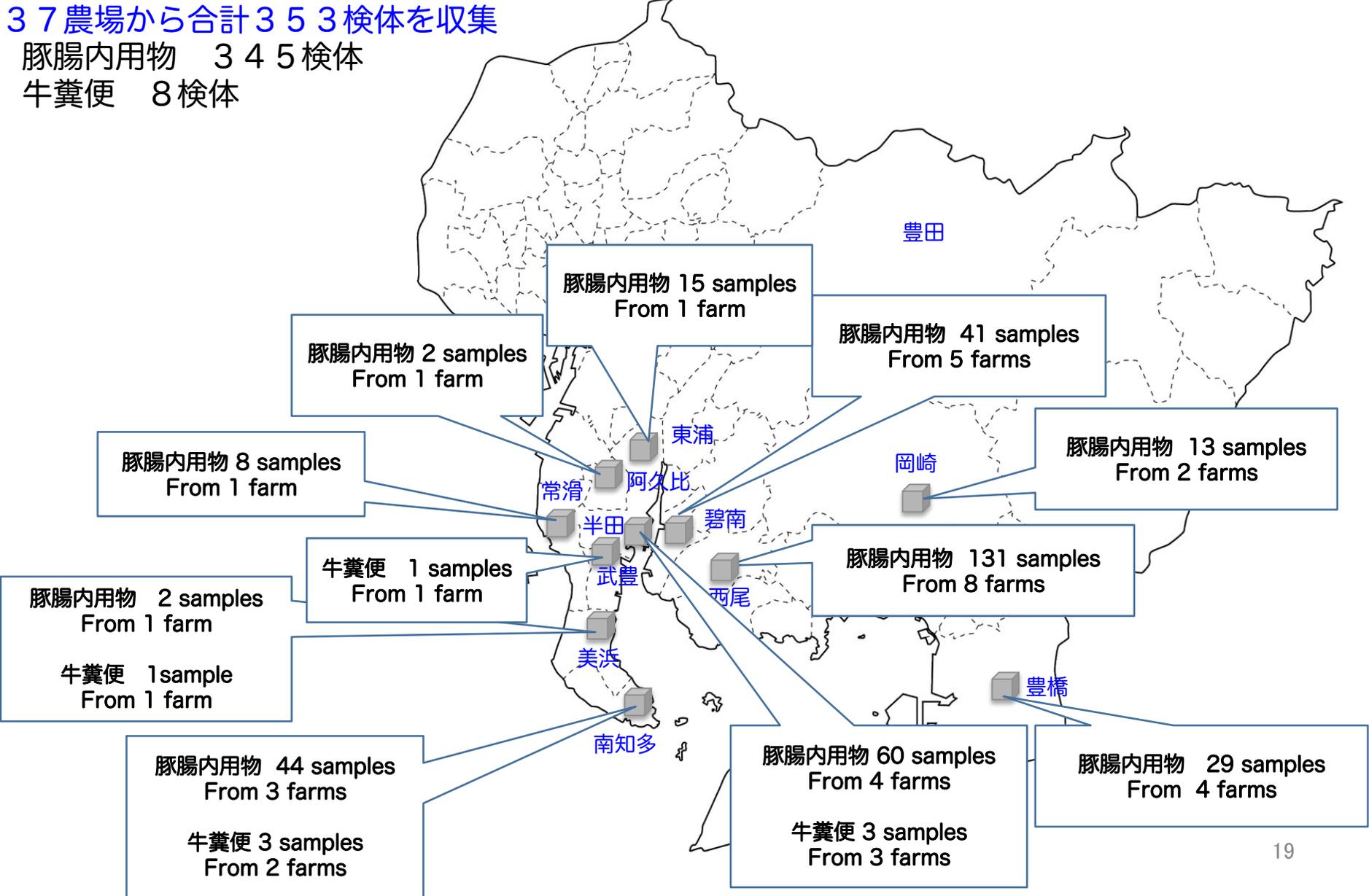
研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
検体収集	1) 家畜の腸内容物の収集	鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）
	2) 小売り肉の収集	川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科）
薬剤耐性菌の 選択分離・同定	1) 薬剤耐性菌の選択分離	川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科） 鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）
	2) 菌種同定	長野則之（信州大学大学院医学系研究科） 荒川宜親（名古屋大学大学院医学研究科）
薬剤感受性試験	1) β -ラクタム薬の最小発育阻止濃度測定	荒川宜親（名古屋大学大学院医学研究科）
	2) アミノグリコシド、キノロン系薬の最小発育阻止濃度測定	川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科）
	3) その他の抗菌薬の最小発育阻止濃度測定	長野則之（信州大学大学院医学系研究科）
薬剤耐性遺伝子の型別	1) β -ラクタム系、アミノグリコシド系、キノロン系に薬剤耐性を付与する遺伝子の型別	荒川宜親（名古屋大学大学院医学研究科）
	2) その他の抗菌薬に対する薬剤耐性遺伝子の型別	長野則之（信州大学大学院医学系研究科）
薬剤耐性遺伝子の比較ゲノム解析	薬剤耐性遺伝子及び伝達性プラスミドの比較ゲノム解析	荒川宜親、川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科） 鈴木匡弘（愛知県衛生研究所） 長野則之（信州大学大学院医学系研究科）

愛知県内の養豚農家の分布と採取した検体数 (半田駐在検査室の協力)

収集期間：2015年6月16日～2016年4月23日

37農場から合計353検体を収集

豚腸内用物 345検体
牛糞便 8検体

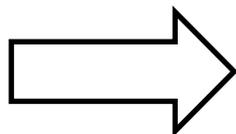


豚腸内容物からのESBL産生性菌の分離方法

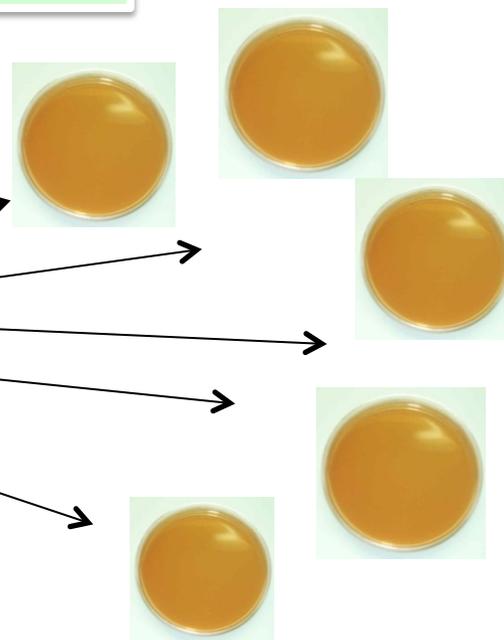
と畜場で採取した



腸内容物サンプル

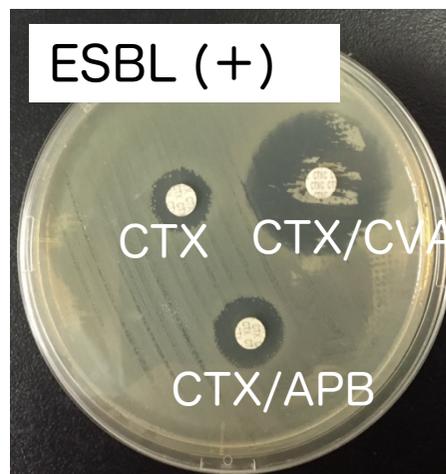


MacConkey 寒天培地
(CTX 1 $\mu\text{g/ml}$ を含む) に接種



Mac寒天培地から
5コロニー選択し、
DHL寒天培地にて純培養

-
- ・ ESBL確認試験
 - ・ 菌名同定 (VITEK MS)
 - ・ *E. coli* POT
 - ・ PFGE/PCR



長野県内で購入した市販鶏肉のデータ

鶏肉の購入店名、パック数、および部位別検体数

鶏肉
(n=150)
17店舗

購入店

パック数

A店	20
B店	10
C店	10
D店	10
E店	10
F店	5
G店	10
H店	2
I店	9
J店	10
K店	5
L店	5
M店	11
N店	8
O店	8
P店	8
Q店	9

全 体

鶏肉部位	検体総数
もも肉	37
むね肉	24
もも挽肉	6
むね挽肉	13
ささみ	11
手羽	31
爪	8
皮	9
はらみ	1
軟骨	7
せせり	1
卵巣	1
鶏ガラ	1
計	150

愛知県内で購入した市販鶏肉のデータ

鶏肉の購入店名および産地と部位名

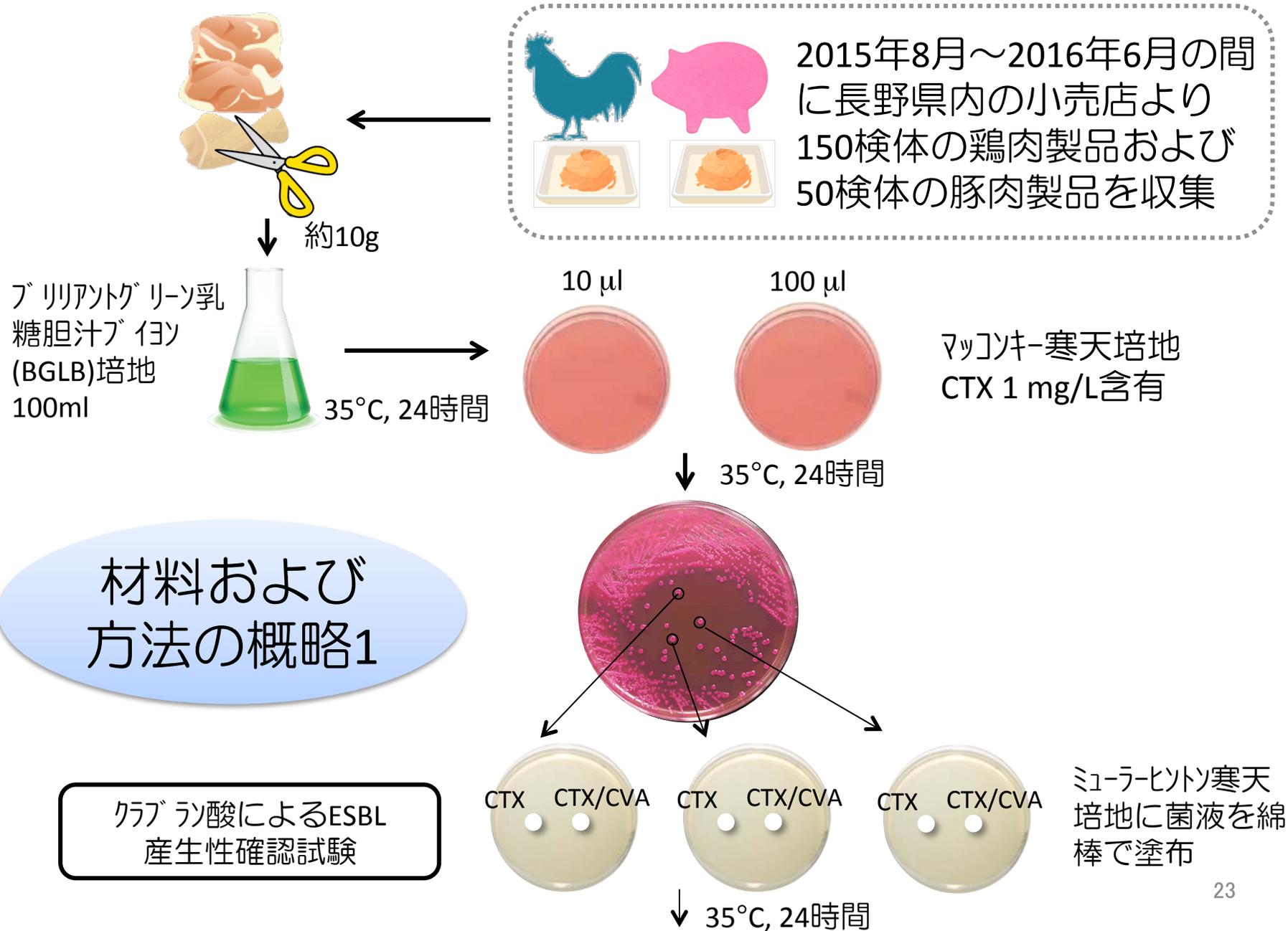
購入場所	産地	部位
a店	徳島	もも
a店	宮崎	もも
a店	宮崎	血肝
b店	愛知	もも挽肉
b店	愛知	ささみ
c店	三重	血肝
d店	愛知	挽肉
d店	愛知	むね
d店	愛知	ナンコツ
a店	徳島	ささみ
a店	宮崎	もも
e店	鹿児島	むね
c店	三重	もも
f店	宮崎	むね
g店	岐阜	血肝
h店	静岡	血肝
i店	北海道	むね
j店	徳島	もも
f店	宮崎	むね
j店	愛知	ささみ
j店	佐賀	もも
j店	ブラジル	もも

c店	三重	ささみ
b店	愛知	血肝
b店	愛知	もも挽肉
a店	宮崎	もも
a店	徳島	むね
k店	ブラジル	もも
l店	タイ	ナンコツ
l店	愛知	ささみ
l店	佐賀	ささみ
l店	愛知	もも
b店	愛知	もも
b店	愛知	ささみ
b店	愛知	もも挽肉
c店	三重	手羽中
m店	岐阜	ささみ
a店	宮崎	手羽中
a店	徳島	もも
k店	ブラジル	もも
j店	愛知	むね
j店	佐賀	むね
j店	愛知	手羽元
j店	愛知	ささみ
j店	佐賀	むね挽肉
k店	ブラジル	もも

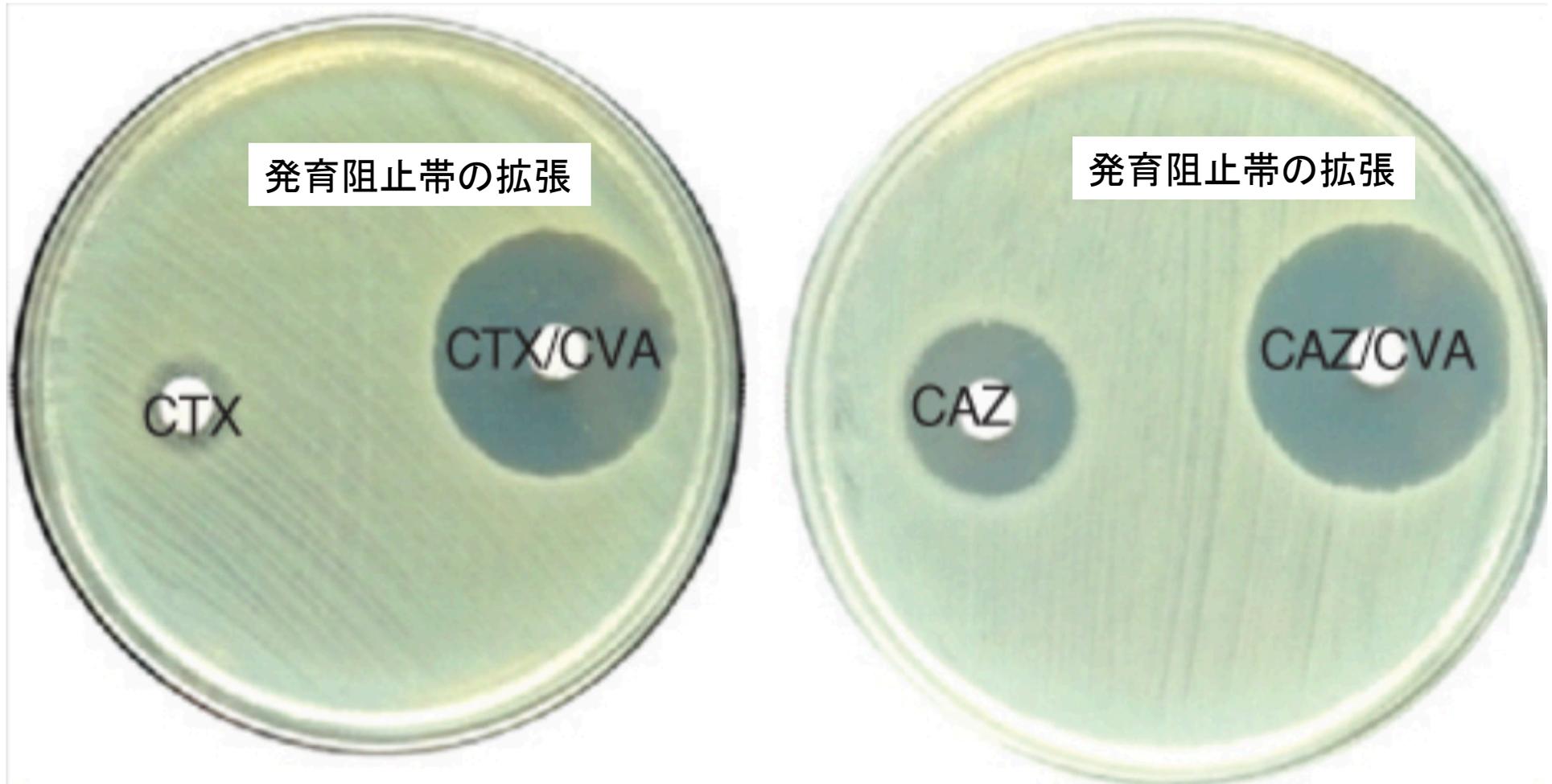
全 体

部位名	検体数
ささみ	9
血肝	5
手羽中	2
手羽元	1
ナンコツ	2
挽肉	1
むね	8
むね挽肉	1
もも	14
もも挽肉	3
合計	46

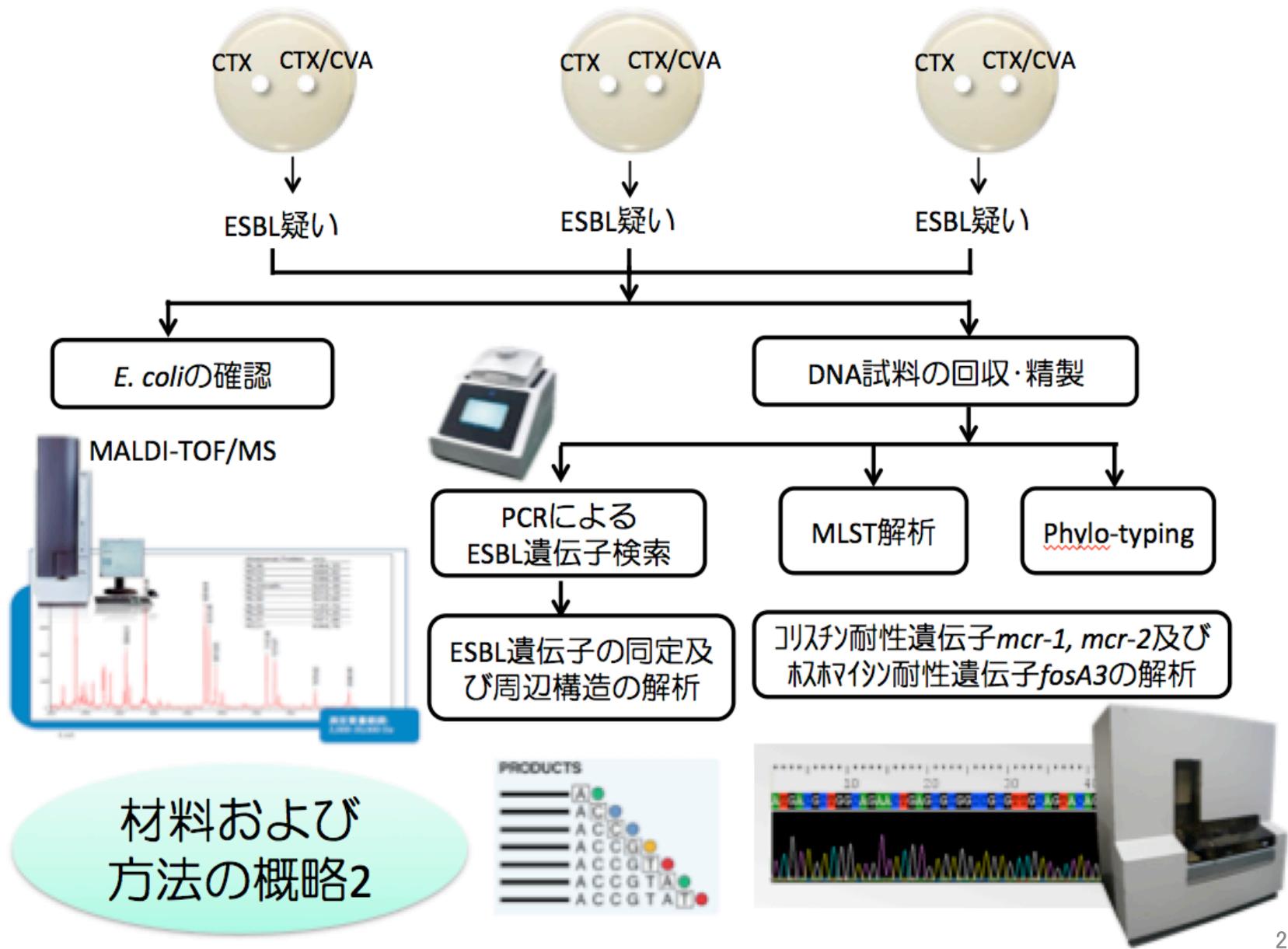
市販肉等からのESBL産生性菌の分離方法



ESBL産生株の見極め方法



ESBL産生株の詳しい分子疫学解析の流れ



分離された耐性株の分子疫学解析の方法

- ◆ ESBL産生大腸菌のスクリーニング及び確認試験
- ◆ ESBL関連遺伝子のタイピング
- ◆ 系統発生群 (Phylogenetic group)の分類
- ◆ プラスミド Replicon typeの同定
- ◆ Multi-Locus Sequence Typing (MLST)
- ◆ PCRによるO25bの同定
- ◆ CLSI勧告法による薬剤感受性試験 (寒天平板希釈法)
- ◆ 薬剤耐性遺伝子の保有を検索

(*floR*, *fosA3*, *fosC2*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrA*, *qnrB*)

家畜および食品から分離された ESBL産生大腸菌の解析結果

長野県内で購入した市販豚肉50件のデータ

豚肉の購入店名およびパック数

	購入店	パック数	購入店	パック数
豚肉 (n=50) 9店舗	H店	3	F店	5
	K店	5	O店	6
	L店	5	P店	7
	M店	6	Q店	6
	N店	7		

特記事項：市販豚肉50検体からは、ESBL産生株は検出されず

市販豚肉から分離されたESBL産生株以外の菌種
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Proteus vulgaris</i>

長野県食肉公社より収集した豚腸内容物10件のデータ

豚腸内容物10検体からは、ESBL産生株は検出されず

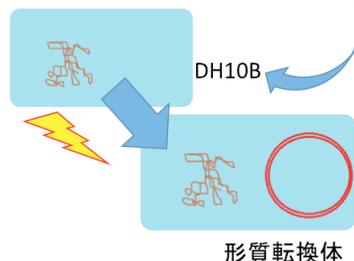
豚腸内容物から分離されたESBL産生株以外の菌種	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
<i>Citrobacter freundii</i> complex	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Pseudomonas otidis</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析の方法

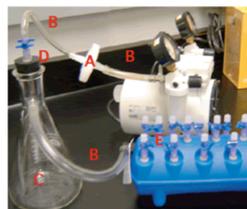
①糞便検体から分離したESBL産生菌のプラスミド抽出 (Kado変法)



②*E. coli* DH10Bへプラスミド導入、形質転換体作製

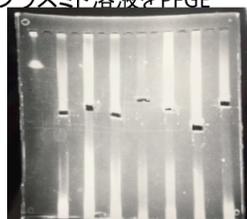


③形質転換体からプラスミド抽出



Kit:
Promega
pureyield midiprep

④プラスミド溶液をPFGE



⑤ゲル抽出によるプラスミド精製
⑥蛍光定量法にて濃度確認



Qubit 蛍光光度計

⑦DNAサンプルの調製

Nextera XT DNA Sample Prep Kit
+Nextera Index Kit

⑧最終サンプルの確認

サンプル断片長 (Agilent 2100 バイオアナライザ)
サンプル定量 (Qubit)



⑨シーケンス

Miseq Reagent Kit Nano v2(500 cycle)
250bp×2 (500 Mb)

⑩解析 (愛知県衛生研究所)

NGS解析に使用したプラスミドのタイプと数

動物種	Plasmid type	株数
ヒト	Incl1	33
	IncF	18
	IncK	1
	UT	6
	解析できず	2
鶏	Incl1	27
	Incl2	1
	IncF	5
	解析できず	1
豚	Incl1	2
	IncF	2
	IncFIB/FIC/N	1
	IncN/FIB	2
	解析できず	2

動物種	Plasmid type	株数
牛	Incl1	3
	解析できず	1
犬	Incl1	1
	解析できず	1
合計		109

プラスミドの系統ネットワーク解析

- プラスミドの系統解析法は確立されていない
- プラスミドの系統解析は組換えを考慮する必要がある
- したがってプラスミドの系統解析は、単なる「系統樹」とはならないと予想される
- そこで「系統ネットワーク」解析を試みた

目的

- プラスミドの系統解析を行うことで、ヒトと動物間のプラスミド移動頻度を求める
1. 公開データベース上のプラスミドデータ収集
 2. 分離したプラスミドの解析
 3. プラスミドの系統解析法検討

プラスミドが「ヒト型」か「動物型」の判定を目指す

仮定

- 耐性遺伝子 ($bla_{\text{CTX-M}}$) はプラスミドの伝達と共に移動
多くの場合はクローナルな伝播？
- プラスミドに元の宿主を示唆する特異的な特徴が残る
- プラスミドを構成するORFはそれぞれの系統を反映する
- プラスミドをヒト由来あるいは動物由来ORFの集合体ととらえることで、プラスミド全体としてヒトあるいは動物のどちらに近いかが推定できる可能性がある

材料および方法

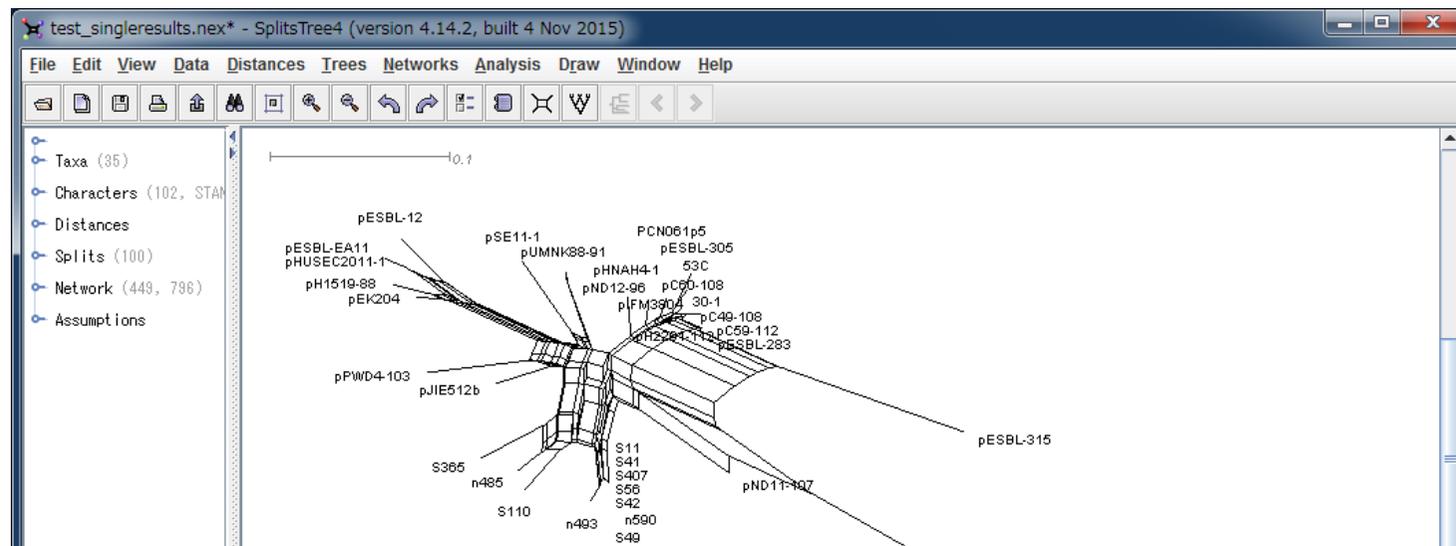
- プラスミドの由来動物の検討（由来動物スコアの計算）
- ORF保有パターンによる系統ネットワーク解析

- Incl1 plasmid 124個
 - 独自解析 65個、データベース 59個
- IncF plasmid 110個
 - 独自解析 28個、データベース 82個

系統ネットワーク描画(SplitsTree4)

Mol. Biol. Evol. 23:254-267 (2006)

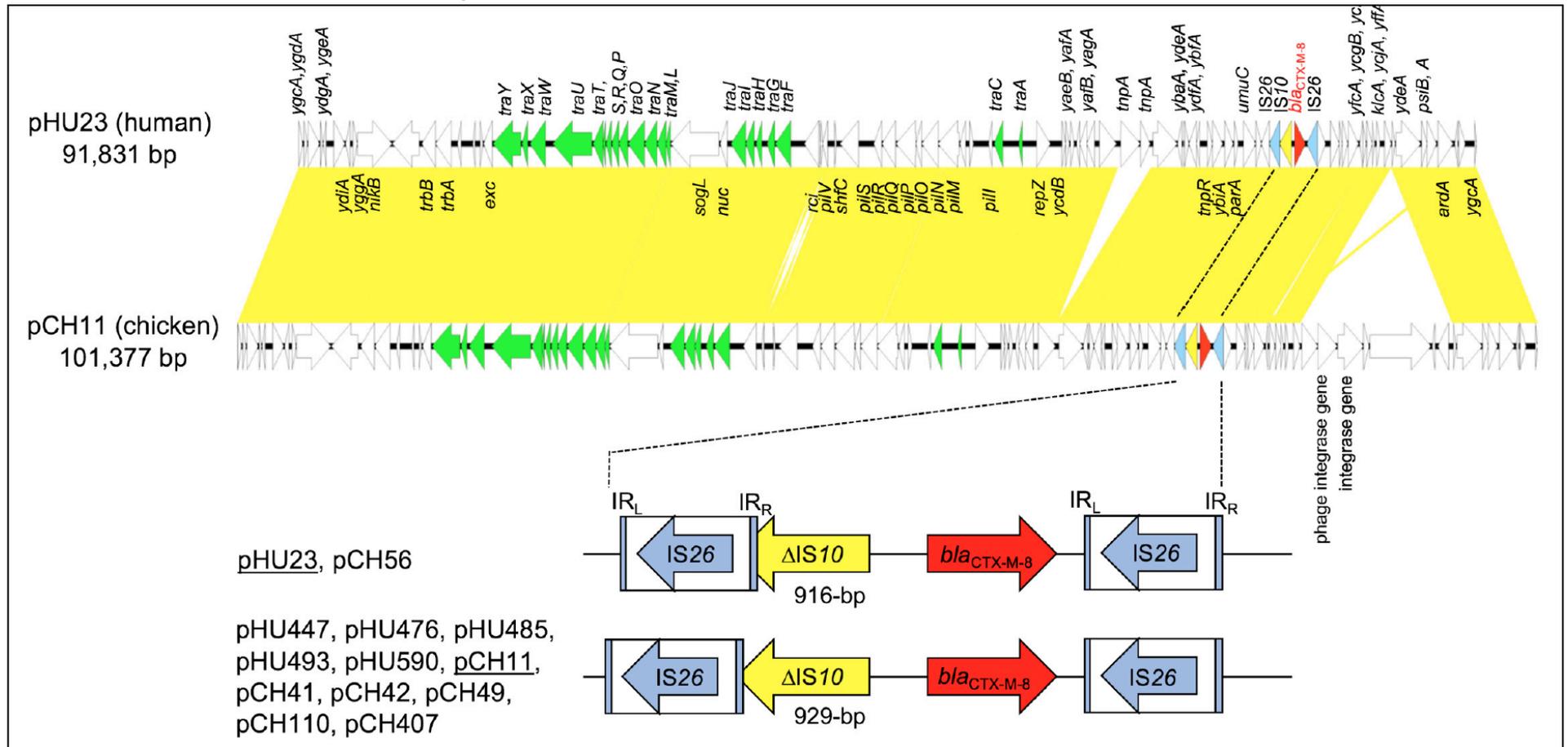
<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/splitstree4/welcome.html>



Description (from SplitTree4 web site)

SplitsTree4 is the leading application for computing unrooted phylogenetic networks from molecular sequence data. Given an alignment of sequences, a distance matrix or a set of trees, the program will compute a phylogenetic tree or network using methods such as split decomposition, neighbor-net, consensus network, super networks methods or methods for computing hybridization or simple recombination networks.

ヒトおよび市販鶏肉(ブラジル産)から検出された CTX-M-8/Incl1プラスミドの比較解析結果



国内のヒト由来の6個のCTX-M-8/Incl1プラスミドは、いずれも2010年に愛知県岡崎市で食品を取り扱う業務に従事する健常者より個別に分離された株に由来する。

一方、市販鶏肉から得られた7個のCTX-M-8/Incl1プラスミドは、いずれも2010年に愛知県内で市販されていたブラジル産の市販鶏肉から分離された大腸菌に由来する。



CTX-M-8/Incl1 plasmidsは、ヒトおよびブラジル産鶏肉由来株とも、構造が高度に類似しており、両者の起源の強い関連性が示唆された。(由来が同じ)

37

長野県内で分離されたESBL産生かつ*mcr-1*陽性株の基本情報

ESBL産生*E. coli* 70株中、国産若鶏むね肉由来の1株 (SU43-1)で*mcr-1*保有確認

a. ESBL産生*E. coli* SU43-1について

- ✓ コリスチンのMICは8 µg/mL
- ✓ Inc I17プラスミド上に*bla*_{CTX-M-1}保有
- ✓ MLST解析でST1684
- ✓ Phylogroup Aに属する
- ✓ 毒性関連遺伝子*fimH*及び*iutA*保有
- ✓ 二成分制御系のPmrAにコリスチン耐性株で報告されているSer144Glyのアミノ酸置換が認められた

b. *mcr-1*遺伝子について

- ✓ Inc I27プラスミド上に保有
- ✓ *nikB-mcr-1-pap2-ydfA-topB* 領域の塩基配列は中国の豚糞便由来*E. coli*が保有するIncI2 plasmid pECJS-61-63 と類似していた

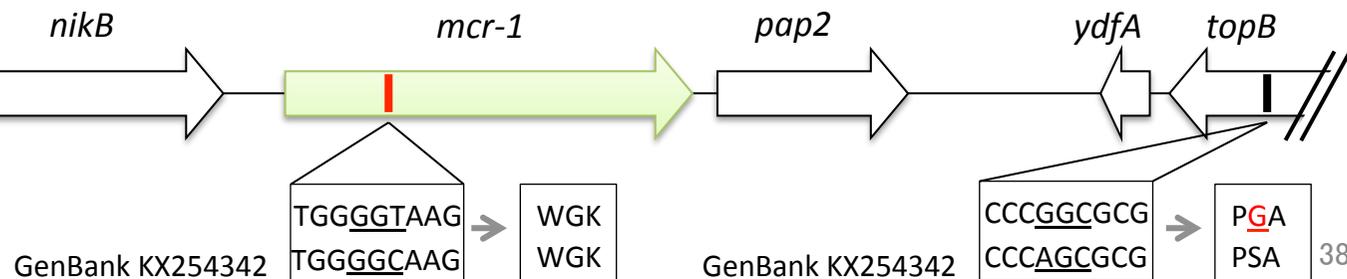
各種抗菌薬のMIC

Antimicrobials	MIC(µg/mL)
ampicillin	>16
amoxicillin/clavulanate	≤8/4
piperacillin	>64
cefazolin	>16
cefotiam	>16
cefotaxime	>32
ceftazidime	≤1
cefepodoxime	>4
cefoperazone/sulbactam	≤16/8
cefpime	>16
cefmetazole	≤4
aztreonam	16
flomoxef	≤8
imipenem	≤1
gentamicin	≤1
amikacin	≤4
minocycline	4
levofloxacin	≤1
fosfomycin	≤4
sulfamethoxazole/trimethoprim	≤2/38
colistin	8

IncI2 plasmid

in this study

GenBank LC191581



今回の研究で、比較ゲノム解析を実施した結果明らかになった点

1. CTX-M遺伝子を取り込みやすいプラスミドが存在し、多くのCTX-M型ESBLの遺伝子を媒介するプラスミドは、CTX-M-型毎にクローナルに拡散している傾向が見られた。特に、CTX-M-8やCTX-M-1グループを担うIncl1プラスミドにその傾向が強い。
2. ヒトで多いCTX-M-15を担うIncl1プラスミドは、ヒトで多く検出され、データベースに登録された情報からも家畜からは稀にしか検出されないことから、CTX-M-15を担うIncl1プラスミドは、ヒトの臨床現場で出現した可能性が示唆される。
3. ヒトで多く報告のあるCTX-M-14を担うIncl1プラスミドは、ヒトと家畜/食肉双方で検出されるが、その起源や伝播の方向性ははっきりしない。
4. ヒトで多く報告のあるCTX-M-27を担うIncFプラスミドは、データベース上も家畜や食品からは稀であり、ヒトで出現した可能性が高い。また、Incl1プラスミドの中にはCTX-M-27を媒介するものは確認なかった。
5. 薬剤耐性遺伝子を媒介することが多いIncFプラスミドは、組み替えを起こしやすいため、多様性がみられ、それらの間の遺伝的関連性を明らかにすることは可能であるが、家畜とヒトとの間での伝播の方向性を解析するのは現時点では難しい。
6. 薬剤耐性遺伝子のヒトと動物との間の伝播を評価する手法や指標については、菌株レベルではなく、プラスミドおよび転移性遺伝因子 (mobile genetic element) レベルで詳細な比較が可能な、新しい解析アルゴリズムの作成と評価指標など、さらなる検討が必要。³⁹

今回の研究成果の活用法の可能性について

1. 今回の調査で、国内で市販されている鶏肉については、かなりの頻度でESBL産生大腸菌により汚染されていることが再確認されたため、食鳥処理の工程の衛生管理の改善や技術的向上の必要性を説明する際の根拠として利用可能と考えられる。
2. 今回解析した、109個のESBLの遺伝子と1個のMCR-1の遺伝子を媒介する合計110個のプラスミドの塩基配列データは、DDBJなどの公開されているゲノムデータベースや国立感染症研究所の病原体ゲノムデータベースなどに登録し、今後、国内で家畜や食肉等から分離された菌株の保有する同様のプラスミドの比較解析をする際に対照などとして活用する。
3. 国内で市販されている生産地不明の鶏肉よりセファロスポリン耐性大腸菌が分離された際に、プラスミドデータを詳しく解析することで、国産の鶏肉等で報告がほとんどないCTX-M-8遺伝子などを媒介するIncl1のプラスミドを保有していることが判明すれば、海外産である可能性が示唆されるなど、プラスミドのデータは鶏肉等の産地を推定するための指標として利用可能。
4. 今回の研究で家畜や食肉等から分離された菌株については、当方の研究課題と重ならない限り、それを必要とする研究者等に提供し、必要に応じて共同研究などを進め、さらなる詳しい解析に活用されることが想定される。
5. プラスミドの比較ゲノム解析に用いた系統ネットワーク解析ツールは、さらなる改良を加えた後、プラスミド解析に活用できるように希望者に提供する。
6. 今回のデータをもとに、家畜や食品から分離された薬剤耐性株のゲノムデータ(特に、プラスミドや転移性遺伝因子)について日常的に解析し、同時にゲノムデータの蓄積と管理を担当するための組織(部署)の設置と機能の充実の必要性について、リスク管理機関に提言するための根拠として活用可能と考えられる。

食品に対する乳児期のアレルギー性反応獲得メカニズムと発症リスク評価



木戸 博 (きど ひろし)

国立大学法人徳島大学 先端酵素学研究所 特任教授

1973年 3月 弘前大学医学部卒業
1977年12月 徳島大学大学院医学研究科博士課程修了
医学博士 (徳島大学)
1979年 1月 ロッシュ分子生物学研究所研究員
1981年 2月 徳島大学助手
1989年 5月 徳島大学助教授
1993年 7月 徳島大学教授
2013年 4月 徳島大学先端酵素学研究所 生体防御・感染症病態代謝研究部門
寄附講座特任教授 (現職)

(その他兼務等)

徳島大学疾患酵素学研究センター長 (2007-2011年)、全国附置研究所・センター長会議 第二部長 (2010-2011年)、International Proteolysis Society (President 2009-2011年、Vice President 2001-2005年)、日本生化学会 評議員、日本病態プロテアーゼ学会 理事、評議員、日本界面医学会 理事、評議員

<研究成果概要>

本研究では、IgEの抗原親和性測定法、母乳、血液、環境中のアレルゲン定量法、乳児食物アレルギーの発症機序の解析研究が実施された。研究には、微量検体で定量解析が可能なdensely carboxylated protein (DCP) アレイが用いられた。

IgEのアレルゲン親和性解析では、抗原の競合的結合阻害によるIC50値で親和性を表す方法が選択された。他の抗原親和性解析方法として、蛋白質の立体構造修飾試薬を用いる方法が知られているが、IgE抗体以外に抗原の立体構造にも影響するため、適切な方法ではないと判定した。母乳や環境中のアレルゲン濃度測定は、DCPアレイを用いたELISA法が確立された。しかし、血清中のアレルゲンは、IgGとの複合体形成が強固でアレルゲンの解離が困難なため定量測定が困難であった。食物アレルギーの発症機序解析では、2013 -2014年に生まれた乳児84名がプロジェクトに参加した。これらの乳児を対象に、卵白 (EW) や牛乳 (CM) 抗原に対する抗体産生を出生時から生後6か月まで、イムノグロブリンクラススイッチの視点で解析した。その結果、出生後から大量のCM抗原を摂取する人工栄養児では、生後2か月の早期にCM特異的IgG1とIgAの高濃度増加と、生後4か月のIgEとIgG2の増加を特徴とするクラススイッチ成熟過程 (Type1) が観察された。Type1では、低いIgE/IgG1比とIgG2産生を伴う低親和性IgE産生をバイオマーカーとして、経口免疫寛容に進むと示唆された。一方、母乳に微量に含まれるEWの感作を受ける母乳栄養児の場合、多くはゆっくりとしたクラススイッチ成熟でType1が進むが、IgG1増加が不十分な時に一部の乳児で湿疹による経皮感作を受けると、IgG2産生を伴わない高親和性IgE産生のクラススイッチ成熟過程 (Type2) が観察され、高いIgE/IgG1比と高抗原親和性IgEバイオマーカーとした食物アレルギーへのハイリスク者と推定された。



食品に対する乳幼児期のアレルギー性反応獲得 メカニズムと発症リスク評価

(課題番号: 1505)

徳島大学疾患酵素学研究センター
木戸 博

国立成育医療研究センター
大矢幸弘

**平成29年度食品健康影響評価技術
研究成果発表会
CO I 開示**

発表者名： 木戸 博

発表に関連し、開示すべきCO I 関係にある企業などありません。

(背景)

国民病としてのアレルギーを取り巻く現状と対策

現状

乳児の約20%に食物アレルギーやアトピーが見られ、中には小児期の喘息に発展する患者が見られる。成人の花粉症を含めると国民の約30%が何らかのアレルギーに罹患していることから、国民病とされている。

対策

(行政) アレルギー疾患対策基本法(H26年6月20日)

予防

1. アレルギー性反応獲得のメカニズムに関する研究と、予防と治療に関する最近の研究の目覚ましい進展

治療

2. アレルギー治療のための新規診断法が求められており、減感作療法の有効例と無効例を判別する早期診断が可能となった。

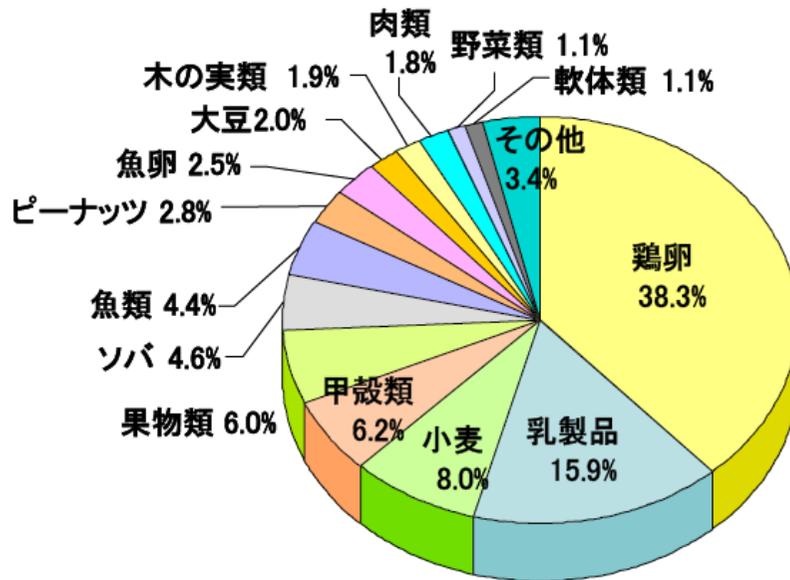
食物アレルギーの原因食品

特定原材料等
(表示義務)

卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに

(食品表示法)

《全年齢における原因食物》



(平成15年度厚生労働科学研究報告書より)

《年齢別主な原因食物》

	0歳 n=1270	1歳 n=699	2,3歳 n=594	4-6歳 n=454	7-19歳 n=499	20歳以上 n=366
No.1	鶏卵 62%	鶏卵 45%	鶏卵 30%	鶏卵 23%	甲殻類 16%	甲殻類 18%
No.2	乳製品 20%	乳製品 16%	乳製品 20%	乳製品 19%	鶏卵 15%	小麦 15%
No.3	小麦 7%	小麦 7%	小麦 8%	甲殻類 9%	そば 11%	果物類 13%
No.4		魚卵 7%	そば 8%	果物類 9%	小麦 10%	魚類 11%
No.5		魚類 5%	魚卵 5%	ピーナッツ 6%	果物類 9%	そば 7%
小計	89%	80%	71%	66%	61%	64%

[調査対象]

食物摂食後60分以内に何らかの症状が出現し、かつ医療機関を受診した患者

(今井孝成、海老澤元宏:平成14年・17年度厚生労働科学研究報告書より一部改変、
<http://www.allergy-ijp/kayumi/food-allergy/allergy-book/basic-02.html>)

“食品の安全確保”における現状と問題点

食の安全確保のために、食品衛生法関連法令(平成13年施行)



表示義務品目(7品目)	小麦、そば、卵、乳、落花生、えび、かに
表示推奨品目(20品目)	あわび、いか、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、やまいも、りんご、バナナ、いくら、カシューナッツ、ごま、もも、まつたけ、オレンジ、ゼラチン

現行の食品検査法(2段階検査)

検査法	判定	所要日数(例)
スクリーニング検査 (ELISA法)	定量	6(至急)~21営業日
確認検査 (ウエスタンブロット法) (PCR法)	定性	} 6~13日間
	定性	



ELISA法による検査

{(1例)(財)日本食品分析センター、<http://www.jfri.or.jp/item/allergens/allergens1.html>}

アレルギー医療革命

花粉症も食物アレルギーも治せる時代に!

NHKスペシャル取材班

アレルギーは
とにかく排除する?

予防のために
離乳食を遅らせる?

これらの“常識”は
すべて間違いでした!

妊娠中、授乳中の
母の食事が原因?

ほんとうのカギは免疫細胞Tレグ
予防と完治の
トビラが開いた!



文藝春秋刊
定価(本体1300円+税)

アレルギー医療革命、
その診断と治療を支える検査

1. クラススイッチのモニター
2. 抗原親和性の測定:
Low affinity IgE
High affinity gE

Natsume O, et al., Two-step egg introduction for preventing egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIR study): a double-blind, placebo-controlled, parallel-group randomized clinical trial.

Lancet 2017; 389: 276-286

講演の要点

1. 食物アレルギーの発症機序と経口免疫寛容の機序が解明されつつあり、食物アレルギーの予防法と治療法が明らかになってきた。
2. 高感度、低侵襲性の新しいアレルゲン検査法の開発によって、これまで明らかになっていなかった食物アレルギーと経口免疫寛容の違いが、具体的なバイオマーカーによって論ずることができるようになってきた。
3. 従来の血清学的アレルギー診断法は、アレルギーの原因物質の検索であったが、新規検査法の開発により、アレルギーの予防と治療のための診断法が明らかになってきた。



(問題提起)

大多数の乳幼児が獲得する経口免疫寛容と、一部の乳幼児に発症する食物アレルギーは、何がこの違いの原因になっているのだろうか。

(解決方法)

出生直後から授乳期の間食物アレルギーに対する体内免疫動態調査

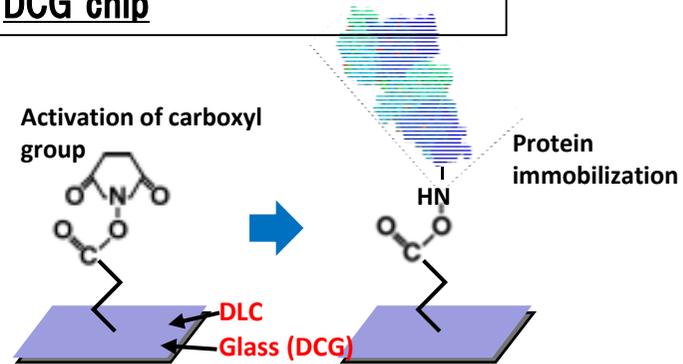
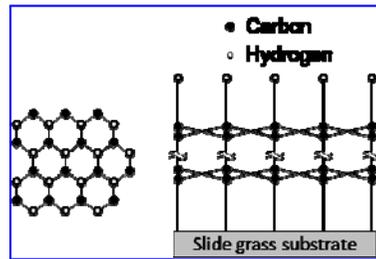
1. 高性能タンパクチップ: Densely Carboxylated Protein (DCP) Chip
2. イムノグロブリンクラススイッチから見た乳児期の経口免疫寛容と、アレルギー反応獲得のメカニズムと発症リスク評価

イムノグロブリンクラススイッチを
モニターする高性能タンパクチップ

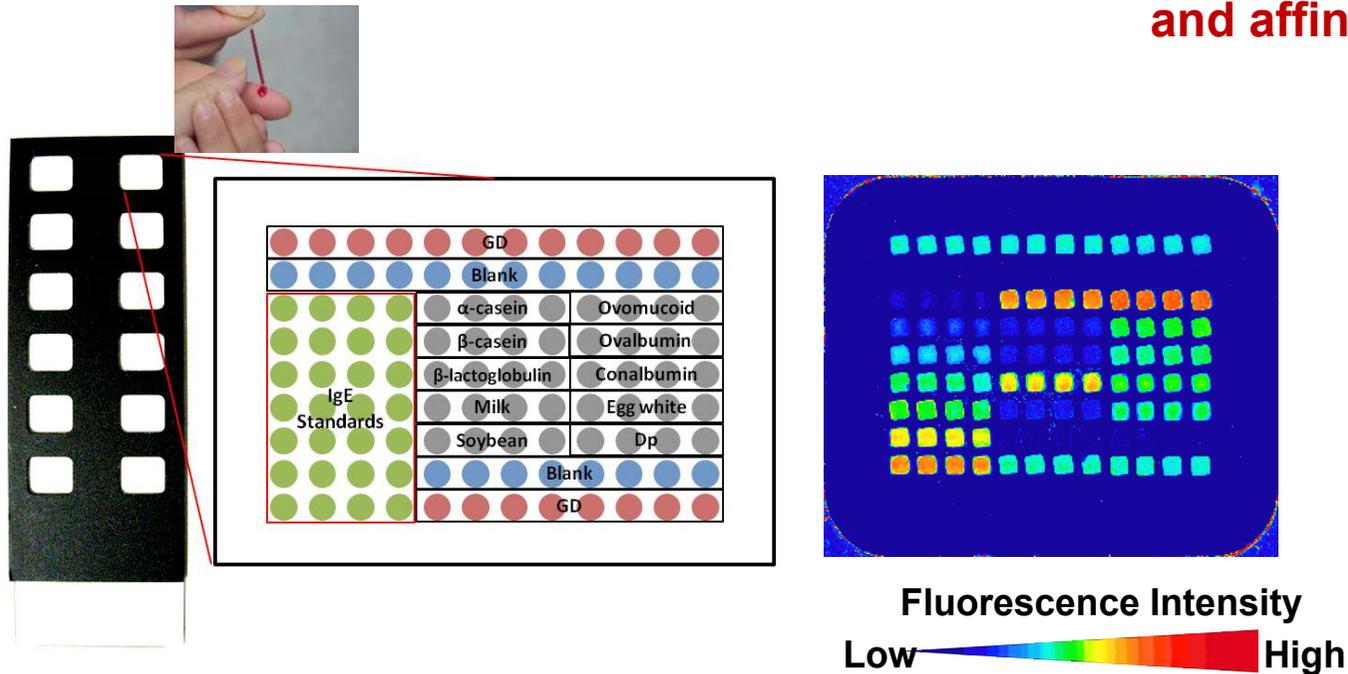
高性能タンパクチップとは？

Densely carboxylated protein chip: DCP chip

- Diamond-like carbon (DLC) coated and carboxylated chip : DLC chip
- Densely carboxylated glass slide chip: DCG chip



(B) Small amount of specimen (10-20 μ L) for multiple assays (class switching and affinity assays)



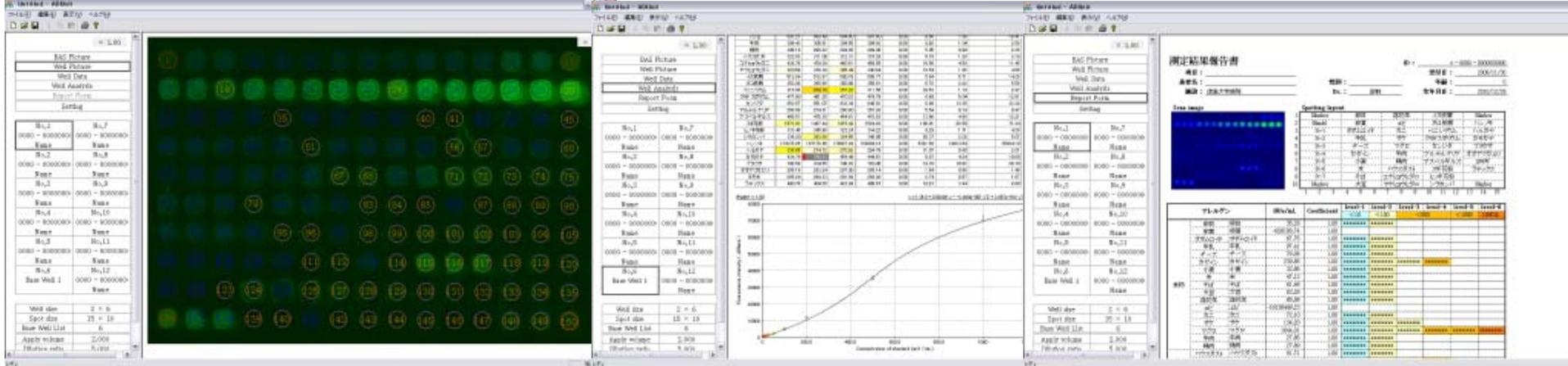
DCPアレルギー診断チップ



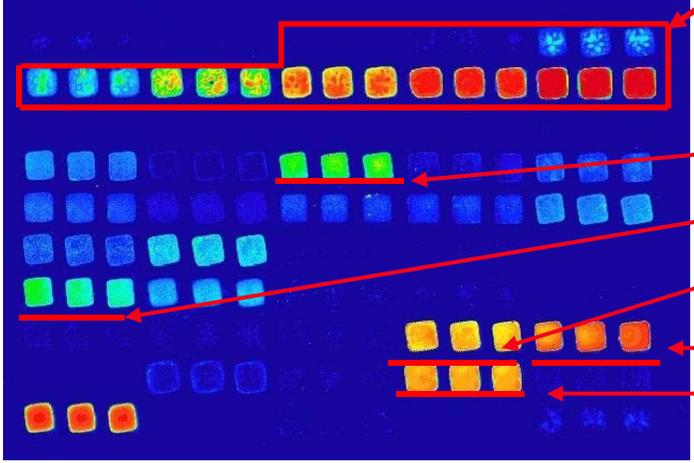
(測定)

(報告書)

Report



15 × 10 チップレイアウト (n=3)



- Human IgE Standard
50 ~ 20000 IU/mL
- 大豆
- 小麦
- オオアワガエリ
- 卵白
- 落花生

Marker	Buffer	St-1	St-2	St-3
St-4	St-5	St-6	St-7	St-8
カゼイン	サケ	大豆	マグロ	卵黄
牛乳	米	エビ	カニ	ハウスダスト
コナヒョウヒダニ	ヤケヒョウヒダニ	イヌ皮膚	ネコ皮膚	β-ラクトグロブリン
小麦	グルテン	グリアジン	スギ花粉	ヒノキ花粉
ハルガヤ	カモガヤ	ブタクサ	オオアワガエリ	卵白
	オボムコイド	そば	落花生	
Total IgE				Marker

DCPアレルギー診断チップの特徴

微量(低侵襲性)

多項目

臍帯血にも対応できる高感度化

超微量検体測定



10-20 μL の血清で

アレルギー特異的抗体(IgE, IgA, IgG, IgG1, IgG4)の
全測定が可能
1抗体検査当たり 15 μL (再検査分を含む)

血清 IgG



血清 IgE



血清 IgG1



血清 IgA



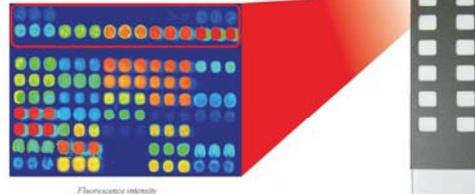
【血清以外の体液】

唾液 IgA



臨床研究(試験研究用)に最適化

インターナルスタンダード



Marker	Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
Eggwhite	Wheat	Strawberry	Don't know	Crab	Cider
Egg yolk	Chicken	Crab	Don't know	Crab	Don't know
Olive	Chicken	Salmon	Don't know	Don't know	Don't know
Milk	Rice	Tuna	Don't know	Don't know	Don't know
Casein	Beckhoof	Meat	Cat dander	Stagnant	Don't know
Chickpea	Soybean	Don't know	Don't know	Don't know	Don't know
Marker	Peasant	Don't know	Don't know	Don't know	Don't know

変動するアレルギーパターン情報の採取

食物抗原・吸入抗原・
Molecular Allergen(精製抗原)の
38抗原の同時搭載可能

検査項目

食物抗原

卵白
卵黄
牛乳
小麦
コム
ソバ
大豆
ピーナッツ
エビ
カニ
サケ
マグロ

吸入抗原

ハウスダスト
コナヒョウヒダニ
ヤケヒョウヒダニ
イヌ皮膚
ネコ皮膚
スギ
ヒノキ
シラカバ
ハンノキ
ハルガヤ
カモガヤ
ブタクサ
オオアワガエリ

Molecular Allergen(精製抗原)

オボムコイド Cry j1
オボアルブミン Der f1
カゼイン Der f2
 α -カゼイン Der p1
 β -カゼイン Der p2
 β -ラクトグロブリン Alt a1
グルテン Alt a6
グリアジン Cla h8
Ara h1 Asp r1

高感度測定

内部標準を同時搭載した高感度で正確な測定

Analytica Chimica Acta

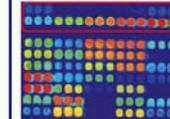
706 (2011) Pages 321-327

Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins

Koichi Suzuki*, Mineyoshi Hiyoshi*, Hitomi Tada*, Miwa Bando*, Takao Ichioka*, Norio Kamemura*, Hiroshi Kido**

* a Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan
** Pediatrics, Health Insurance Naruto Hospital, Tokushima 772-8503, Japan

インターナルスタンダード



Human IgE (Unit/V mL)	Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5	Std-6	Std-7	Std-8
S	50	100	500	1000	2000	5000	10000	20000

従来品に比べ、4-8倍の高感度化を達成。

血清濃度	本検査 (fluorescence units)				従来品			
	牛乳 α -カゼイン	鶏卵 α -カゼイン	小麦 α -カゼイン	大豆 β -カゼイン	牛乳 α -カゼイン	鶏卵 α -カゼイン	小麦 α -カゼイン	大豆 β -カゼイン
1.5	>1500	>1500	>1500	>1500	36.1	49.2	33.3	33.9
1.10	>1500	>1500	1366	1382	17.3	26.3	16.5	17.0
1.50	445.6	633.2	527.5	295.6	3.96	5.55	3.49	3.17
1.100	191.0	306.3	290.7	121.2	1.96	2.69	1.81	1.67
1.200	99.16	141.8	143.1	78.16	1.36	1.42	0.940	0.960
1.800	61.71	84.22	71.33	28.17	0.560	0.710	0.530	0.440
1.600	38.88	66.67	48.64	23.62	0.390	0.500	NEP*	NEP*
1.1200	21.80	41.56	25.06	12.59	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*
1.2400	10.63	25.17	19.07	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*
1.4800	NEP*	24.44	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*
1.9600	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*	NEP*

臍帯血中アレルギー特異抗体のスクリーニング例

Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volume 120, Issue 1, July 2012, Pages 113-121.e2

Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray

Norio Kamemura, MSc,* Hitomi Tada, MSc,* Naoki Shimojo, MD, PhD,* Yoshinori Morita, MD, PhD,*

Yoichi Kohno, MD, PhD,* Takao Ichioka, MD,* Koichi Suzuki, MSc,* Kenji Kubota, MSc,* Mineyoshi Hiyoshi, PhD,* and Hiroshi Kido, MD, PhD*

*Tokushima, Chiba, and Naruto, Japan

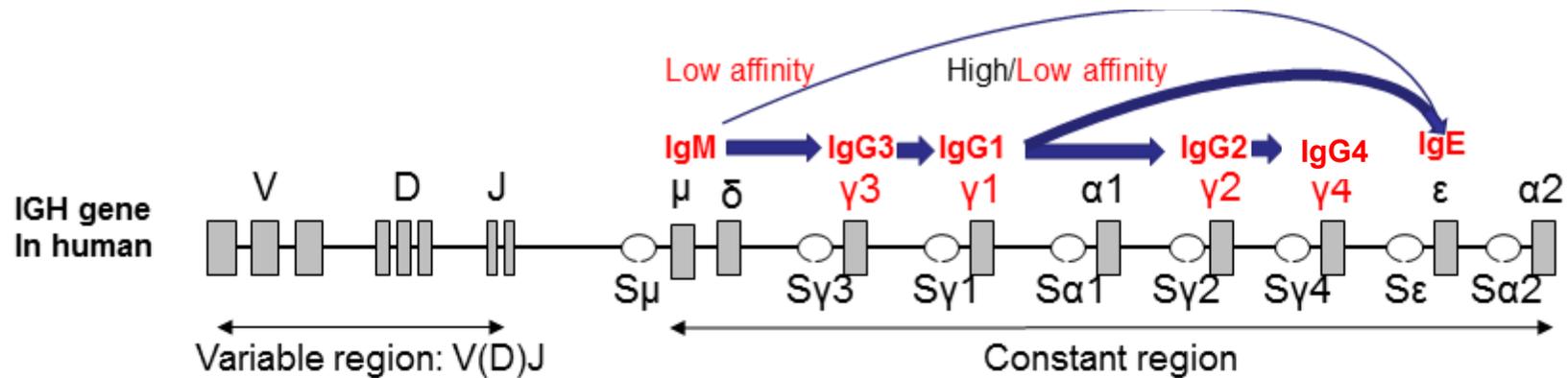
Low affinity IgE
の検出が可能

IgE抗体産生の初発段階に産生される Low affinity IgE の検出が可能で、アレルギー、アトピーの発症に関与する Low から High への変換をモニターできる。

予防に向けたバイオマーカーの可能性

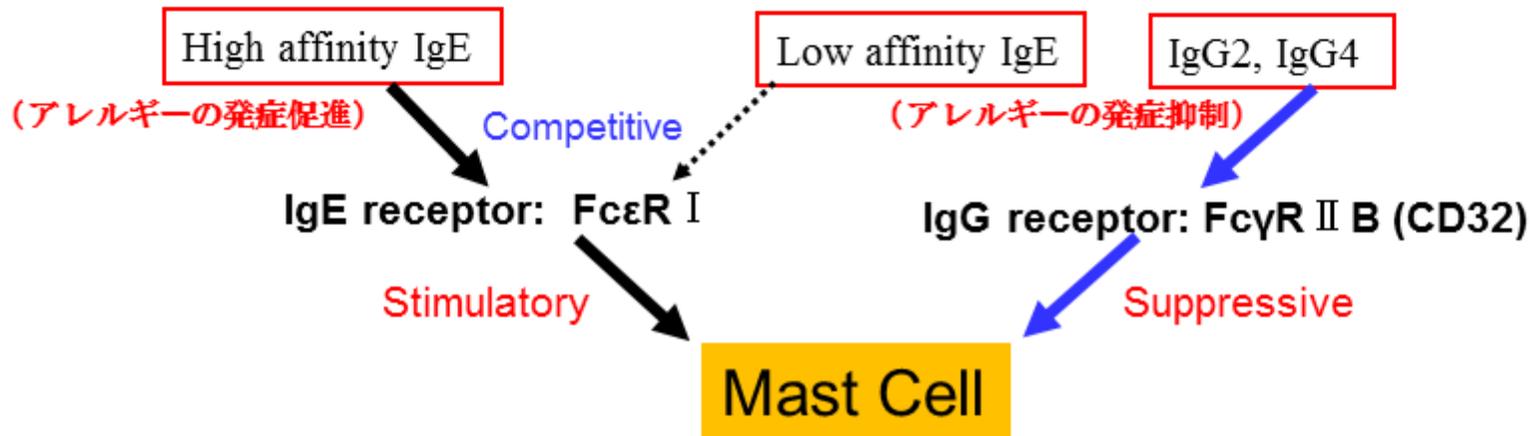
Ref: Kamemura N, et al. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J. Allergy Clin. Immunol.* Doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.034, 2013

イムノグロブリンクラススイッチとは？



(時間軸に沿ってクラススイッチが進む：次のeventを予測できる)

Sequential class switching and affinity maturation	IgM	IgG3	IgG1	IgG2	IgG4
Repeated antigen stimulation	→				
Somatic hyper Mutation (SHM)	+	++	+++	+++	++++
Affinity maturation	+	++	+++	+++	++++



授乳期の食物アレルギーに対する 免疫動態調査

食物アレルギーと経口免疫寛容の違いが、**具体的なバイオマーカー**によって論ずることができるようになってきた。

対象乳児の背景

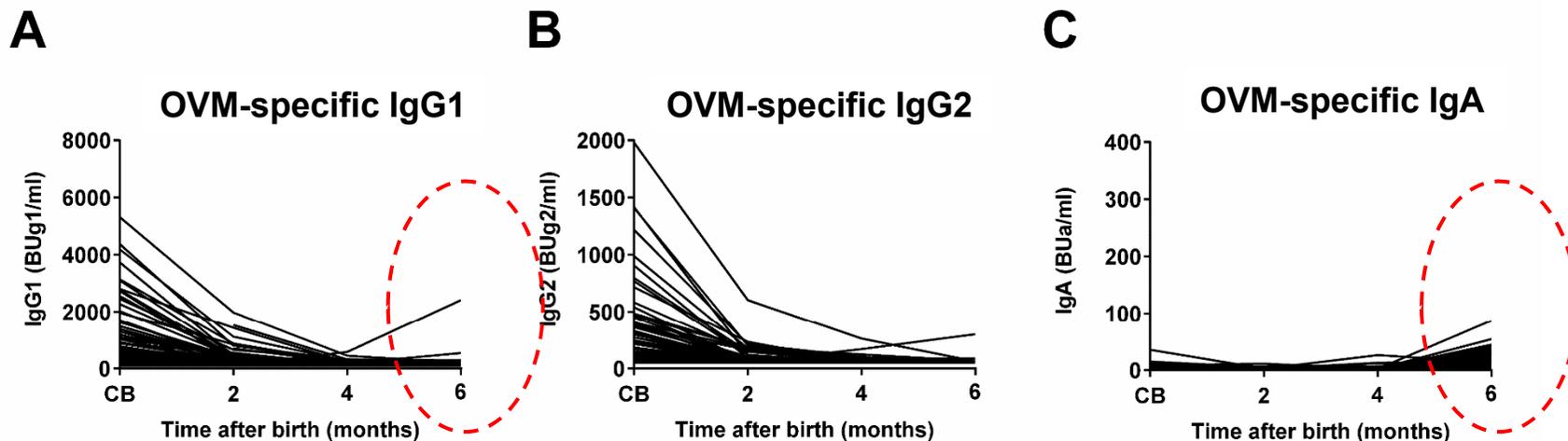
検体採取：臍帯血、2ヶ月齢、4ヶ月齢、6ヶ月齢

調査項目：卵、ミルク抗原特異的 IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4値とクラススイッチ

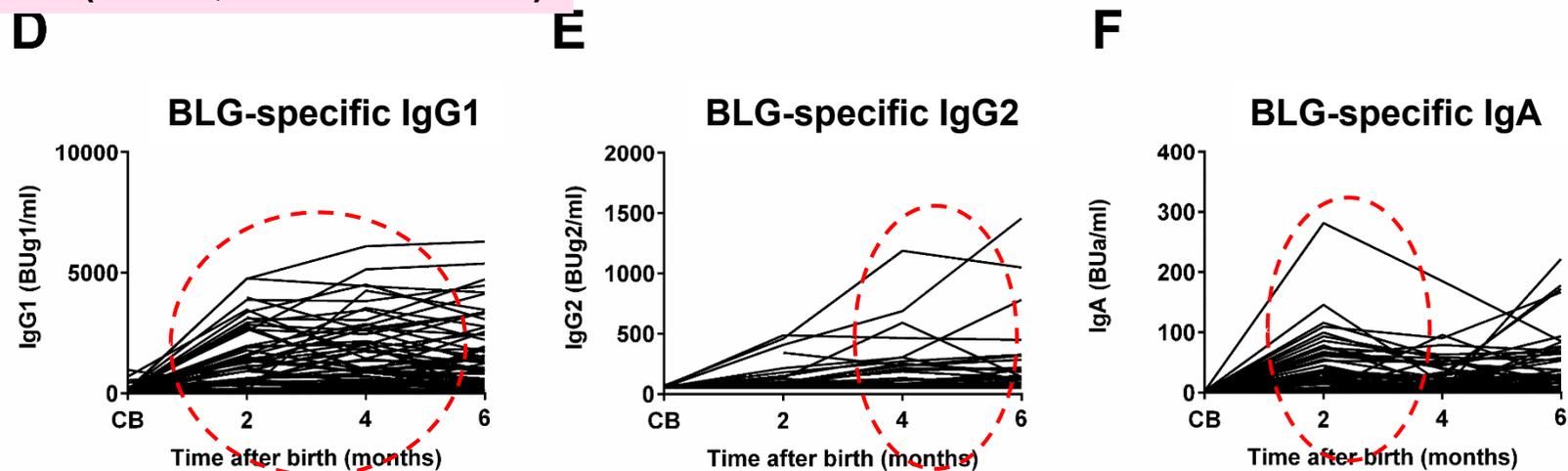
対象者	84人
性別	男児 42人(50%)
	女児 42人(50%)
栄養法	母乳栄養 31人(37%) 鶏卵アレルギー
	ミルクアレルギー 混合栄養 47人(56%) 鶏卵アレルギー
	ミルクアレルギー 人工栄養 6人(7%)
6カ月までの湿疹の有無	湿疹あり 42人(50%)
	湿疹なし 42人(50%)
両親のアレルギー疾患の有無	両方あり 29人(35%)
	父のみ 20人(24%)
	母のみ 20人(24%)
	両方なし 11人(13%)
	いずれかの回答なし 4人(5%)

母乳栄養と人工栄養で大きく異なるイムグロブリンクラススイッチのパターン

母乳栄養 ($n = 78$, 鶏卵アレルギー)



人工栄養 ($n = 53$, ミルクアレルギー)

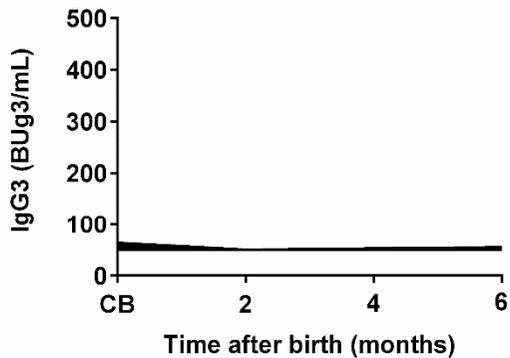


母乳栄養と人工栄養で大きく異なるイムグロブリンクラススイッチのパターン

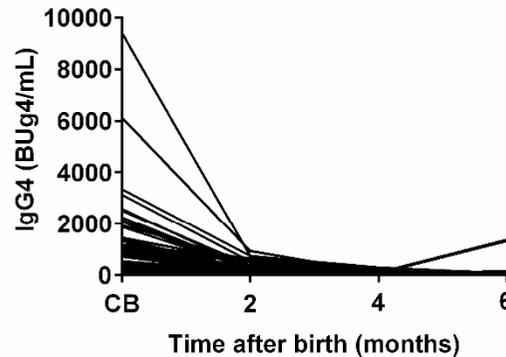


母乳栄養 (n = 78, 鶏卵アレルギー)

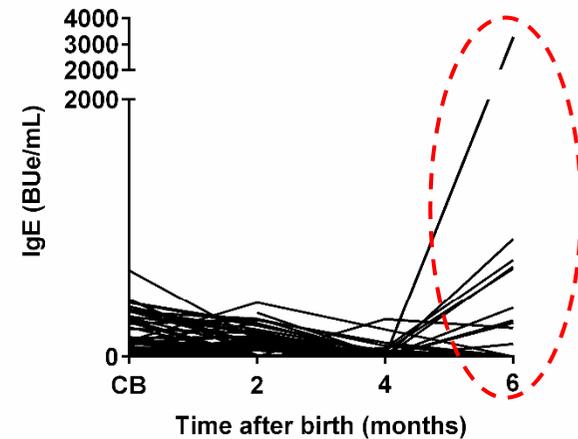
A OVM-specific IgG3



B OVM-specific IgG4

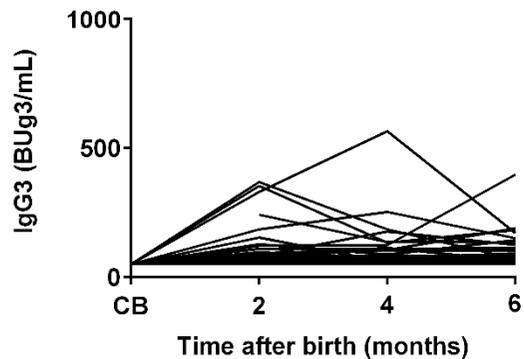


C OVM-specific IgE

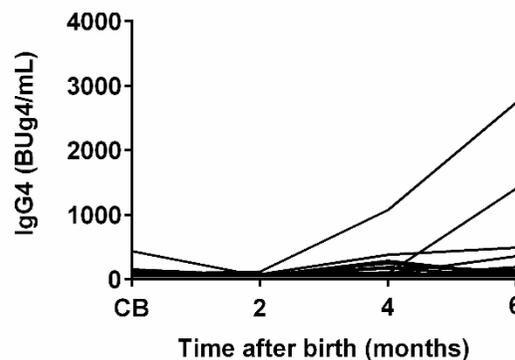


人工栄養 (n = 53, ミルクアレルギー)

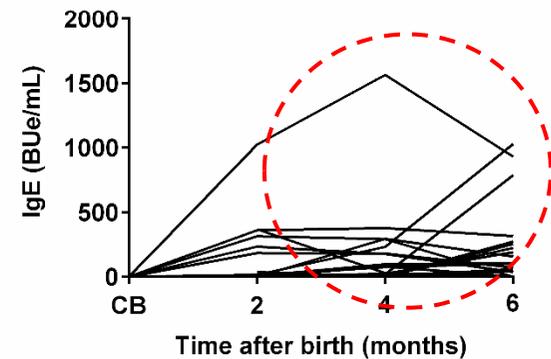
D BLG-specific IgG3



E BLG-specific IgG4

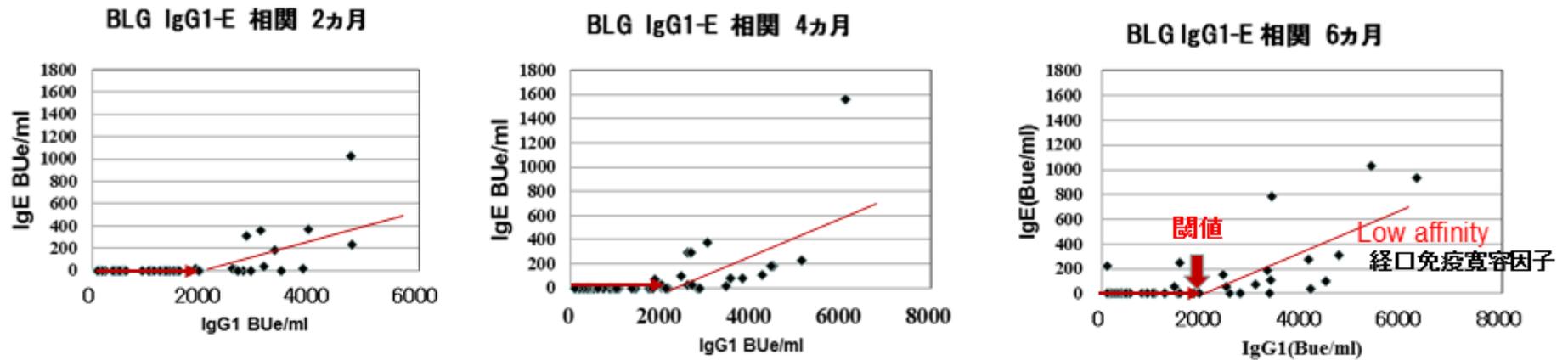


F BLG-specific IgE

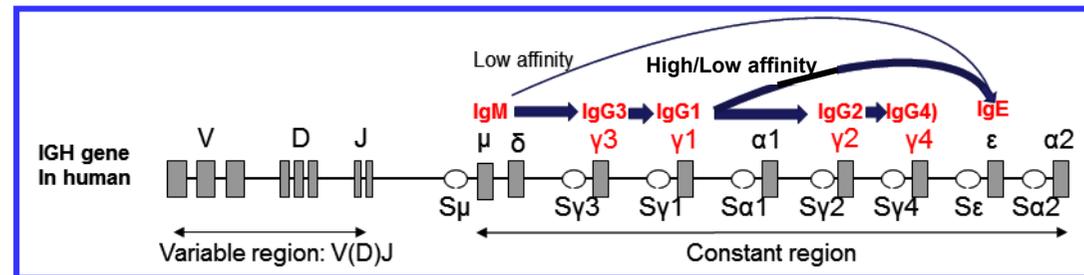
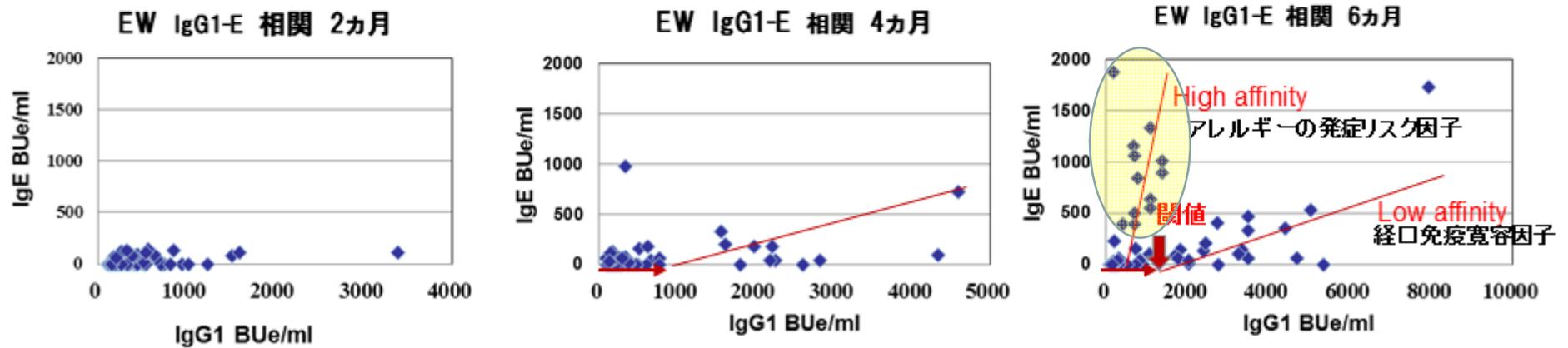


生後6ヶ月までに明らかになる鶏卵、ミルクアレルギーの経口免疫寛容とアレルギー発症因子

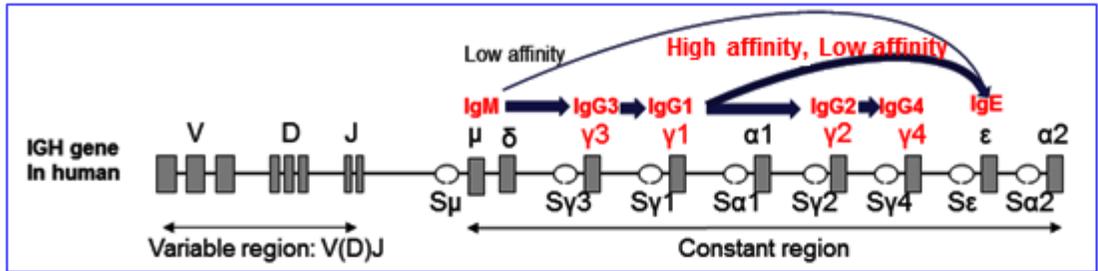
(BLG, beta-lactoglobulin: 人工乳由来)



(EW, egg white: 母乳由来)

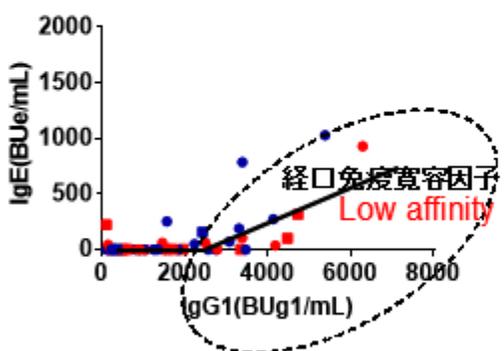


IgG1→IgE, IgG1→IgG2 クラススイッチと閾値

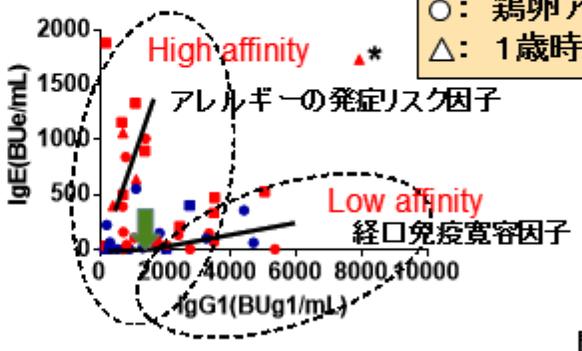


(生後6ヶ月時点でのデータ)

(A) IgG1/IgE class switching of beta-lactoglobulin

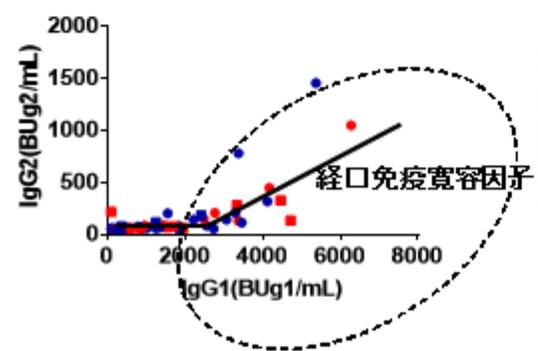


(C) IgG1/IgE class switching of Egg white

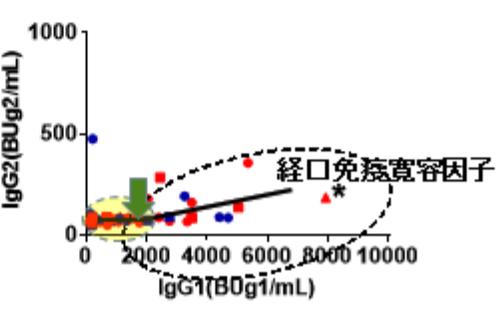


赤: 湿疹あり
 青: 湿疹なし
 □: 1歳時に鶏卵アレルギー無し
 ○: 鶏卵アレルギーなし
 △: 1歳時に鶏卵アレルギーと診断

(B) IgG1/IgG2 class switching of beta-lactoglobulin

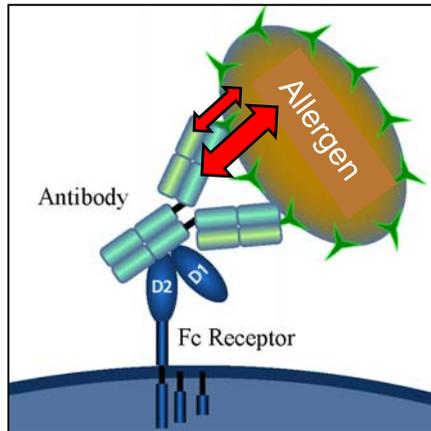


(D) IgG1/IgG2 class switching of Egg white

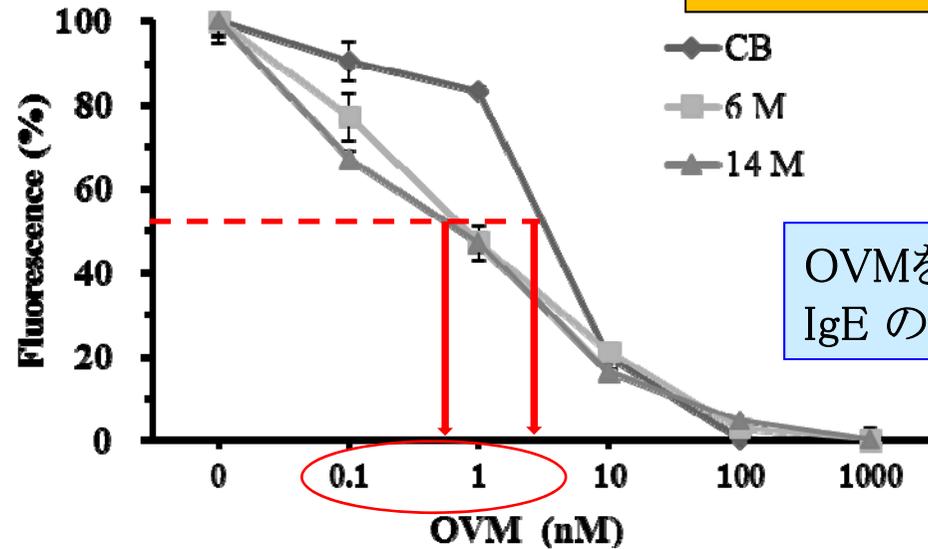


閾値
 ↓

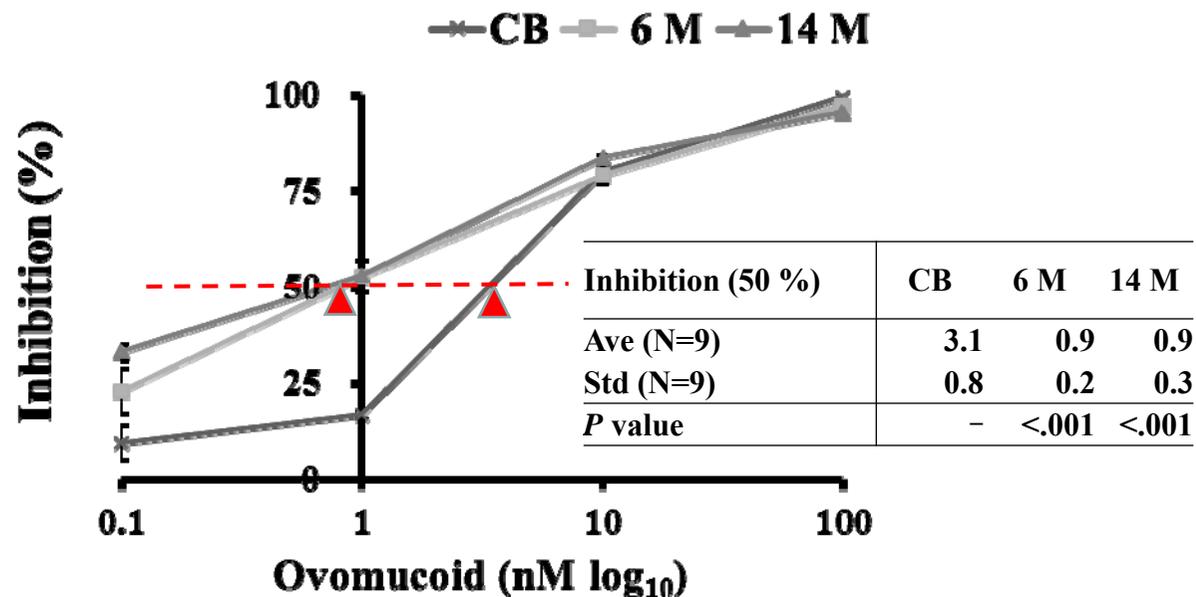
抗原特異的IgE親和性 (Affinity/Avidity) の測定



抗原による競合的結合阻害効果

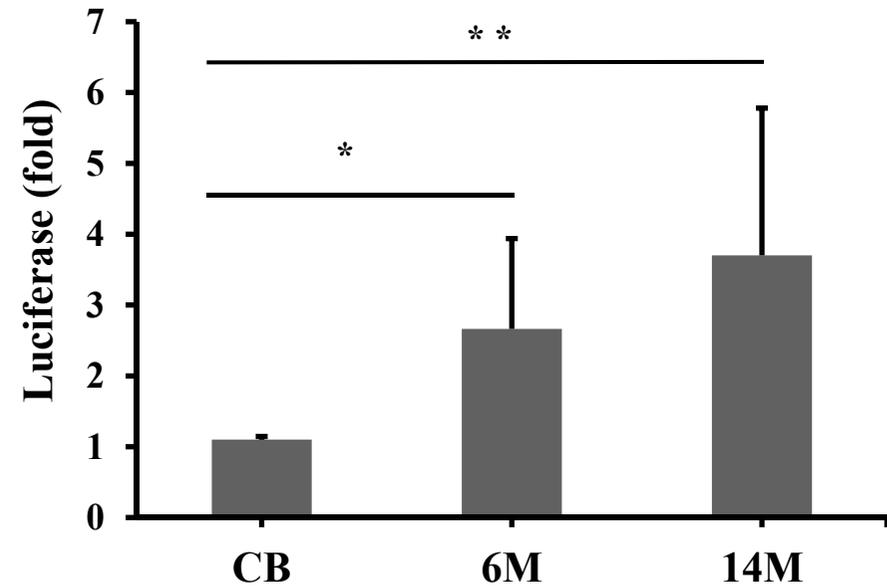
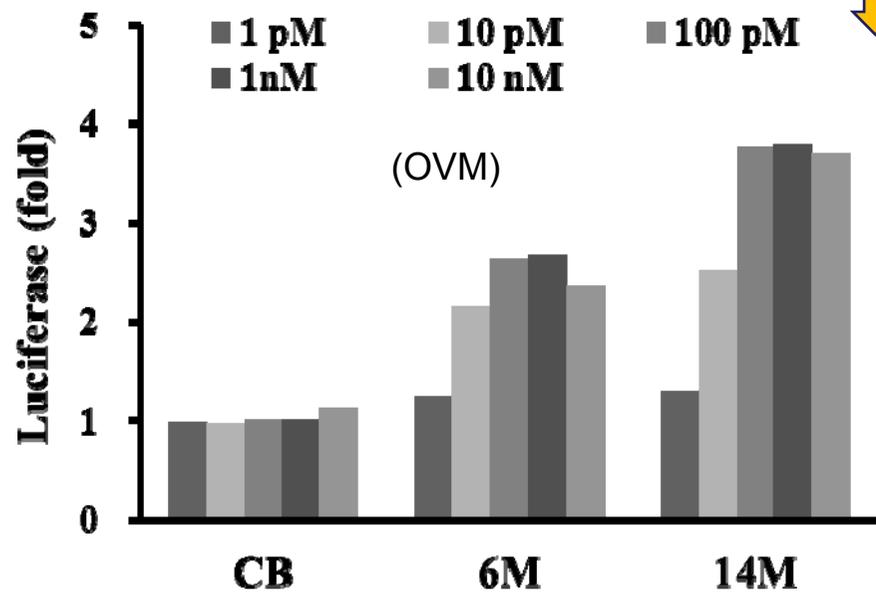
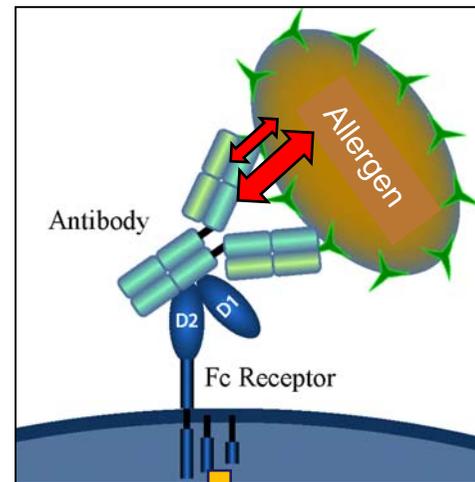


OVMを用いたAnti-OVM IgE のチップ結合競合阻害



Avidity Index ではなく、Avidityを定量的に示すallergenのIC50値 (nM) で評価

臍帯血のIgEは Low affinity IgE で、ヒスタミン遊離反応を引き起こさない。

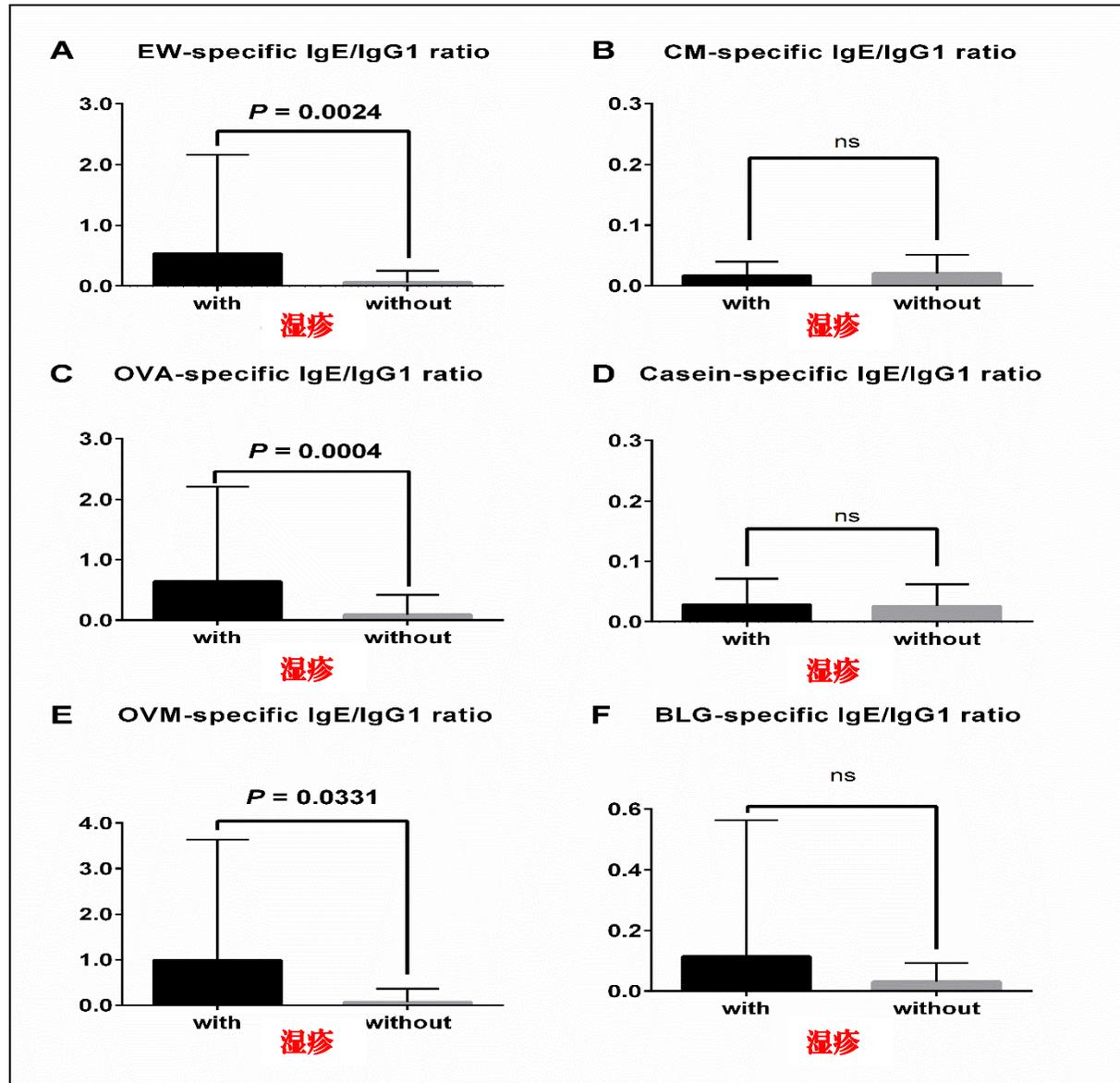


→
(アレルギー体質が決まる時期)

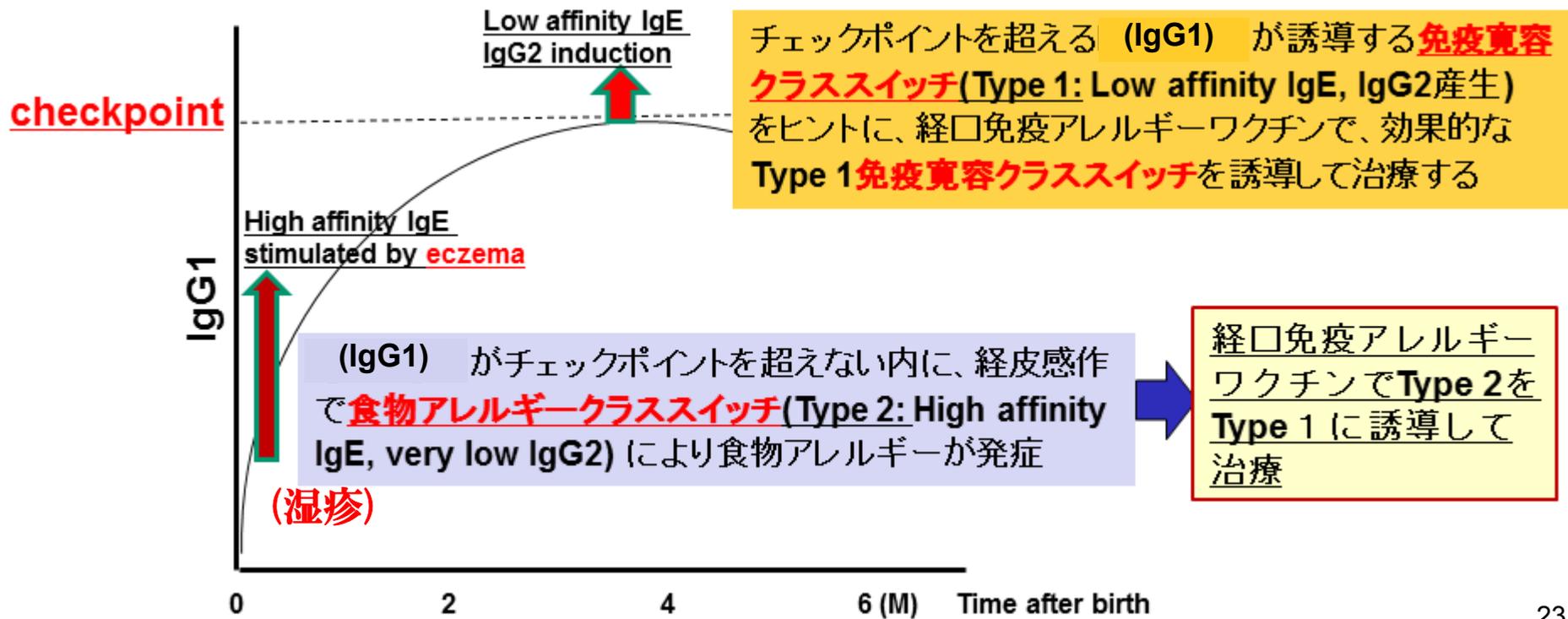
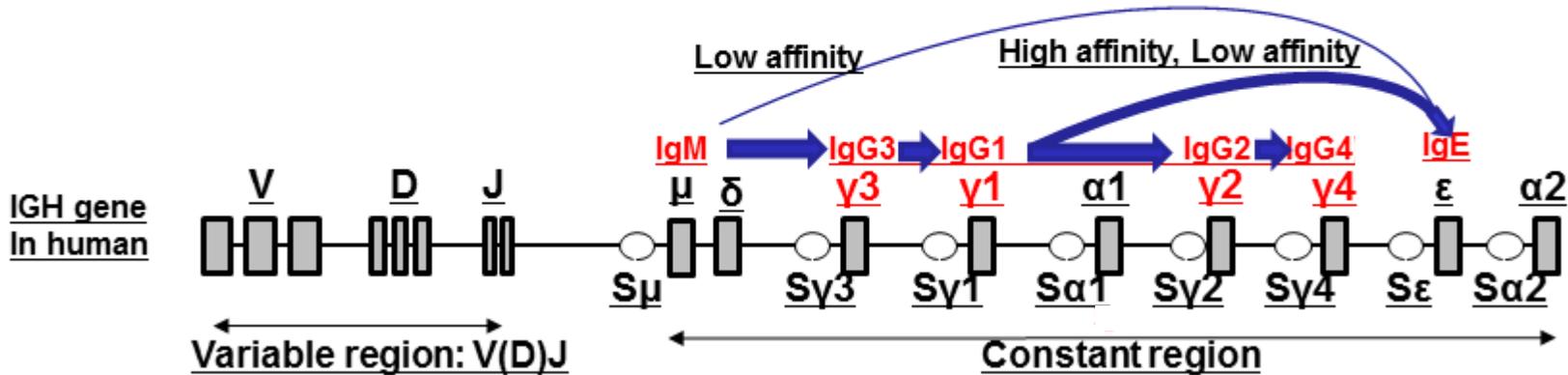
湿疹によるアレルゲンの経皮感作が左右する食物アレルギーの発症リスク

卵白アレルゲン

ミルクアレルゲン



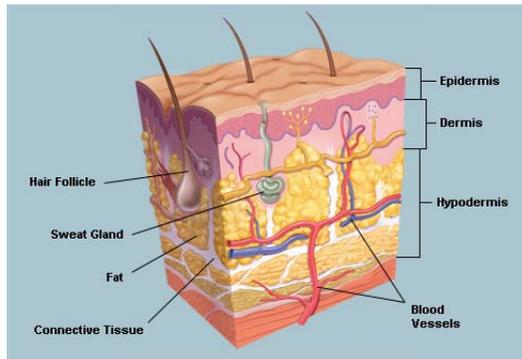
経口免疫寛容と食物アレルギー発症のクラススイッチの違いが導いた 経口免疫アレルギーワクチン療法の仮説



感作アレルゲン量の定量

(母乳、皮膚、食品、環境中)

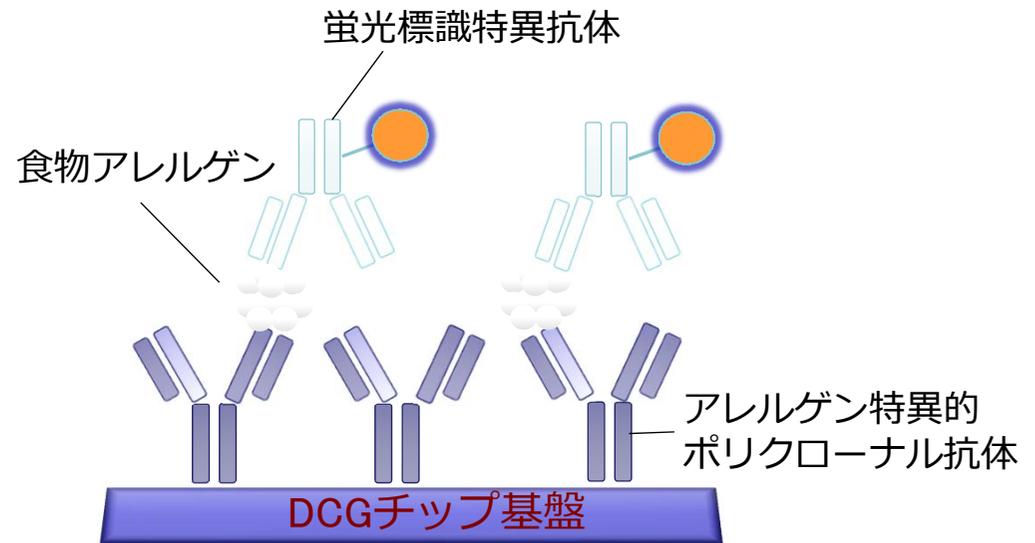
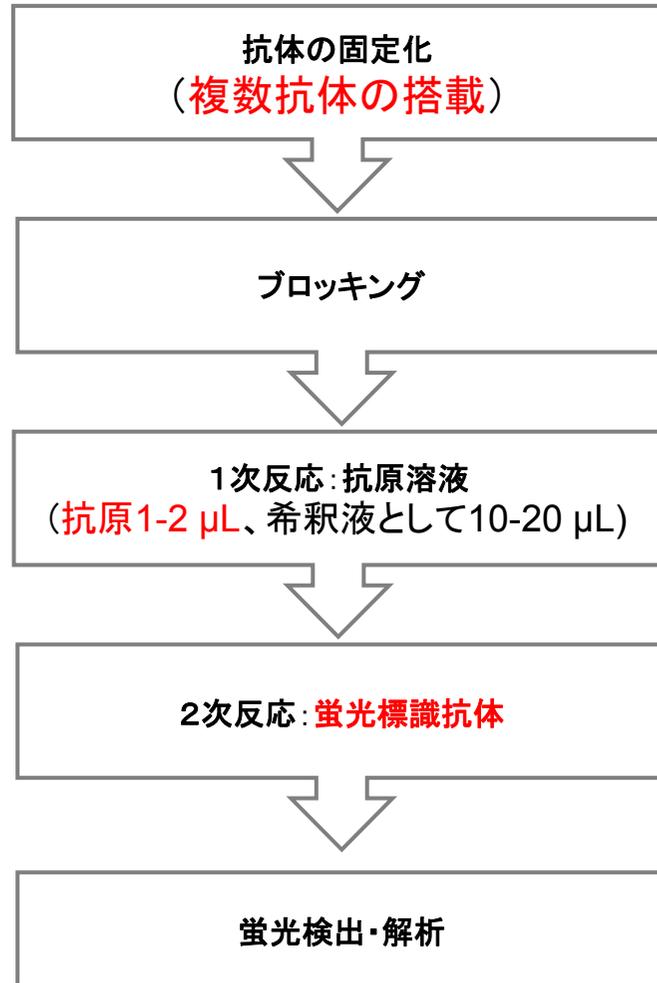
(経皮膚)



(消化管粘膜)



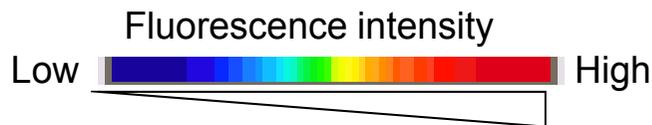
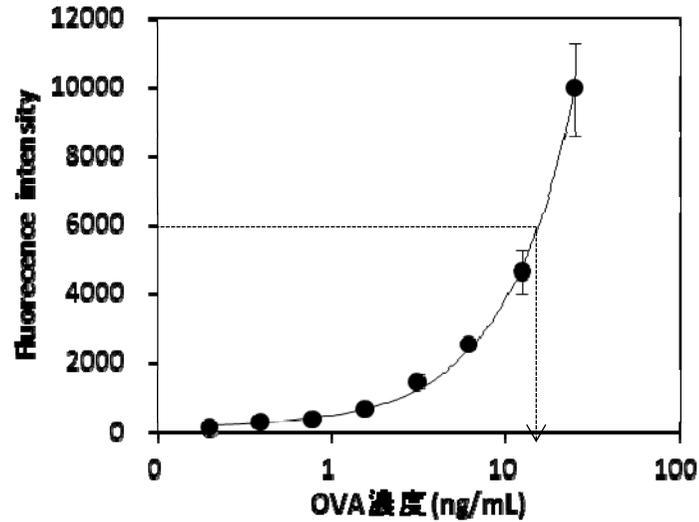
抗体固定化DCGチップでのアレルギー検出



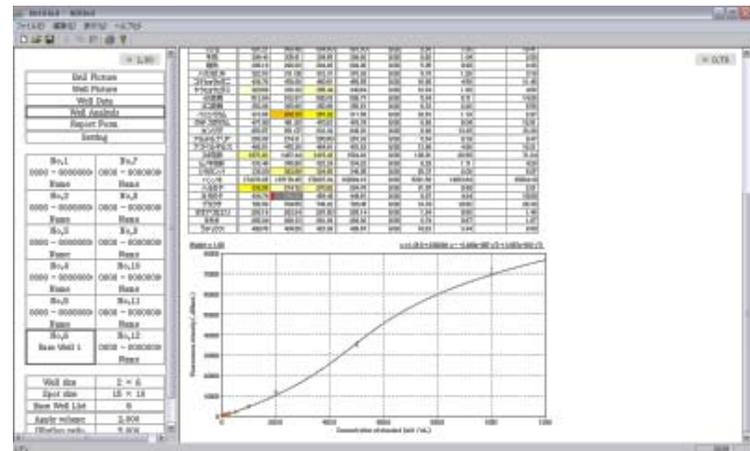
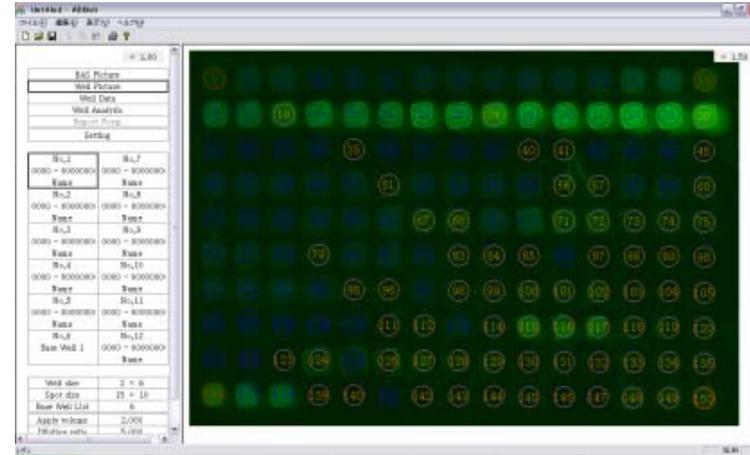
- 1次反応から解析まで、所要時間は約3.5時間

抗体固定化DCGチップでの解析方法

OVA抗体搭載チップ検量線



<解析専用ソフト>



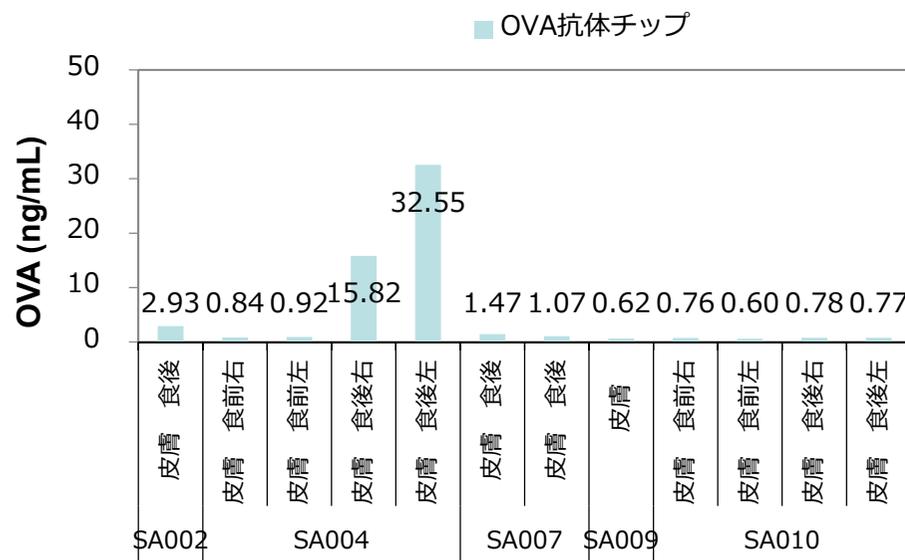
テープ法による抽出検体のアレルギー量の測定

乳児の頬からテープ法で採取した抽出液に含まれるアレルギーをOVA抗体チップとモリナガFASPEK II 卵白アルブミンELISAキットで測定した値の比較



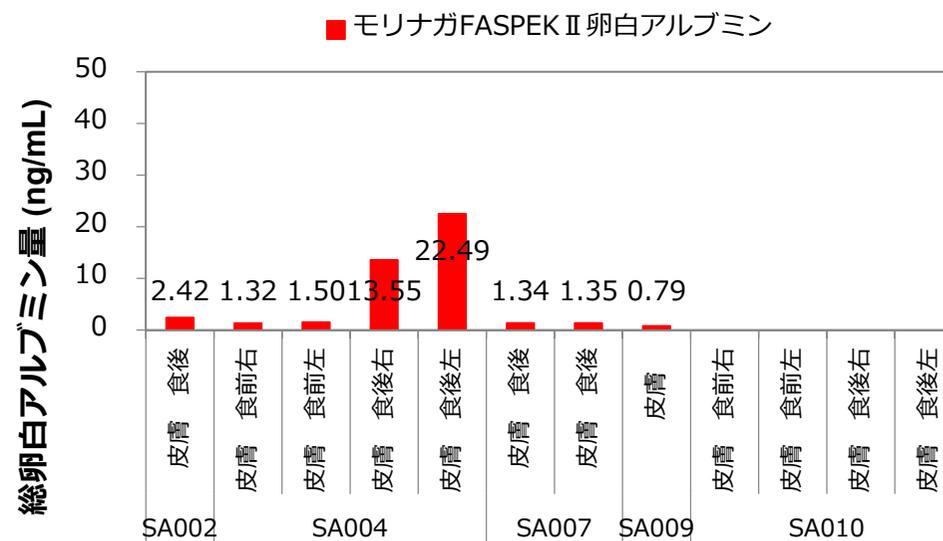
(湿疹)

OVA抗体チップ



検体

ELISA



検体

食物アレルギーの治療 に役立つ検査法

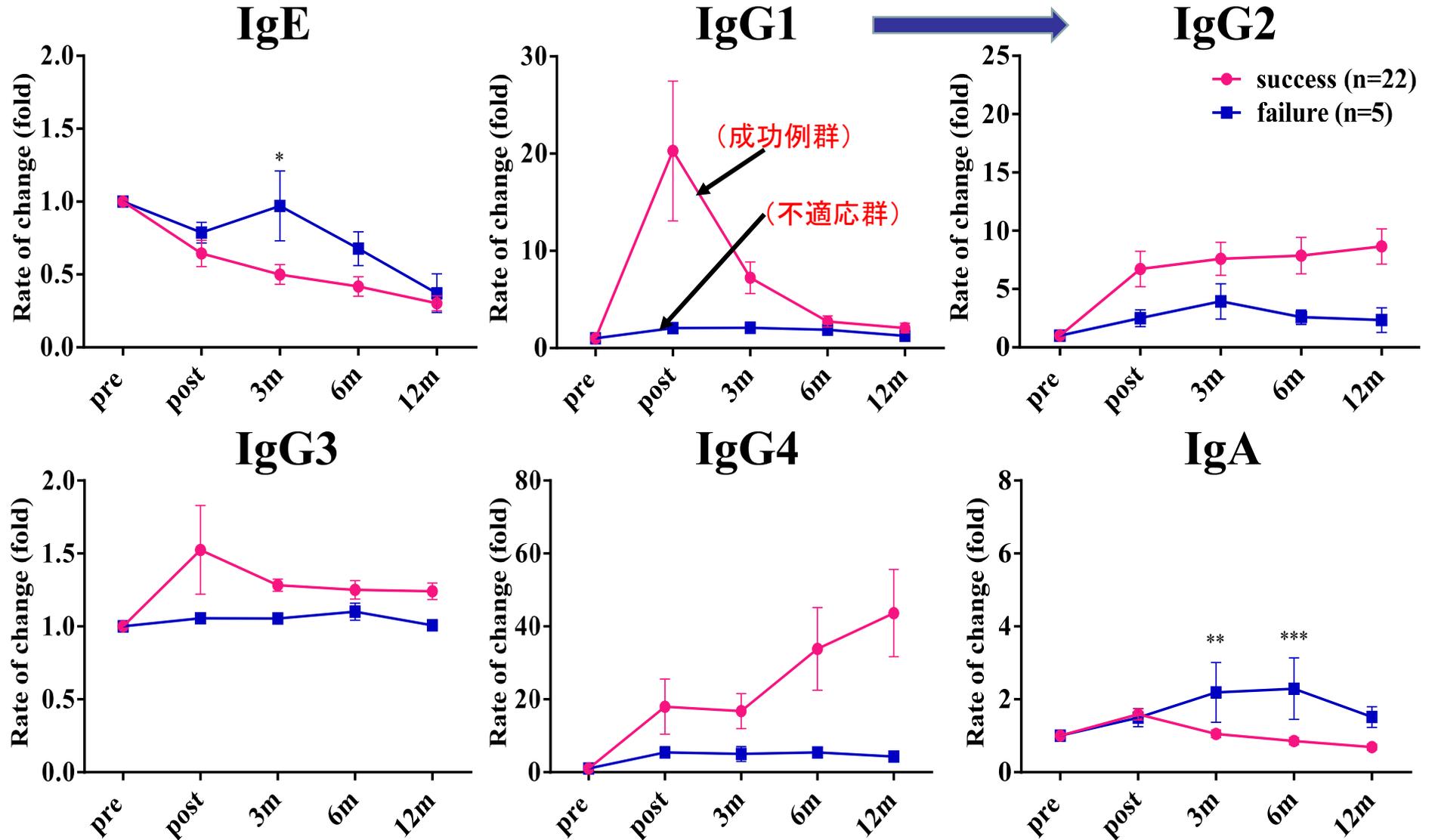
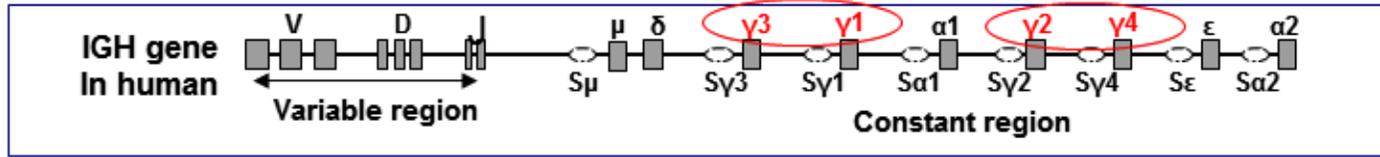
急速減感作療法の予後の判定に役立つ
イムノグロブリンクラススイッチ

急速減感作療法とクラススイッチ

患者背景 (n=27)

性別 男:女	17:10
年齢 median (range)	7.5 (5-12)
アナフィラキシーの既往あり % (n)	100 (27)
DBPCFCの症状誘発閾値 (g) median (range)	0.47 (0.15-15)
維持量到達までの日数 median (range)	34 (19-58)
増量期の加熱卵1個への到達率 % (n)	100 (27)
増量期の半熟卵1個への到達率 % (n)	92.6 (25)
1年後における加熱卵1個の維持摂取率 % (n)	81.5 (22)
1年後における半熟卵1個の維持摂取率 % (n)	51.9 (14)

EW



Sidak's multiple comparisons test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

講演のまとめ

1. 食物アレルギーの発症機序と経口免疫寛容の機序が解明されつつあり、食物アレルギーの予防法と治療法が明らかになってきた。
2. 高感度、低侵襲性の新しいアレルゲン検査法の開発によって、これまで明らかになっていなかった食物アレルギーと経口免疫寛容の違いが、具体的なバイオマーカーによって論ずることができるようになってきた。Low affinity IgEの発見とその経口免疫寛容への関与が、アレルギーにおけるIgEのパラダイムシフトを起している。
3. 従来の血清学的アレルギー診断法は、アレルギーの原因物質の検索であったが、新規検査法の開発により、アレルギーの予防と治療のための診断法が明らかになってきた。

Thanks !



食品由来のアクリルアミド摂取量の推定に関する研究



河原 純子 (かわはら じゅんこ)

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 客員研究員

1997年3月 徳島大学総合科学部卒業

2005年3月 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 環境システム学専攻
博士課程単位取得退学

2005年4月 国立環境研究所 化学物質リスク評価研究センター アシスタント

2005年9月 環境学博士 (東京大学大学院)

2006年4月 国立環境研究所 化学物質リスク研究センター ポスドク研究員

2011年1月 国立環境研究所 環境リスク研究センター 任期付研究員

2015年8月 国立環境研究所 環境リスク研究センター 主任研究員

2017年6月 国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 退職
(現在 客員研究員として勤務)

<研究成果概要>

本研究は日本人の食事由来のアクリルアミドの摂取量の推定法を確立することを目標とした。

課題1: 統計的手法を用いて日本人における食品由来のアクリルアミド (以下「AA」という。) の長期平均摂取量の分布を推定した。食品中AA濃度には農林水産省の調査結果等、課題2において得られた測定結果および国内の文献情報等を、食品摂取量には平成24年国民健康・栄養調査情報を用いた。モンテカルロシミュレーションの結果、日本人のAAの長期平均摂取量は147-154 ng/kg bw/day、95パーセンタイル値は 226-261 ng/kg bw/dayと推定された。飲料、高温加熱調理したじゃがいも及び野菜類がAA摂取量に寄与すると推定された。国内の長期食事調査情報から得た4食品群の摂取頻度の分布をもとに、ブートストラップ様のリサンプリング法を用い、各食品群の仮想的な生涯食品摂取頻度の個人分布を予測した結果、コーヒー、緑茶・ウーロン茶では、食品摂取頻度の個人差がAA摂取量の推計値に及ぼす影響が相対的に大きいことが示唆された。

課題2: 課題1に資する情報収集のため、家庭における食品の加熱方法と加熱調理食品に含まれるAA濃度を調査した。質問票回答者257名において、カレー、肉じゃが、およびシチューを作る際、じゃがいもを、下処理として炒める (以下「下炒め」という。) 者の割合は63 %、玉ねぎを下炒めする者の割合は82 %であった。回答者の一部に、カレー、シチュー、肉じゃがのいずれかを作る際のじゃがいも・たまねぎの下炒め調理を再現してもらい、これを試料として収集し、AAの濃度を測定した。下炒めじゃがいも53点のAA濃度は、平均値11 ng/g、中央値5.0 ng/g、最小値2.5 ng/g、最大値120 ng/gであった。下炒め玉ねぎ58点のAA濃度は、平均値36 ng/g、中央値14 ng/g、最小値2.0 ng/g、最大値420 ng/gであった。

課題3: 2015年10月から2016年11月にかけて、神奈川県と茨城県、およびその近隣に住む成人119名を対象に、1日の陰膳と食事記録を収集した。陰膳試料は均質化し、LC-MS/MSを用いて試料中のAA含有量を測定した。陰膳110試料の測定の結果、対象集団のAAばく露量の中央値は144 ng/kg-bw/day、平均値は222 ng/kg-bw/dayと推定された。統計解析の結果、コーヒーや高温調理した芋や野菜類の摂取の有無によってAA摂取量が有意に異なることが示された。

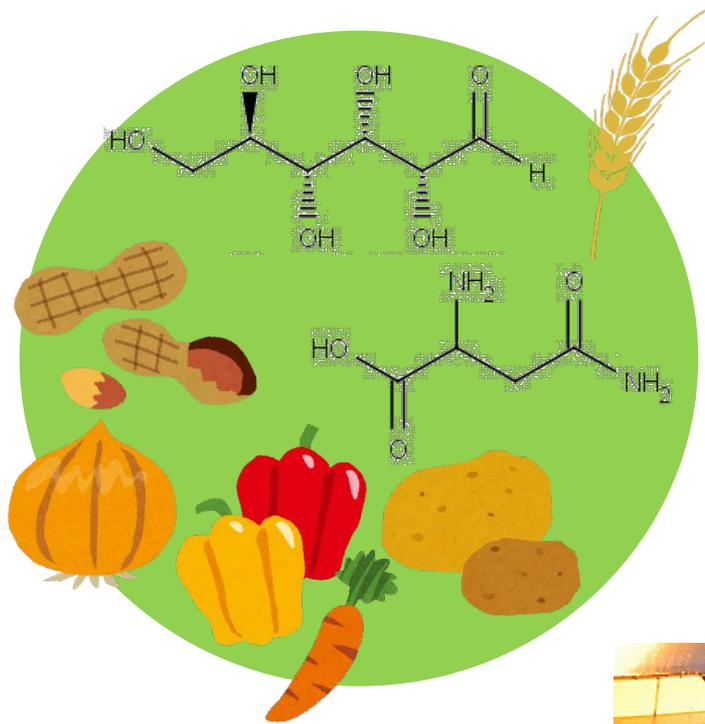
食品健康影響評価技術研究
自ら評価や新たな危害要因に対応する調査・研究
課題番号1507

食品由来のアクリルアミド摂取量 の推定に関する研究

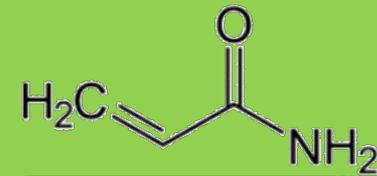
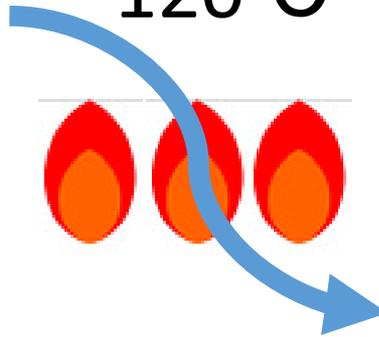
課題代表者

国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター
河原 純子

食品の加熱とアクリルアミド



120°C



アクリルアミド
発がん性
神経毒性



食品の加熱調理温度

分類		熱媒体	温度℃
外部加熱	湿式加熱	ゆでる	水 100
		煮る	水 100
		蒸す	水 最高100 食品により80-90℃
		炊く	水 100
加熱法	乾式加熱	焼く 直火	空気 200-300
		間接	金属板等 200-300
	オーブン	空気、金属板等 130-280	
	炒める	油、金属板等 150-200	
	揚げる	油 130-190食品により120℃+	

(川端・畑明 2013 調理学より引用)

煎り	落花生 : 150-180 °C, 麦茶 150-250°C, コーヒー豆 180-270°C
----	---

食品に含まれるアクリルアミド

推定対象	AA濃度平均 (ng/g)	最小～最大値 (ng/g)	調査年度
フライドポテト	270	40～1100	H24-26
ポテトスナック	570	<30～2100	H24-26
ビスケット類	170	<20～560	H24-26
米菓	79	10～540	H26
コーヒー豆	220	59～340	H26
煎り麦	250	34～590	H26

農林水産省HPより引用

食品中に含まれるアクリルアミド(続)

推定対象	AA濃度平均 (ng/g)	試験試料の調理条件 (加熱時間/切り方)
もやし	752	・炒め2分、7分/丸ごと、ひげ根の除去せず
れんこん	455	・炒め6分/1-2mm薄切り(水さらし有、無)
にんにく	173	・炒め7分/厚さ1-2mm程度
ごぼう	80	・炒め7分/ささがき
根深ねぎ	43	・炒め6分/斜め薄切り(長さ4cm、厚さ5mm)
にら	30	・炒め3分/長さ約4cm
にんじん	16	・炒め10分/2mm半月切り
じゃがいも	463	・炒め10分/5mm半月切り(室温or冷蔵保存)

(農林水産省調査結果/内閣府 食品安全委員会2016)

先行研究におけるアクリルアミドのリスク評価

$$\text{MOE} = \frac{\text{動物実験で10\%がんが増える摂取量 (BMDL}_{10}\text{)}}{\text{人の食品からの摂取量 (体重1 kgあたり)}}$$

地域	影響	Reference point ($\mu\text{g/kg-bw/d}$)	MOE	
			平均	高曝露
カナダ 2012	神経組織形態変化 ラット	200 (NOAEL)	1274-328	651-144
	ハーダー腺腫 マウス	180 (BMDL ₁₀)	1146-296	586-119
オランダ 2014	坐骨神経軸索膜陥入 ラット	200 (NOAEL)	667-333	222-143
	乳腺線維腺腫 マウス	300 (BMDL ₁₀)	1000-500	333-214
EU EFSA 2015	坐骨神経軸索変形 ラット	430 (NOAEL)	1075-226	717-126
	ハーダー腺腫/腺癌 マウス	170 (BMDL ₁₀)	425-89	283-50

日本における食品由来のアクリルアミドによるリスクは？

食品由来のアクリルアミド摂取量の推定に関する研究 研究項目

◆食品からのアクリルアミド摂取量の統計的推定に関する研究

国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター
河原純子、今泉圭隆、黒田圭介、鈴木規之、青木康展

◆家庭調理における炒めじゃがいもおよびたまねぎのアクリルアミド濃度の調査

日本獣医生命科学大学 応用生命科学部 吉田 充

◆陰膳試料を用いたアクリルアミド摂取量の推定

相模女子大学 栄養科学部 安達 修一

国立環境研究所 河原純子、中島大介、柴田康行

課題① 食品由来のアクリルアミドの長期平均 摂取量の推定

アクリルアミドの長期平均摂取量 x_i

$$x_j = \sum_{i=1}^N \left(Conc_{ij} \times Port_{ij} \times \frac{\overline{Fq}_i}{T} \right)$$

i : 推定対象食品または食品群

N : 食品（群）の総数

$Conc_{ij}$: 食品 i 中の有害物質濃度 [mg/g]

$Port_{ij}$: 食品 i の一日摂取量 [g/kg体重/day]

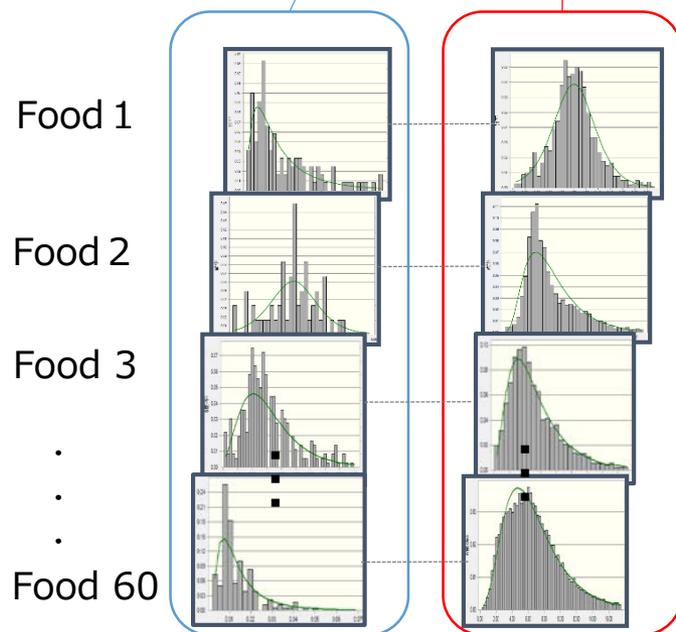
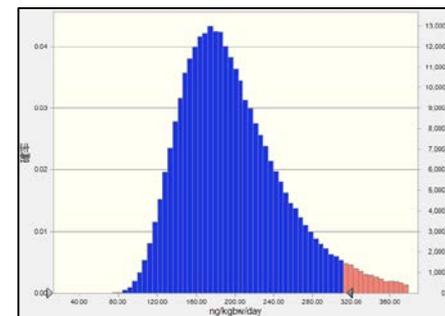
\overline{Fq}_i : 期間 T における食品 i の摂取イベント数 [day]

T : 推定対象期間 [day]

アクリルアミドの長期平均摂取量の分布推定

長期平均アクリルアミド摂取量

$$x_j = \sum_{i=1}^N \left(\textcircled{1} \text{Conc}_{ij} \times \textcircled{2} \text{Port}_{ij} \times \frac{\textcircled{3} Fq_i}{T} \right) \longrightarrow$$



①食品中AA濃度

農林水産省、厚生労働省調査ほか
国内文献値より分布を推定

②食品摂取量

国民健康・栄養調査（1日）の
24,293名の食事・体重データから分布を推定

③長期における食品摂取割合（固定値）

国民健康・栄養調査（1日）から推計した
摂取者割合を長期における摂取割合として
代用

アクリルアミド摂取量の推定対象食品群

穀類	炊飯米、シリアル類、インスタント麺、フランスパン・ロールパン、菓子パン類 麦こがし、食パン（トースト）、食パン（トーストしない）、フライ衣
芋類	じゃがいも（素揚げ）、じゃがいも（炒め）、じゃがいも（下炒め*）
砂糖	含みつ糖、和三盆
豆	フライビーンズ（空豆）、きな粉
種実	ごま、落花生、アーモンド、ピスタチオ
野菜	アスパラガス、キャベツ、玉ねぎ、さやえんどう、さやいんげん なす、ピーマン、かぼちゃ、もやし、ブロッコリー（以上は揚げ・炒め）、玉ねぎ（下炒め*）
果実	乾燥果実
菓子	ポテトチップス、成型ポテトチップス、コーンチップス、米菓、小麦系菓子類、かりんとう、どらやき、まんじゅう（黒糖）、芋けんぴ、飴、ポーロ
嗜好飲料	ほうじ茶、麦茶、麦茶（ボトル）、コーヒー飲料、インスタントコーヒー（粉） コーヒー豆、ココア（粉）、緑茶、ウーロン茶、紅茶（浸出液）
調味料	カレー粉、ハヤシ粉、ビーフシチュー粉、クリームシチュー粉、みそ、しょうゆ

*下炒め: 下処理として炒める加熱方法

アクリルアミド摂取量の推定対象食品群

穀類	炊飯米、シリアル類、インスタント麺、フランスパン・ロールパン、菓子パン類 麦こがし、食パン（トースト）、食パン（トーストしない）、フライ衣
芋類	じゃがいも（素揚げ）、じゃがいも（炒め）、じゃがいも（下炒め*）
砂糖	含みつ糖、和三盆
豆	フライビーンズ（空豆）、きな粉
種実	ごま、落花生、アーモンド、ピスタチオ
野菜	アスパラガス、キャベツ、玉ねぎ、さやえんどう、さやいんげん なす、ピーマン、かぼちゃ、もやし、ブロッコリー（以上は揚げ・炒め）、玉ねぎ（下炒め*）
果実	乾燥果実
菓子	ポテトチップス、成型ポテトチップス、コーンチップス、米菓、小麦系菓子類、かりんとう、どらやき、まんじゅう（黒糖）、芋けんぴ、飴、ポーロ
嗜好飲料	ほうじ茶、麦茶、麦茶（ボトル）、コーヒー飲料、インスタントコーヒー（粉） コーヒー豆、ココア（粉）、緑茶、ウーロン茶、紅茶（浸出液）
調味料	カレー粉、ハヤシ粉、ビーフシチュー粉、クリームシチュー粉、みそ、しょうゆ

*下炒め：下処理として炒める加熱方法

課題② 家庭調理における炒めじゃがいも およびたまねぎのアクリルアミド濃度の調査

- あなたの家庭では、カレー、シチュー、肉じゃがを作る際、じゃがいもや玉ねぎを煮込む前に炒めますか？
 - ◆対象；国内の大学の学生、研究生、大学教職員とその家族・知人
 - ◆調査方法；質問票による
実施期間；H27年9～11月。質問票配布数：約500／回答者数：256

■ 結果

調理方法	(問1)カレー		(問2)シチュー		(問3)肉じゃが		合 計	
	じゃがいも	玉ねぎ	じゃがいも	玉ねぎ	じゃがいも	玉ねぎ	じゃがいも	玉ねぎ
炒める	160	208	144	184	136	143	440	535
炒めない	77	24	87	39	93	52	257	115
入れない	12	2	5	0		0	17	2
調理しない	5	5	17	17	21	21	43	43
不明	2	17	3	16	6	40	11	73
合計	256	256	256	256	256	256	768	768

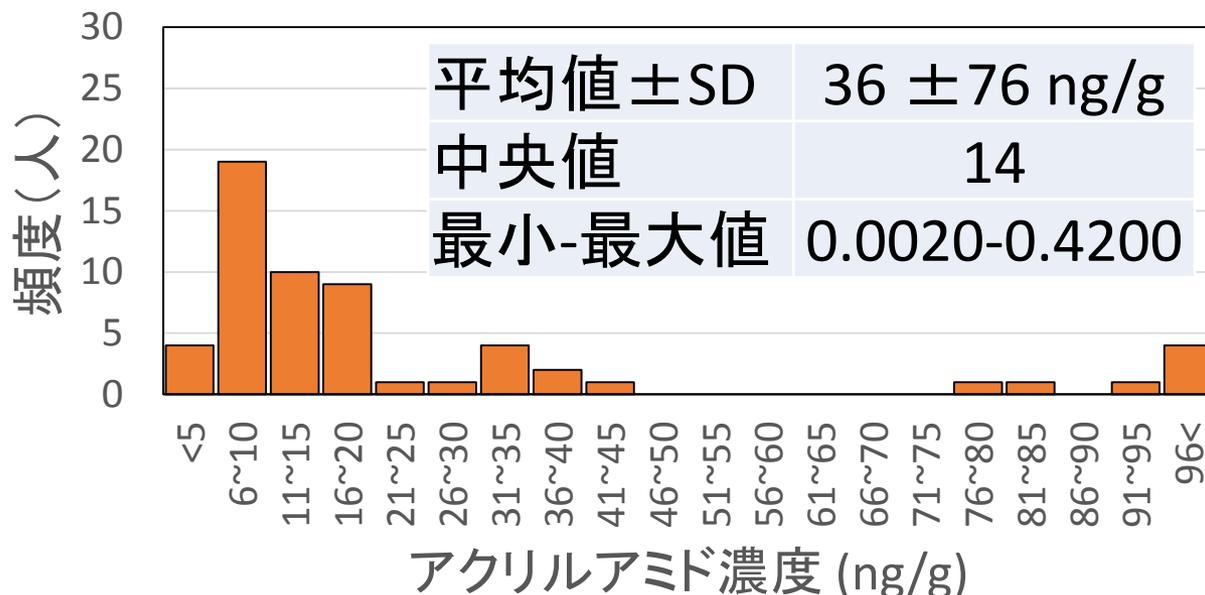
炒める者の割合；じゃがいも63%、たまねぎ82%

課題② 炒めたじゃがいも・たまねぎ中の アクリルアミド濃度の測定結果

- じゃがいも
(検出数53/60)



- たまねぎ
(検出数58/60)



じゃがいも中アクリルアミドの検出限界 (LOD: <0.005) 以下はLOD/2 = 0.0025として算出
 たまねぎ中アクリルアミド検出限界 (LOD: <0.004) 以下はLOD/2 = 0.002として算出

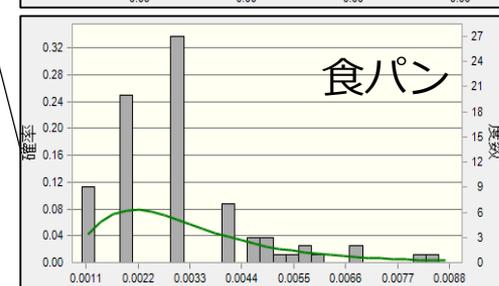
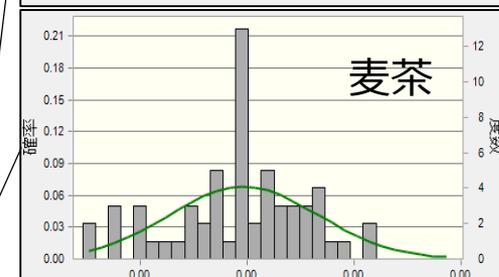
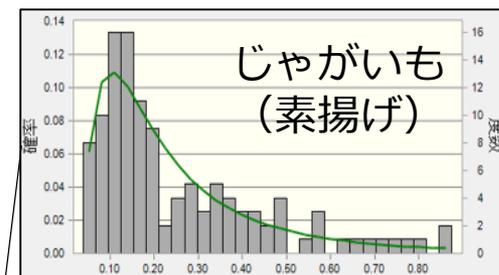
食品中アクリルアミド濃度分布の仮定

濃度データ数	アクリルアミド検出率	濃度の仮定	食品グループ数
30以上	80% <	分布推定	21グループ
30以上	10% ≤, <80%	固定値 (平均値)	32グループ
30未満	40% <		

不検出データ = 検出限界値 × 1/2 とする。

▶ 食品中AA濃度推定結果 (一部抜粋)

食品グループ名	N	分布	平均, 標準偏差
シリアル類	30	対数正規	0.12, 0.47
ロールインパン・フランスパン等	180	対数正規	0.02, 0.01
じゃがいも (素揚げ)	120	対数正規	0.28, 0.27
もやし・アスパラガス・ピーマン (素揚げ・炒め)	60	対数正規	0.10, 0.08
かぼちゃ・キャベツ・さやいんげん・なす・ブロッコリー (素揚げ・炒め)	108	対数正規	0.02, 0.02
たまねぎ (下炒め)	58	対数正規	0.03, 0.05
ポテトチップス	94	対数正規	0.69, 1.9
成形ポテトスナック	229	対数正規	1.2, 0.81
小麦系菓子類	398	対数正規	0.18, 0.21
インスタントコーヒー (粉末)	60	正規分布	0.67, 0.11
レギュラーコーヒー (浸出液)	60	正規分布	0.02, 0.04
麦茶 (浸出液)	60	正規分布	0.002, 0.001



食事調査情報の利用

加熱調理食品（煮物・揚げ物・炒め物等）の摂取量の推定

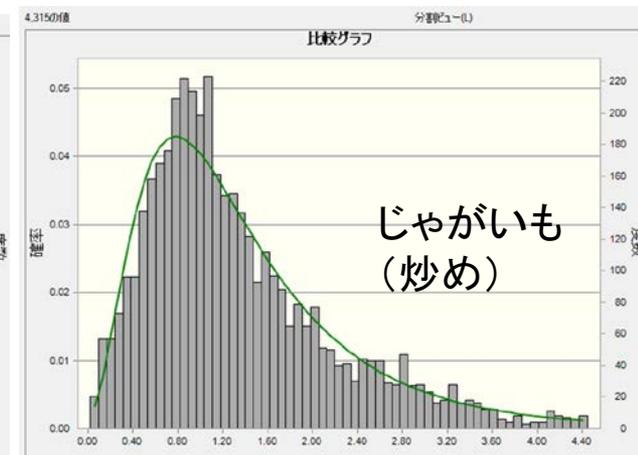
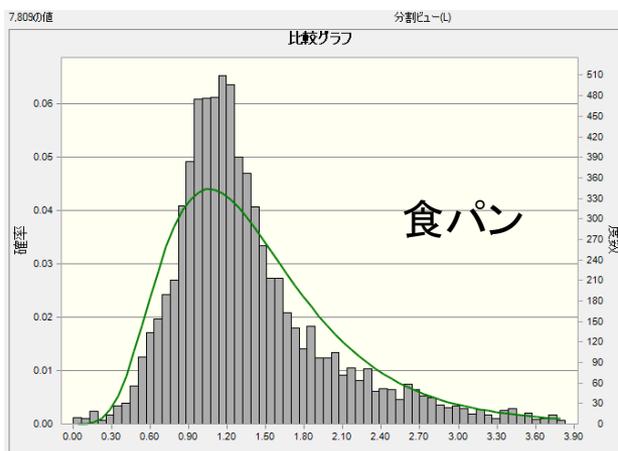
RYORIMEI	SHOKUHIN	SHOKUHINMEI
めし	1088	めし
糸ひき納豆	4046	糸ひき納豆
糸ひき納豆	17029	ストレートめんつゆ
味噌汁	10281	あさり
味噌汁	17045	淡色辛みそ
鶏手羽中焼き	11218	鶏手羽
鶏手羽中焼き	17012	食塩
鶏手羽中焼き	17063	黒こしょう
野菜炒め	6061	キャベツ
野菜炒め	6153	玉ねぎ
野菜炒め	6289	ブラックマッペもやし
野菜炒め	14002	ごま油
野菜炒め	17007	濃口しょうゆ
野菜炒め	17012	食塩
野菜炒め	17063	黒こしょう

料理名と食品名の組合せから加熱方法を推定

食品摂取量の分布の仮定

- 食品摂取量の仮定

食品群名	摂取量の仮定
麦こがし, 和三盆糖, フライ ビーンズ, ボーロ, ピスタチオ	固定値 (平均値)
上記を除く55群	分布推定 (対数正規)



1日の食品摂取量 (g/kg/day) の分布の推定結果例

モンテカルロシミュレーションによる アクリルアミド摂取量の分布推定 計算条件

- ✓モンテカルロ試行回数：200,000回
- ✓乱数サンプリング法：ラテンハイパーキューブ法
- ✓食品摂取量は食品グループ間で独立と仮定
- ✓食品中AA濃度と食品摂取量は独立と仮定
- ✓食品中AA濃度・食品摂取量分布の上限・下限の仮定

仮定	食品中AA濃度	各食品群の摂取量・対象食品の総摂取量
1	下限；0 上限；なし	下限：0 上限：なし、総摂取量上限は設定しない
2	下限；0 上限； 実測最大値	下限： 実測最小値 上限： 実測最大値 、総摂取量 120g/kg/日

(シミュレーションにはCrystal Ball ver.11を使用。)

推定長期平均アクリルアミド摂取量(仮定1)

推定対象食品グループ	中央値 ng/kg-bw/day	95パーセンタイル値 ng/kg-bw/day	AA濃度の仮定
レギュラーコーヒー(浸出液)	11	29	分布
インスタントコーヒー(粉末)	9.0	29	分布
じゃがいも(炒め)	7.0	24	固定値
もやし(素揚げ・炒め)	4.9	28	分布
成形ポテトスナック	4.8	25	分布
小麦系菓子類	4.5	37	分布
たまねぎ(下炒め)	4.3	38	分布
緑茶・ウーロン茶(浸出液)	4.3	13	固定値
じゃがいも(素揚げ)	3.9	28	分布
たまねぎ(素揚げ・炒め)	3.7	17	分布
ポテトチップス	3.7	55	分布
ピーマン(素揚げ・炒め)	3.5	22	分布
ルウ(カレーほか)	3.5	19	分布
炊飯米	3.5	8	固定値
米菓類	2.2	20	分布
キャベツ(素揚げ・炒め)	2.0	11	分布
総摂取量	154	261	

推定長期平均アクリルアミド摂取量(仮定2)

推定対象食品グループ名	中央値 ng/kg-bw/day	95パーセンタイル値 ng/kg-bw/day	AA濃度の仮定
レギュラーコーヒー(浸出液)	11	29	分布
インスタントコーヒー(粉末)	9.0	29	分布
じゃがいも(炒め)	7.0	23	固定値
もやし(素揚げ・炒め)	4.9	26	分布
成形ポテトスナック	4.8	24	分布
小麦系菓子類	4.5	37	分布
たまねぎ(下炒め)	4.3	36	分布
緑茶・ウーロン茶(浸出液)	4.3	12	固定値
じゃがいも(素揚げ)	3.9	24	分布
たまねぎ(素揚げ・炒め)	3.7	17	分布
ルウ	3.5	18	分布
炊飯米	3.5	8.0	固定値
ピーマン(素揚げ・炒め)	3.5	21	分布
ポテトチップス	3.2	30	分布
米菓類	2.2	19	分布
キャベツ(素揚げ・炒め)	2.0	11	分布
総摂取量	147	226	

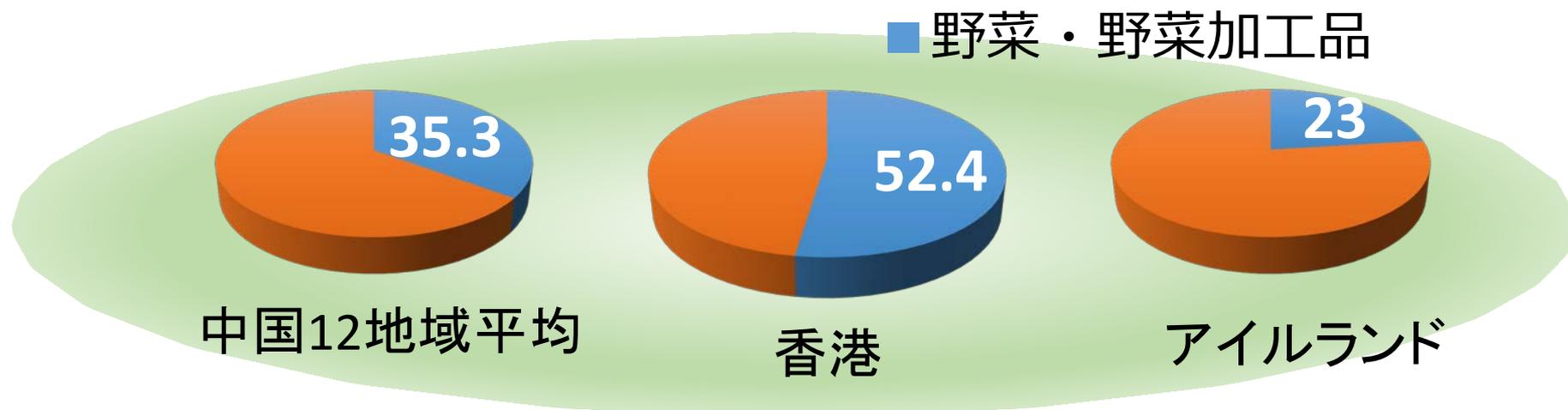
アクリルアミド摂取量に寄与する食品群

◆ 統計的手法（間接法）による推定

オランダ 2014 (chips, coffee, crisps)
フランス 2012 (French fries, coffee, biscuits)
ポーランド 2010 (bread, chips・French fries, coffee)
カナダ 2012 (French fries, snack chips, coffee)

◆ マーケットバスケット法による推定

成人のアクリルアミド摂取量に対する野菜類の寄与率(%)



(Gaoら2016, Wongら2014, FSA Ireland 2016)

推定における不確実性

- **長期の食品摂取割合の妥当性**

横断調査で得られた食品摂取割合を代用。

- **食品中アクリルアミド濃度の仮定**

対象食品群数は60 ⇒実際のAA摂取量を過小評価している可能性がある。
平均値の採用 ⇒実際のAA曝露量の分布よりも狭く推定している可能性。

- **高温加熱の芋・野菜のAA濃度や摂取量の妥当性**

野菜中のアクリルアミド濃度分布は限られた実験値に基づく仮定。
調理（揚げ・炒めなど）別の摂取量や摂取割合は不確か。

嗜好や家庭における様々な加熱調理の実態を反映できているか？



課題③ 陰膳法を用いたアクリルアミド摂取量の推定

調査対象者

神奈川,茨城,および近隣地域在住の
成人119人 (女性72人, 男性 47人)

平均体重: 58 ± 12 kg (37 ~ 113 kg)
女性; 52 kg (37 ~ 78 kg)
男性; 67 kg (47 ~ 113 kg)

調査期間

2015年10月~2016年11月

収集試料

24時間陰膳 (朝・昼・夕・間食・飲料)
食事記録

(国環研医学倫理審査承認 1-2016-002)



食事記録票(1)

	料理名	材 料	加熱調理 時間	盛り付けた 量(g/mL)	食べ残し量 (骨や皮を含 む)	記入しないで ください
朝食	チーズトースト	食パン	オーブントースター2分	67 g		
		マヨネーズ		20 g		
		スライスチーズ		18 g		
	きなこヨーグルト	無糖ヨーグルト		75 g		
		黒砂糖		5 g		
		きなこ		5 g		
	カフェオレ	普通牛乳	電子レンジ600w1分	150mL		
インスタントコーヒー		2 g				
昼食	あさりとニラ焼きそば	にんじん	炒めIH中火10分	56 g (5個)	殻33 g 残り	
		あさり殻付き				
		もやし				
		中華蒸し麺				
		ニラ				
		塩				
		こしょう				
		オイスターソース				
		酢				
	たこ焼き(市販・冷凍)	冷凍たこやき	電子レンジ800w4分	240 g (8個)		

朝食の写真例



食事記録票(2)

	料理名	材 料	調理前重量(g)	加熱調理時間	出来上がり総重量(g)	盛り付けた量(g)	食べ残し量(骨や皮を含む)	記入しないでください	
朝食	チーズトースト	食パン	70	オーブントースター2分		105			
		マヨネーズ	20						
		スライスチーズ	20						
	きなこヨーグルト	無糖ヨーグルト	75				75		
		黒砂糖	5						
		きなこ	5						
	カフェオレ	普通牛乳	150	電子レンジ600w1分			150		
インスタントコーヒー		2							
昼食	あさりとニラ焼きそば	にんじん(皮なし)	100			56(5個)	殻33g残り		
		あさり殻付き	150						
	炒めIH中火10分	もやし	200			885	295		
		中華蒸し麺	450						
		ニラ	70						
		塩							
		こしょう							
		オイスターソース							
		酢							
		たこ焼き(市販・冷凍)	冷凍たこやき						



日本食品標準成分表コードを用いて分類、分類ごとに食品の加熱情報を整理、菓子類や嗜好飲料、いも・野菜類について1日の摂取量を計算。

陰膳試料の前処理法

陰膳の秤量（飲水を除く）



試料均質化



ホモジナイザー（シャフト：NS-20, NS-26GX/20P）
マイカ・テクニカル社）
均質化後試料は-20℃にて冷凍保存



アクリルアミドの測定

◆測定機器

LC-MS/MS API-2000 [AP SCIEX]

◆分離用カラム

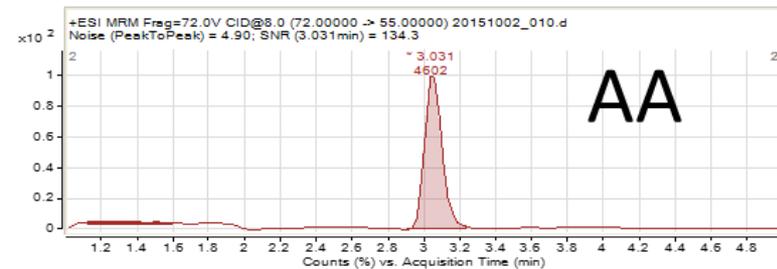
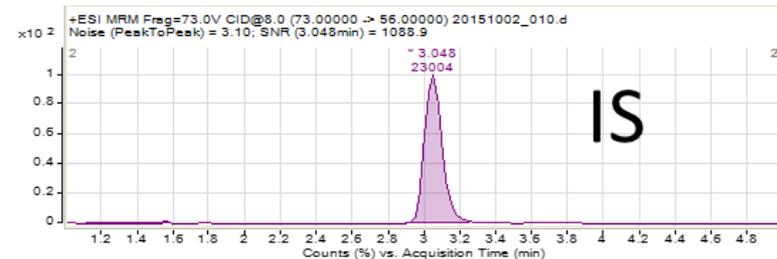
Inert Sustain AQ-C18 HP (GL Sci.)

◆移動相

0.01%酢酸, 0.5%MeOH水溶液
40 °C, 流速 : 0.2 mL/min

◆定性

SRMにてAA標準物質および
同位体標識標準物質の
[M+H]⁺イオン
(m/z 72>55, 75>58)を検出



アクリルアミドのクロマトグラム例

アクリルアミドの定量法, 妥当性試験

◆ アクリルアミド-陰膳 添加回収試験結果 (各試験 N=3)

添加量	試料ID	回収率 (%)	RSD (%)
5 ng	A	103	4.0
	B	113	6.1
25 ng	A	114	6.6
	B	117	3.1
100 ng	A	115	1.7
	B	117	3.2

◆ 妥当性試験

2017年2月 FAPAS Food Chemistry Proficiency Test

試料: ポテトチップス (T3071), 33 Labo が参加

Assigned value: **346 $\mu\text{g}/\text{kg}$**

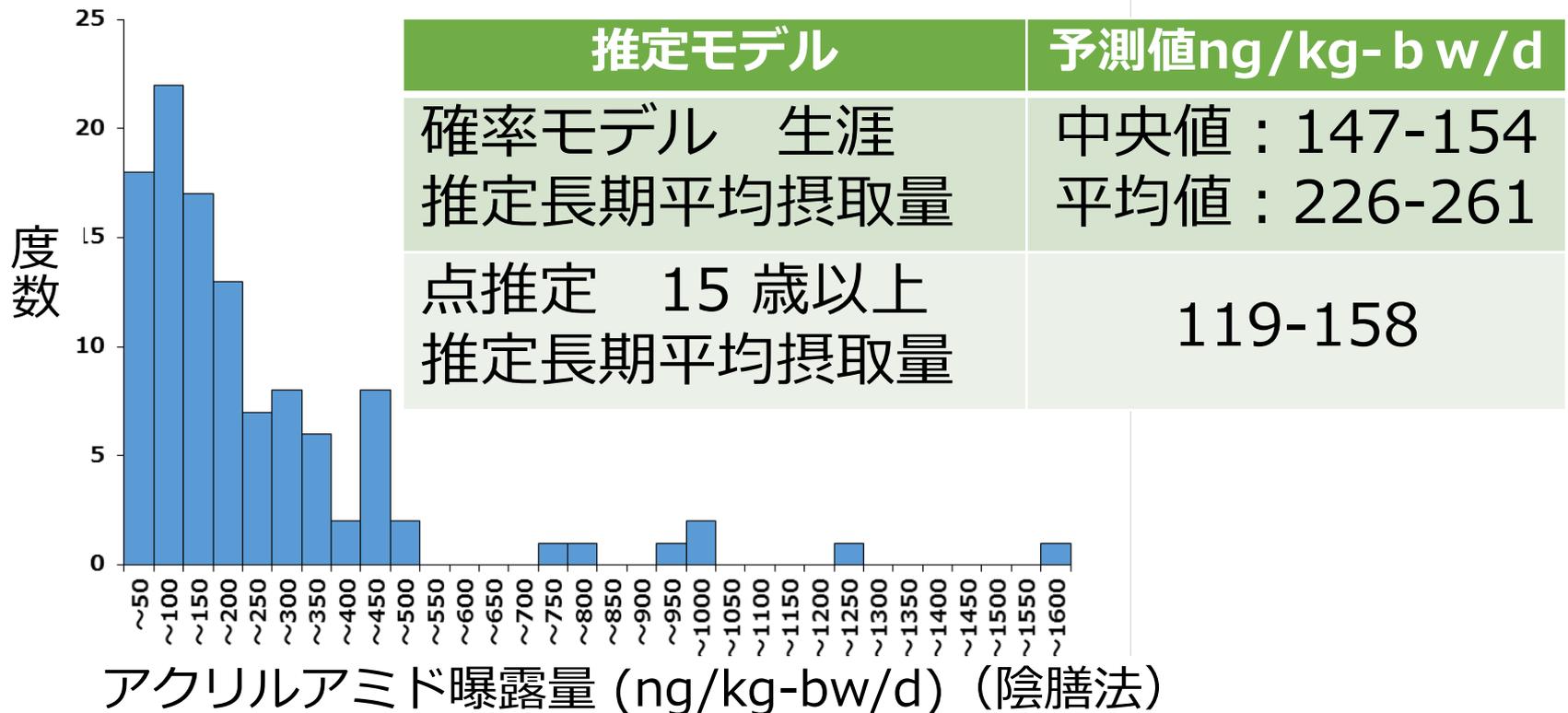
当研究室の報告値: **369 $\mu\text{g}/\text{kg}$** Z-score : 0.4

(FAPAS Food Chemistry Proficiency Test Report 3071)

アクリルアミド摂取量の推定結果(陰膳法)

摂取食品重量平均：女性 2,038 g (飲水を含め2,273 g)
 男性 2,772 g (飲水を含め3,120 g)

アクリルアミド摂取量 中央値：144 ng/kg-bw/d (N=110)
 平均値：222 ng/kg-bw/day (8 - 1582 ng/kg-bw/d)



先行研究における推定摂取量

事例	年齢 yr.	摂取量 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$		引用元
		中央値	95th	
本研究	20+	0.14	-	-
スイス ^a	16-57	0.28	-	Swiss FOPH 2002
オランダ ^a	18-74	0.45	-	Konings 2010
中国 ^b	18-45	0.32	0.49	Gao 2016
香港 ^b	20-84	0.21	0.54	Wong 2014
オランダ	16-69	0.3	0.9	Garaets 2014
カナダ	19+	0.15-0.28*	0.30 - 0.74	Health Canada 2012
フランス	18-79	0.43	1.0	Sirot 2012

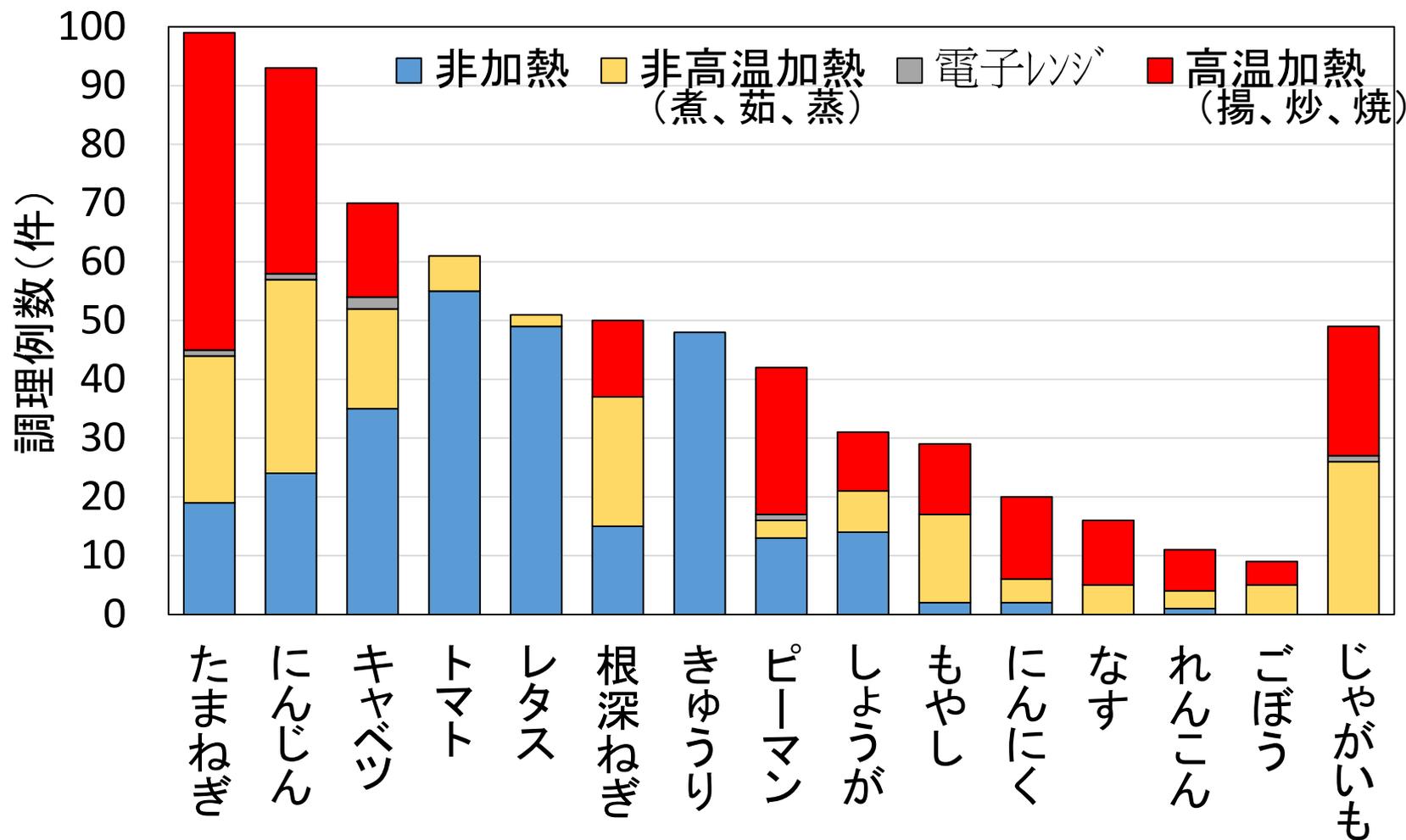
a:陰膳法による推定。調査はいずれも2002年。

b:トータルダイエツスタディー(マーケットバスケット法)による。

*平均値

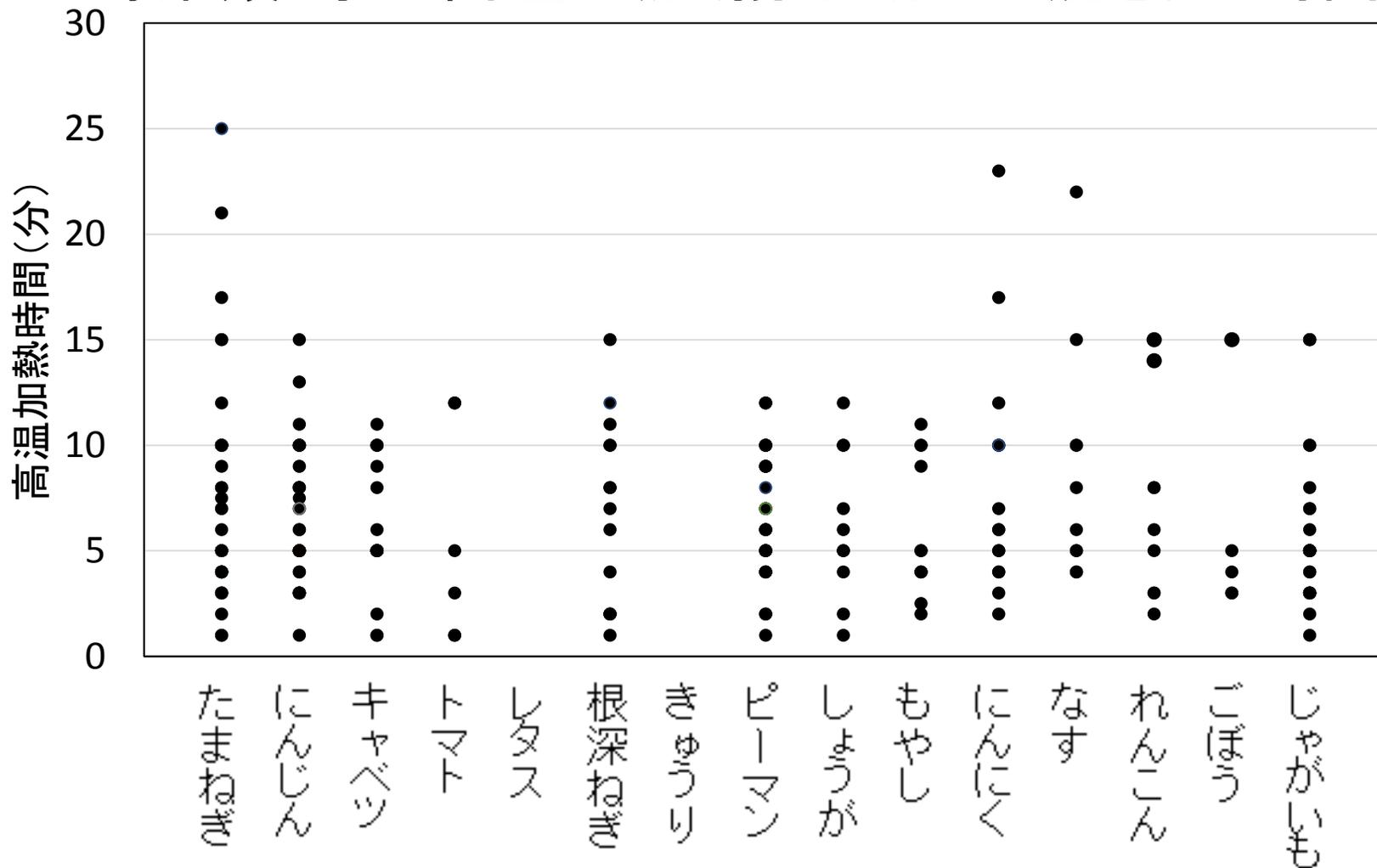
食事記録の解析結果 —野菜類の加熱方法—

野菜類・じゃが芋の調理例数(加熱調理方法別)



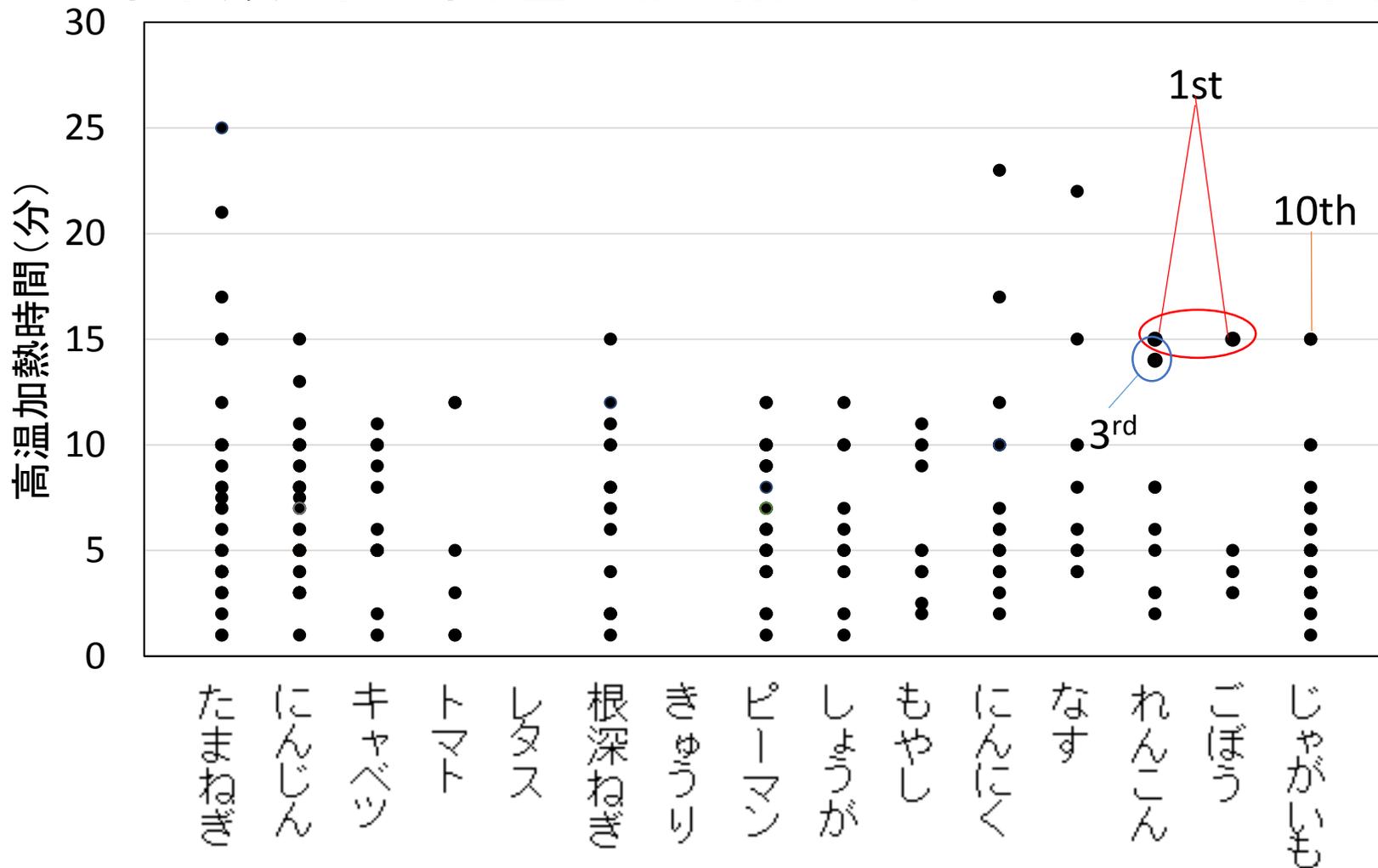
食事記録の解析結果 — 野菜類の加熱時間 —

野菜類・芋の高温加熱(揚げ・炒め・焼き)の時間



食事記録の解析結果 — 野菜類の加熱時間 —

野菜類・芋の高温加熱(揚げ・炒め・焼き)の時間



食事記録の解析結果 —食品摂取量—

- 高温加熱野菜・じゃがいもの摂取量（解析対象73人）
摂取者平均（調理前重量換算）
119±83 g（摂取者 48人, 最小-最大：12-342 g/日）
- 菓子類・嗜好飲料類の摂取者数および摂取量
（解析対象者数 115人）

食品	摂取者数	摂取者平均±SD(g)	最小-最大(g)
菓子類	70	53±63	1-331
コーヒー	59	333±187	99-1260
緑茶	45	447±402	106-2400
麦茶	36	292±183	100-1000

アクリルアミド曝露量の要因解析

重回帰分析

- ◆解析対象：食材重量記録者77人（黒糖含むパン摂取者を除く）
- ◆従属変数：アクリルアミド曝露量 (ng/day)
- ◆説明変数：菓子摂取量(x_1), 茶類摂取量(x_2), コーヒー摂取量(x_3),
高温加熱芋・野菜類摂取量 (x_4) (ng/day)
- ◆変数選択法：ステップワイズ法 (F=2)

結果

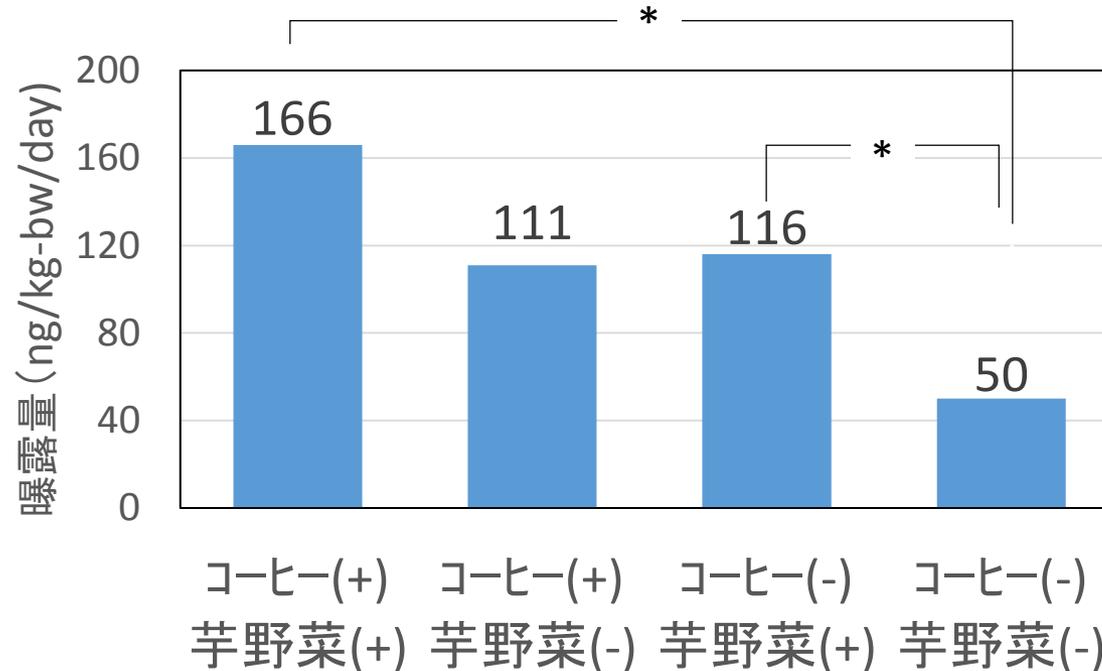
$$Y = 16.1 \times x_3 + 26.9 \times x_4 + 7216 \quad (p=0.01)$$

回帰式

変数名	自由度調整済み決定係数 $R^2 = 0.094$		t	有意確率
	偏回帰係数	標準偏回帰係数		
コーヒー摂取量	16.162	6.309	2.562	0.012
高温加熱芋・野菜摂取量	20.927	15.125	1.780	0.079
定数	7.216×10^3	1.988×10^3	3.629	0.001

アクリルアミド曝露量の要因解析

コーヒーとじゃが芋・高温野菜の摂取の有無による曝露量の比較



Steel-Dwassの方法
による多重比較
*p<0.01で有意

対象群各対の検定統計量

	第1群	第2群	第3群	第4群
第1群	-	1.452	1.372	4.102*
第2群	-		0.832	1.246
第3群	-			3.299*

まとめ

- 統計手法によるアクリルアミドの長期平均摂取量の分布を推定するとともに、陰膳に基づく成人の1日摂取量を得た。
- モデルによる成人の推定アクリルアミド摂取量は、24時間陰膳に基づく推定摂取量に近い値であった。
- 長期平均のアクリルアミド摂取量には、飲料および高温加熱したじゃがいも芋・野菜類の摂取がより大きく寄与する可能性が示された。

陰膳調査メンバー

高度技能専門員

鄭 雅史 (国環研 [当時])

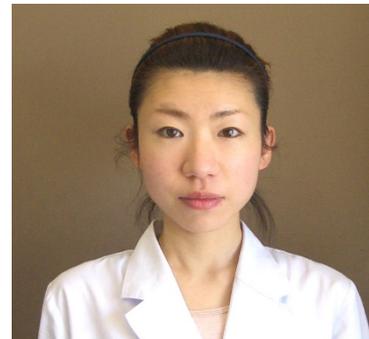
管理栄養士

照井 美穂 (国環研 [当時])

中本 由紀子 (国環研 [当時])

篠原 暁子 (早稲田大)

宇山 香 (相模女子大)



謝辞

■ ご指導、助言を頂いた方々

- 山田友紀子 先生
- 農業・食品産業技術総合研究機構 水上裕造 先生
- 国立健康栄養研究所 瀧本 秀美 先生
- 国立保健医療科学院 浅見 真理 先生
- 京都大学環境安全保健機構 川村 孝 先生
- 国立医薬品食品衛生研究所 広瀬 明彦 先生
- 食品安全委員会事務局の皆様