

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品摂取により発症する新規アレルギー／アレルギー様反応に関する調査研究（課題番号：1404） （研究期間：平成26年度～平成27年度）
主任研究者名	研究者名：柘植 郁哉 所属機関：藤田保健衛生大学

食品によるアレルギーは、本来食品中の蛋白アレルギーに対する免疫学的機序を介した反応に基づくが、近年、蛋白アレルギーによる古典的食物アレルギーの概念では説明しがたい、新規アレルギー／アレルギー様反応の報告が相次いでいる。また、食品中の蛋白アレルギーによるアレルギー反応であっても、その感作の成立には、経口ルート以外の経皮、経気道ばく露が重要であることを示す事例が着目されている。本研究では、新規アレルギー／アレルギー様反応に関する、これまでに行われている国内外の研究や調査結果、疫学情報、海外における取組状況等を収集するとともに、疫学調査を実施することにより、実態と問題点を把握し、これらを踏まえて機序解明とバイオマーカーの探索に関する基礎的検討を行った。

食物中の非蛋白低分子化合物による即時型アレルギー成立の機序としては、(1)低分子化合物が他の蛋白と結合してハプテンとして働く、(2)低分子化合物がマスト細胞や好塩基球等の機能を修飾することで、他の食物由来蛋白によるアレルギー反応を増強する、(3)低分子化合物製品に混入する蛋白によりアレルギーが惹起される、といった機序が考えられる。今回の検討対象品目において、糖アルコールのアレルギーはIgEと血液中の非血球成分の両者に依存性であることより、(1)のハプテン-キャリアーの機序で発症することが示唆された。一方、エリスリトールは、その摂取により、腸管透過性の亢進、ムチン量の減少及び腸管細菌叢の変化がみられたことから、他の原因による食物アレルギーを増強する可能性も示唆された。

コチニールアレルギーは、夾雑物を含むコチニール色素刺激で好塩基球活性化試験（BAT）とIgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)が陽性を示したのに比し、純度の高いカルミン酸刺激での反応は微弱であったことから、夾雑物を原因とするアレルギーであることが示唆された。同じく夾雑物アレルギーと想定されるキチン、キトサン及びグルコサミンについては、今回の検討では、健康食品等に使用される原材料は高度に精製されており、甲殻類タンパク質の混入はないことが示されたことから、これら自体が原因物質である可能性についても検討する必要があると考えられた。

環境中のアレルギーにより経皮又は経気道的に感作され、食物アレルギーにより発症するアレルギー／アレルギー様反応については、豆乳により全身症状をきたす大豆アレルギー、マダニ咬傷により経皮感作されて起こる遅発性食肉アレルギー並びに化粧品中に含まれ経皮感作により発症する加水分解小麦、米ぬか及びパパインについて検討した。米ぬかアレルギーについては、コメの52kDaグロブリンが主に米ぬかに、19kDaグロブリンが白米に存在すること、経皮感作が推測される米ぬかアレルギー患者においては、52kDa及び19kDaグロブリンに対するIgEが検出されるなどの知見を得た。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品摂取により発症する新規アレルギー／アレルギー様反応に関する調査研究 (研究期間：平成26年度～平成27年度)
主任研究者名	所属：藤田保健衛生大学 氏名：柘植 郁哉（研究課題番号：1404）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間 平成26年度～平成27年度

2 研究目的

食品摂取により発症するアレルギーは、典型的には食品中の蛋白アレルギーに対する免疫学的機序を介した反応に基づくが、近年、国内外を問わず、蛋白アレルギーによる古典的食物アレルギーの概念では説明しがたい、食品に起因する新たなアレルギー／アレルギー様反応の報告が相次いでいる。これらの中には発症機序が明らかでなく、免疫学的機序によるアレルギー反応かどうかさえ必ずしも明らかになっていないものも存在する。これら既報の食品に由来する新規アレルギー／アレルギー様反応の再発防止、あるいは今後発症する可能性のある類似のアレルギー／アレルギー様反応の予知、予防には、これらの新規アレルギー／アレルギー様反応の現状把握と発症機序の解明が不可欠であり、こうした研究は、既存或いは新規開発される食品のリスク評価に極めて有用と考えられる。本研究では、食品の摂取によるアレルギーに関連する健康への影響の評価に資することを目的に、新規アレルギー／アレルギー様反応に関する、これまでに行われている国内外の研究や調査結果、疫学情報、海外における取組状況などを収集するとともに、疫学調査を実施して、実態と問題点を把握し、これらを踏まえて機序解明とバイオマーカーの探索に関する基礎的検討を行うものである。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
1 食品添加物などタンパク以外の分子に起因するアレルギー／アレルギー様反応	(1) エリスリトール等甘味料	板垣康治（北海道文教大学） 中島陽一（藤田保健衛生大学）
	(2) コチニール	手島玲子（徳島文理大学）
	(3) タートラジン色素	犬尾千聡（藤田保健衛生大学）
	(4) イチョウ葉（ギンコール酸）	安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）
	(5) 葉酸	安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）
	(6) キトサン/グルコサミン	安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）
	(7) ポリビニルピロリドン	手島玲子（徳島文理大学）
2 環境中のアレルギーに	(1) 大豆アレルギーGly m 4	近藤康人（藤田保健衛生大学）
	(2) 遅発性食肉アレルギー	宇理須厚雄（藤田保健衛生大学）

より経皮、あるいは経気道的に感作され、食物アレルギーにより発症するアレルギー／アレルギー様反応	(3)加水分解小麦など、化粧品中の食品由来物質	手島玲子（徳島文理大学）
---	-------------------------	--------------

4 倫理面への配慮について

本研究は、藤田保健衛生大学医学研究倫理審査委員会の承認を受け（HM14-273）、ヒトの検体を用いる研究においては、書面による説明と同意を得て行った。

II 研究内容及び成果等

1 食品添加物などタンパク以外の分子に起因するアレルギー／アレルギー様反応

1) 個別課題名：エリスリトール等甘味料；本課題については、基礎的検討を板垣康治（北海道文教大学）が、患者検体を用いた検討を中島陽一（藤田保健衛生大学）が担当した。

1)-1 エリスリトール等甘味料の基礎的検討（研究担当者名：板垣康治（北海道文教大学））

エリスリトールやキシリトールなどの糖アルコール、ステビア、甘草などの天然甘味料、アセスルファムK、アスパルテームなどの人工甘味料は、ともに低カロリー、低う蝕性、腸内環境の改善を目的として様々な商品に利用され、消費量も拡大している。そこで、本研究では、糖質系甘味料に分類される糖アルコール（ソルビトール、マンニトール、マルチトール、キシリトール、エリスリトールなど）、オリゴ糖（フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖など）、及び非糖質系甘味料に分類される天然甘味料（ステビア、甘草）、人口甘味料（サッカリン、アスパルテーム、アセスルファムK、スクラロース）を対象として、食物アレルギー発症の実態を把握し、そのリスク評価を行った。

文献調査では、医学中央雑誌による検索では、エリスリトールのアレルギーに関する文献が14件、オリゴ糖に関するアレルギーが34件見つかった。また、PubMedによる検索では、エリスリトール＋アレルギーが8件、オリゴ糖＋アレルギーが295件、サッカリン＋アレルギー28件、アスパルテーム＋アレルギー8件などであった。

基礎的検討

1. 各種糖アルコールの腸管透過性

エリスリトールは他の人工甘味料に比べ速やかに吸収、排泄されるという報告があり、その吸収量の差がアレルギー発症の頻度に影響している可能性が考えられる。Caco-2細胞は、ヒト大腸ガン組織から樹立された上皮細胞株である

が、透過性膜上に培養すると小腸上皮細胞様に分化し、細胞間にはタイトジャンクションが形成される。そこで、Caco-2 細胞を用い、エリスリトールがタイトジャンクションに与える影響およびエリスリトールとキシリトールの腸管透過性の違いについて検討した。試験はコントロール (C) 群、キシリトール 10 mM (X10) 群、エリスリトール 10 mM (E10) 群、キシリトール 100 mM (X100) 群、エリスリトール 100 mM (E100) 群、キシリトール 500 mM (X500) 群、エリスリトール 500 mM (E500) 群とし、刷子縁膜側に添加した。また、タイトジャンクション透過マーカーとして Lucifer Yellow (LY) を各群 100 μ M 添加した。サンプル添加 0、15、30、60、120 分に経上皮電気抵抗値 (TER) を測定し (図 1)、120 分後に基底膜側の溶液を回収し、LY 濃度を測定した (図 2)。コントロール群および X10 群に比べ E500 群で TER が有意に低下し、LY 透過量が増加した。しかし、キシリトールおよびエリスリトールの同濃度間では有意な差は認められなかった。これらの結果から、エリスリトールを高濃度で添加した場合、タイトジャンクションに何らかの影響を与えることが示唆され、タイトジャンクション経由の物質透過が促進される可能性が考えられた。今後は基底膜側のキシリトールおよびエリスリトール濃度を測定し、糖アルコールが実際にどの程度透過しているか測定し、糖アルコールの種類と透過量の違いについて検討していく必要がある。また、ヒト小腸上皮細胞を用いて同様の試験を実施して、アレルギー発症との関連性を明らかにすることが望まれる。

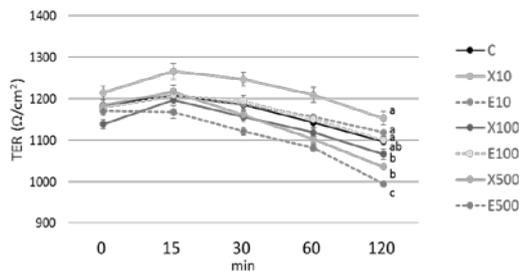


図 1. TER の経時的変化
刷子縁膜側に各人工甘味料添加後、0、15、30、60、120 分後の経上皮電気抵抗値。平均値±標準誤差 (n=3-6)。a、b、c: Tukey-Kramer の検定により異なるアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)。

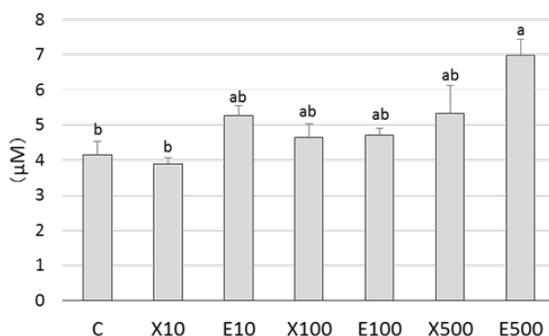


図 2. Lucifer Yellow の透過
各人工甘味料添加後 120 分の基底膜側溶液中の Lucifer Yellow 濃度。平均値±標準誤差 (n=3-6)。a、b: Tukey-Kramer の検定により異なるアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)。

2. 各種糖アルコールの腸内菌叢への影響

動物飼育および動物試験：ICR マウス 4 週齢の雄を 6 匹購入し、1 週間の馴化後体重を指標に 2 群に分け、標準食群とエリスリトール群とした。試験期間

中は、餌は標準食群・エリスリトール群共に摂餌用の CE-2 を自由摂取とした。給水については、標準食群は水道水を自由摂取とし、エリスリトール群は被験物質のエリスリトールを 0.45g/5mL/day の濃度で水道水に溶かしたものを、微量給水瓶へ入れ夕方セットし翌朝までの飲みきりとし無くなり次第、水道水へ交換した。試験期間中のマウスの体重測定は 1 回/週で行った。試験期間中の糞便回収は 1 回/2 週とし、ケージ交換後 24 時間分を全量回収し解析まで凍結保存した。体重測定の結果、エリスリトール投与群のほうが若干、低めに推移した。

- a. マウス糞便のフローラ解析：入手したマウス糞便を凍結乾燥後粉碎し、100mg 量り取り DNA 抽出キットの取扱説明書に従い行った。DNA の濃度を測定し、検体間のばらつきが見られなかったため、すべての検体を 100 倍希釈にて行った。Day28 のエリスリトール群 (-1、-2、-3) において CP 値の異常値が見られたため、50 倍希釈にて再度行った結果、改善されたので 50 倍希釈の値を採用した。リアルタイム PCR は、キットの取扱説明書に従いリアルタイム PCR アッセイ（プライマー濃度 0.5 uM each、pre incubation 95°C・5 分、PCR サイクル 95°C・10 秒、60°C・10 秒、72°C・10 秒×45 サイクル）を行った。解析対象は全菌種その他、Firmicutes、Bacteroidetes（門）とし、合計 3 菌種の解析を行った。解析して得られた CP 値から ΔCt 法により、全菌種に対する相対比率(%)を算出した。※計算式= $2^{\Delta Ct}$ (サンプル HDA の CP 値-サンプルターゲットの CP 値) ×100 測定した結果、コントロール群、エリスリトール群との間で、バラツキはあるものの、顕著な差は認められなかった。
- b. マウス糞便中のムチン測定：入手したマウス糞便を凍結乾燥後粉碎し、100mg 量り取り Fecal Mucin Assay Kit の取扱説明書に従い行った。糞便中のムチン含量はエリスリトール投与により顕著に減少した（図 3）。

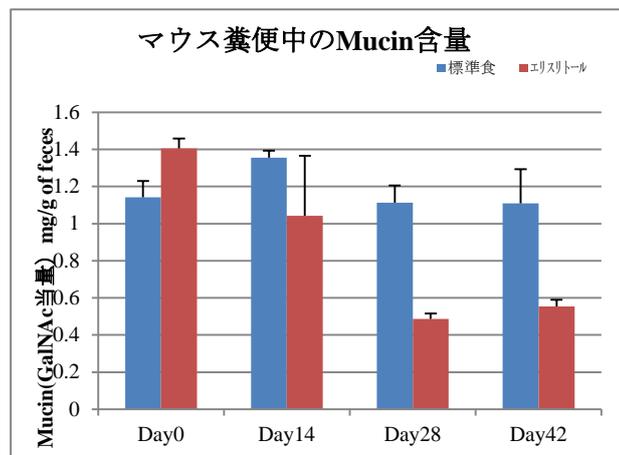


図 3. マウス糞便中のムチン含量

- c. マウス糞便中の IgA 測定：入手したマウス糞便を凍結乾燥後粉砕し、Mouse IgA ELISA Kit の取扱説明書に従い 50mg/500uL PBS にて抽出を行った。エリスリトール投与群の方が IgA 量は低い傾向が認められた（図 4）。

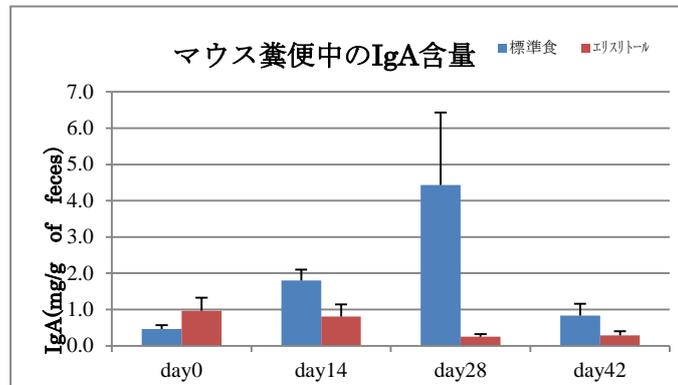


図 4. マウス糞便中の IgA 含量

- d. マウス盲腸内容物のフローラ解析：入手したマウス盲腸内容物を凍結乾燥後粉砕し、100mg 量り取り DNA 抽出キットの取扱説明書に従い行った。DNA の濃度を測定し、検体間のばらつきが見られなかったため、2 検体を選択し、100、200、400、800 倍希釈して希釈検討を行った。希釈検討の結果、直線性の良好な 200 倍希釈を選択した。リアルタイム PCR は、キットの取扱説明書に従いリアルタイム PCR アッセイ（プライマー濃度 0.5 uM each、pre incubation 95°C・5 分、PCR サイクル 95°C・10 秒、60°C・10 秒、72°C・10 秒×45 サイクル）を行った。解析対象は全菌種その他、Firmicutes、Bacteroidetes（門）とし、合計 3 菌種の解析を行った。解析して得られた CP 値から ΔCt 法により、全菌種に対する相対比率(%)を算出した。※計算式 = $2^{-(\text{サンプル HDA の CP 値} - \text{サンプルターゲットの CP 値})} \times 100$ 糞便中のフローラ解析結果と同様、コントロール群とエリスリトール投与群との間で顕著な差は認められなかった。
- e. マウス盲腸内容物中のムチン測定：入手したマウス盲腸内容物を凍結乾燥後粉砕し、すべてのサンプルにおいて 100mg に満たなかったため、50mg 量り取り Fecal Mucin Assay Kit の取扱説明書に従い行った。マウス盲腸内容物中のムチン含量は、糞便中ほど顕著ではないものの、標準食を与えたコントロール群と比較して、エリスリトール投与群の方が低い傾向が認められた（図 5）。

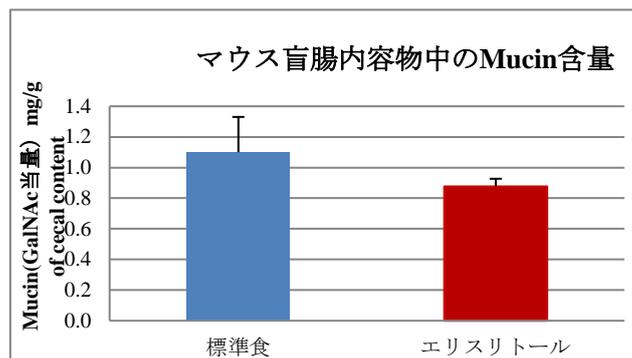


図 5. マウス盲腸内容物中のムチン含量

- f. マウス盲腸内容物中の IgA 測定: 入手したマウス盲腸内容物を凍結乾燥後粉砕し、Mouse IgA ELISA Kit の取扱説明書に従い 50mg/500uL PBS にて抽出を行った。マウス盲腸内容物中の IgA 含量はエリスリトール投与群の方が顕著に低かった (図 6)。

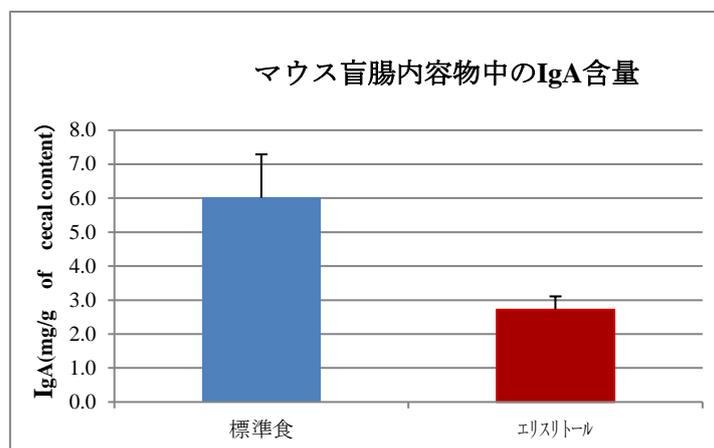


図 6. マウス盲腸内容物中の IgA 含量

- g. 次世代シーケンス解析: マウス糞便由来ゲノム DNA 溶液をプロトコルに従って Amplicon PCR を行った。その後の作業についてもプロトコルにしたがって行った。シーケンス実施後は、相同性 97%にて OTU クラスタリング、代表配列を決定後、微生物データベースは SILVA を使用し、各 OTU を Kingdom (界) / Phylum (門) / Class(綱)/Order (目) / Family(科) / Genus(属) / Species (種)の各階層の Taxonomy 情報を取得した。16S rRNA はすべてのバクテリアで持つ配列であり、また 16S rRNA は多様性を持つ配列である。従って、16S rRNA 配列を調べることにより、その情報から含まれる微生物を検出・同定することができる。本試験の 16s メタゲノムシーケンスでは、v3-v4 領域 (約 460bp) をユニバーサルプライマーで増幅し、シーケンシングを行って微生物データベースで相同性検索を行い、同定された微生物を検体ごとにまとめて評価した。

生物の分類階級は、大きく界・門・綱・目・科・属・種とあり、本試験で

はバクテリア界以下の門・綱・目・科・属・種において同定された結果をまとめた。門の解析では、細菌叢に大きな変化がみられる場合に結果を見やすい利点がある。本試験ではエリスリトール 28 日摂取群において **Candidate division TM7** 門の増加、また 28 日、42 日のエリスリトール摂取群において **Actinobacteria** 門の増加が認められた。**Actinobacteria** 門はビフィズス菌などを含む門であり、**Candidate division TM7** は腸内で確認されたのは近年であるが、最近歯周病、炎症性腸疾患 (IBD) との関係が報告されている門である。科の解析では、より分類上細かく分かれているが、**Actinobacteria** 門下流の **Bifidobacterium** が増えていることが確認できた。その他、微量に含まれる菌種については、エリスリトール摂取による増減を含めてさらなるデータ解析が必要である。

3. 腸内吸収後のエリスリトールの挙動;文献等で調査を行ったが、腸内吸収後の挙動を示す知見等は得られなかった。

4. 発酵食品におけるエリスリトール生成過程と中間代謝産物の抗原性および抗原交差性;文献等で調査を行ったが、腸内吸収後の挙動を示す知見等は得られなかった。

5. 今後の課題

- a. Caco2 細胞、およびヒト小腸上皮細胞を用いたキシリトールおよびエリスリトールの透過性の差異を検討することで、アレルギー発症との関連性を明らかにする。
- b. 各種糖アルコールの腸内菌叢への影響について、エリスリトールとキシリトール投与群との比較を実施し、アレルギー発症に結びつくデータを集積する。また次世代シーケンサーから排出された塩基配列の生データについて、各階層の中から、門、属における PCoA 解析 (Principal Coordinate Analysis = 主座標分析)、属におけるクラスタリング解析、また n=3 のリード数を積み上げにて比較し、門および属にて群間の比較を行いアレルギー発症の可能性を検討する。
- c. 腸内吸収後のエリスリトールの挙動、発酵食品におけるエリスリトール生成過程と中間代謝産物の抗原性および抗原交差性については、今後も調査を継続し、さらに必要に応じてモデル実験等を実施し、体内におけるキャリアタンパク質の同定、および感作抗原を明らかにする必要がある。

1)-2 エリスリトール等甘味料アレルギー患者の免疫学的検討 (研究担当者名: 中島陽一 (藤田保健衛生大学))

本課題では、アレルギー専門医 3093 名を対象とするアンケートを行い、26 名の専門医から 29 例のエリスリトール等甘味料アレルギー患者を診療中とお答えいただいた。このうち検体提供にご協力いただけた 9 例 (エリスリトールアレルギー)

ギー7例、キシリトールアレルギー1例、ソルビトールアレルギー1例；表1）を対象に、患者検体を用いた検討を行った。

表1 対象 甘味料アレルギー患者

症例	甘味料	年齢	性	症状	負荷試験	SPT ¹	BAT ²
E1	エリスリトール	8	女	皮膚・呼吸器・An ³	陽性	陽性	陽性
E2	エリスリトール	11	男	皮膚・呼吸器・An	陽性	陽性	陽性
E3	エリスリトール	23	女	皮膚・呼吸器・An	未 ⁴	陽性	陽性
E4	エリスリトール	16	女	腹部症状	未	陰性*	陰性
E5	エリスリトール	5	女	皮膚・呼吸器・An	陽性	陰性	陰性
E6	エリスリトール	5	男	皮膚・呼吸器・An	未	陰性	陰性
E7	エリスリトール	14	女	皮膚・呼吸器・An	未	陰性	陰性
X1	キシリトール	2	女	皮膚・呼吸器・An	未	陽性	陽性
S1	ソルビトール	3	女	皮膚・呼吸器・An	陽性	未	陰性

1 SPT;プリックテスト、2 BAT;好塩基球活性化試験、3 An;アナフィラキシー、4 未；未施行、*；皮内テスト陽性

好塩基球活性化試験（BAT）は、Allergenicityキット（Beckmann Coulter）に標識抗 CD63 抗体（Beckmann Coulter）を加えた Flow cytometry により、アレルギー刺激後の CD203c および CD63 の発現増強を測定した。血球洗浄や Wortmannin 添加などの操作を加えて行った。ヒト血清アルブミンの糖アルコール付加は、糖の還元的アミノ化により行った。

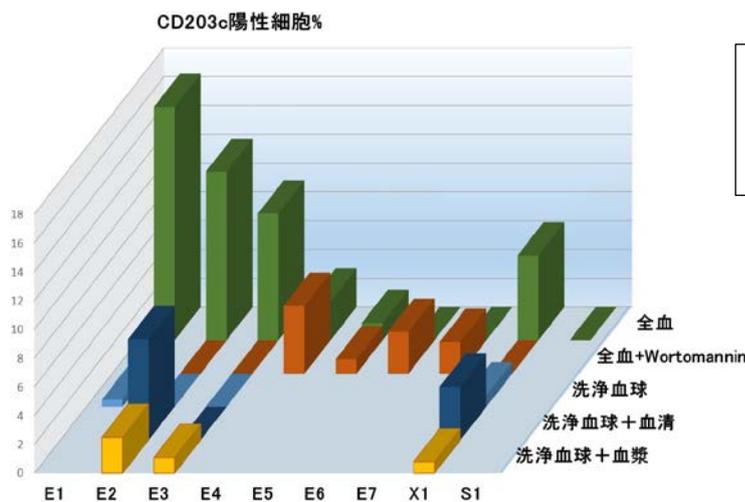


図7 糖アルコールアレルギー患者の好塩基球活性化試験結果

CD203c を指標にした BAT の結果を図 7 に示した。エリスリトールアレルギーの 3 症例（E1、E2、E3）およびキシリトールアレルギーの 1 例（X1）は、糖アルコールの刺激により、弱いながらも有意な CD203c 発現の増強を認め

た。これに対しエリスリトールアレルギーの4症例（E4-E7）及びソルビトールアレルギーの1例（S1）では有意な活性化がみられなかった。有意な反応を示した4例で、Wortmanninの添加によりIgEレセプターからのシグナルを阻害すると反応は完全に消失し、糖アルコール刺激による好塩基球の活性化反応がIgE依存性であることが示唆された。また、血球を洗浄してから糖アルコールで刺激しても好塩基球の活性化は見られず、血漿または血清を加えると若干ながら反応性が回復することから、本反応には血球のみならず、血液中の液性成分が必要であることが示唆された。

糖アルコールによる好塩基球の活性化が、IgEとともに血液中の液性成分にも依存することから、低分子である糖アルコールと血液蛋白との複合体が好塩基球上のIgEをクロスリンクして初めて、好塩基球が活性化されると考えられたため、人血清アルブミンに、エリスリトール、キシリトール、ソルビトールを結合して、イムノブロットを行い患者血清との反応を検討したが、有意な反応は見られなかった（データ掲載せず）。

糖アルコールは低分子であり、それ自体で抗体産生を惹起しえないし、たとえキャリア蛋白の存在下でIgE抗体が産生されても、惹起相で、摂取直後に好塩基球やマスト細胞上のIgEをクロスリンクして脱顆粒させ即時型反応を起こす機序など、糖アルコールのアレルギーには不明な点が多い。今回我々は、糖アルコールアレルギーの病態を解析して、よりよい検査法、治療法を開発する目的で、エリスリトール、キシリトール、ソルビトールアレルギー患者を対象に好塩基活性化試験による検討を行った。検出し得た好塩基球の活性化は軽微なもの、プリックテストの結果とよく相関し、また、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitorであり、IgEを介する好塩基球の活性化を阻害するWortmanninの添加により消失することから、糖アルコールにより惹起される病態をよく反映するものと考えられた。また、こうした糖アルコールによる好塩基球の活性化は、Wortmanninに消失するのみならず、血球の洗浄によっても消失し、糖アルコールが何らかの血液中の非血球成分と結合し、好塩基球上のIgEをクロスリンクすることで惹起されることが示唆された。糖アルコールを用いたBATはプリックテストの結果とよく相関し、診断に有用であるばかりでなく、in vitroの検討である利点を生かして、糖アルコールの病態解明に役立つと考えられた。さらに症例を集積して検討を加える必要がある。

2) 個別課題名：コチニール色素 手島玲子（徳島文理大学）

コチニール色素（カルミン酸）に比べ、カルミン（カルミン酸のアルミニウムレーキ化合物）のタンパク質含量が高いことが報告されていたが、市販の化粧品等の中の含有量に関しての実態調査は行われていないため、本研究で、コチニール、カルミンに関して、化粧品中のタンパク質含量の測定を行うことを第一の目的とした。また、本研究で調査されたコチニール色素またはカルミンによるアレルギー発症を既往とする方々から血液の提供がなされた場合、カルミン酸等による

BAT に続いて人型マスト細胞を用いたレポーターアッセイ(IgE crosslinking-induced luciferase expression、EXiLE 試験)を行い、IgE 抗体産生性について検討することを第二の目的とした。研究の進捗状況について、以下に記す。

(i) タンパク質定量

コチニールに関しては、市販のカルミン酸 1 種、カルミンに関しては粧工連より供与いただいたサンプル（原料 2 種及び製品中にカルミンを 2-3%含む検体 6 種または 5%含む検体 1 種）、並びに食品添加物用として購入したカルミン 1 種、すべてあわせて 11 種についてタンパク質含量の測定を行った。ケルダール法で測定したタンパク質含量は、カルミン酸で 0.4%、化粧品用カルミン原料で 29.7%、化粧品製品（カルミン 2-3%含）で 0.52%、化粧品製品（カルミン 5%含）で 1.3%、食品添加物用カルミンで 26.5%の結果が得られた（表 2）。

表 2 ケルダール法によるカルミン酸（コチニール抽出物）、カルミン中のタンパク質の定量結果

No.	納入日	試薬名	販売元	販売元コード	CAS No.	Lot No.	容量	個数	ケルダール法
1	2015/6/10	カルミン酸	和光純薬工業	033-08251	1260-17-9	PDK5744	1g	3	0.4%
2	2015/6/22	カルミン(精製前)	DAITO KASEI				5g	1	29.7%
3	2015/6/22	カルミン(精製後)	DAITO KASEI				5g	1	30.7%
4	2015/6/22	カルミン含有物(カルミン:0.8-3.5%含有)	BASF社					1	0.4%
5	2015/6/22	カルミン含有物(製品A、カルミン:2.2%含有)						1	0.4%
6	2015/6/22	カルミン含有物(製品C、カルミン:2%含有)						1	0.6%
7	2015/6/22	カルミン含有物(製品D、カルミン:3%含有)						1	0.6%
8	2015/6/22	カルミン含有物(製品F、カルミン:2%含有)						1	0.4%
9	2015/6/22	カルミン含有物(製品G、カルミン:3%含有)						1	0.7%
10	2015/6/22	カルミン含有物(製品M、カルミン:5%含有)						1	1.3%
11	2015/6/23	食品添加物用カルミン	クリスチアノハンセン(CHRHANSEN)	GIN:683876		3104664	2g程度	1	26.5%

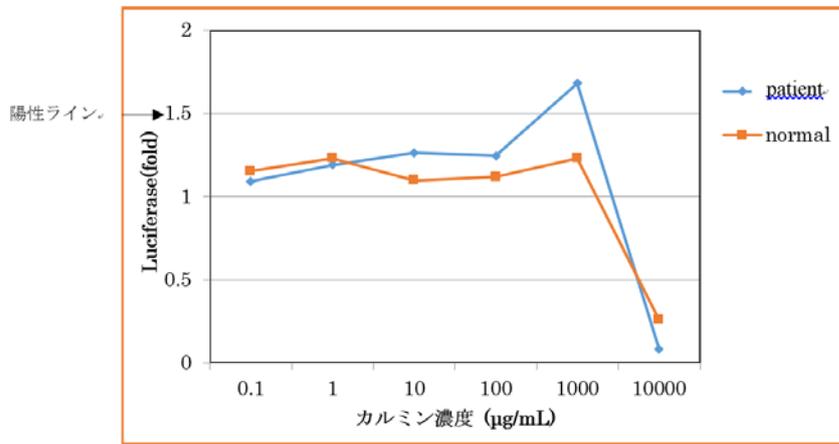
(ii) BAT

コチニール等患者血液に関して、二次調査による 12 名の情報を整理したところ、5 名の方は、同一の先生からの情報で、3 名分については、すでに論文発表されていて、血清がほとんどないということであった。他の 7 名のうち、5 名については、血液の供与（基礎研究への利用）に同意が得られており、血液の入手が可能な状態となった。実際に提供いただいた血液は 3 種であり、藤田保健衛生大学で、BAT 解析が行われ、引き続き、手島により、EXiLE 法での解析を行った。

EXiLE 法は、ヒト化マスト細胞として、転写因子 NF-AT の制御下にホタル

ルルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子およびヒト FcεRI 遺伝子を安定的に導入したラット培養マスト細胞株 (RS-ATL8 細胞) を用い、各種抗原溶液により刺激したのち、発光量を測定した。1 名の患者が、カルミンによる惹起で

図 8 カルミン/コチニール感受性患者血清とカルミンによるEXiLE反応の一例



BAT も EXiLE も陽性となり、カルミンに残存するタンパク質部分に反応したものと思われた(図 8)。他の 2 名の患者は、BAT, EXiLE とも陰性であった。

3) 個別課題名：タートラジン 犬尾千聡 (藤田保健衛生大学)

文献検索では、タートラジンの過敏反応で直接的に症状が誘発されたという報告は少ない。気管支喘息の悪化との関係が疑われていたが、過去の研究ではプラセボとの差がないことが示されている。しかし、今回のアレルギー専門医に対する全国調査では、タートラジンによる過敏症状疑いの報告を 9 例把握しており、潜在的な有症状患者の存在が示唆された。慢性蕁麻疹患者では、タートラジンは IgE のクロスリンクによる末梢血好塩基球活性化を増強することが示されており、過敏性反応に対する関与が疑われ、解決が望まれる。全国調査の結果をもとに、患者検体の提供をお願いし、これまでに、1 例の BAT による検討を行った(図 9)。

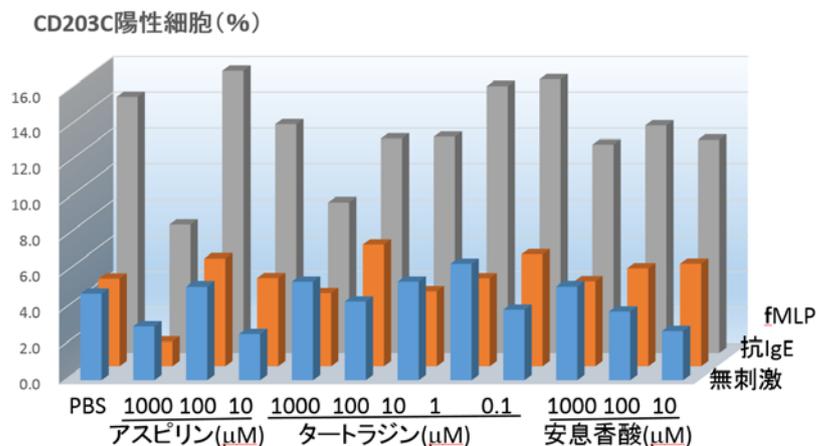


図9 タートラジン、アスピリン、安息香酸の好塩基球活性化増強効果

無刺激（青のバー）、抗 IgE 抗体刺激（茶のバー）、fMLP 刺激（グレーのバー）した患者全血に、各種濃度のアスピリン、タートラジン、安息香酸を加え CD203c の発現を指標に、好塩基球活性化の増強効果を検討した。

結果は、本患者は fMLP 刺激では好塩基球活性化がみられるにもかかわらず IgE の架橋では活性化の起きない、いわゆる“low responder”であったことが一因の可能性はあるが、いずれの刺激に対してもタートラジン、アスピリン、安息香酸による増強効果は見られなかった。さらに症例を集積して検討する必要があると思われた。

4) 個別課題名：イチョウ葉 安達玲子(国立医薬品食品衛生研究所)

イチョウ葉エキスは、欧州では医薬品としても認められており、記憶障害等に対して有効であるとされている。但し、成分の1つであるギンコール酸はアレルギー原因物質であることが知られており、イチョウ葉エキス製品中の濃度は 5ppm 以下と規定されている。わが国においても（財）日本健康・栄養食品協会が同様の基準を設けている。しかし、イチョウ葉エキスによる皮膚アレルギー等の症例の報告は少数であるが存在する。そこで、26年度において、これまでに国内及び海外において論文等で報告されている健康危害事例（アレルギー／アレルギー様反応と思われるもの）について調査した。その結果、5例の報告が確認された。また、国内の専門医に対する調査では8例の回答を得た。

27年度も同様に健康危害事例に関する調査を行ったが、新たな報告は無かった。

症例数が少ないため、研究期間中に患者検体を入手することができなかったが、今後患者検体を入手できた場合には、イチョウ葉エキス（ギンコール酸）に対する反応性を、BAT あるいは EXiLE 法を用いて検討し、アレルゲンの特性や発症機序に関する解析を進めることが重要である。

5) 個別課題名：葉酸 安達玲子(国立医薬品食品衛生研究所)

葉酸は水溶性ビタミンの1種である。栄養補助を目的としてサプリメント類に配合されているが、アレルギーの原因物質となることが知られている。重篤なアナフィラキシー症状を呈する症例も報告されているため、注意が必要である。そこで、26年度において、これまでに国内及び海外において論文等で報告されている健康危害事例(アレルギー/アレルギー様反応と思われるもの)について調査した。その結果、13例の報告が確認された。また、国内の専門医に対する調査では2例の回答を得た

27年度も同様の健康危害事例の調査を行った。その結果、葉酸を含むサプリメントの摂取によりアナフィラキシーを呈した症例が、海外で1例新たに報告されていた。

症例数が少ないため、研究期間中に患者検体を入手することができなかったが、今後患者検体を入手できた場合には、葉酸に対する反応性を、BATあるいはEXiLE法を用いて検討し、アレルゲンの特性や発症機序に関する解析を進めることが重要である。

6) 個別課題名：キトサン/グルコサミン 安達玲子(国立医薬品食品衛生研究所)

キトサン(ポリ-β1→4-グルコサミン)は、主に甲殻類外殻から精製される多糖であるキチン(ポリ-β1→4-N-アセチルグルコサミン)を脱アセチル化して製造される。腸内でコレステロール等を吸着し排出を促進するとされている。また、グルコサミンは、主にキチンを分解して製造される。生体においては、保湿物質、あるいは軟骨のようなクッション作用を持つ組織の成分として重要である。キトサン含有健康食品については、これまでに、アナフィラキシー症状を呈した症例が報告されているほか、キチン含有外用製品の使用による皮膚炎に関して、原因物質はキトサンであるという報告がある。そこで、26年度において、国内及び海外において論文等で報告されている健康危害事例(アレルギー/アレルギー様反応と思われるもの)について調査した。その結果、キトサン及びグルコサミンについて3例の報告が確認された。国内の専門医に対する調査では、キトサン2例、グルコサミン3例の回答を得た。

キトサン、グルコサミンの原料となるキチンは、主にエビ・カニ等の甲殻類外殻から精製される。この時、食物アレルゲンである甲殻類タンパク質が混入する可能性があり、そのためにキトサンあるいはグルコサミン含有健康食品によりアレルギー症状を呈することも考えられる。そこで、市販のキトサン含有健康食品、及びグルコサミン含有健康食品それぞれ20検体(錠剤、カプセル、粉末等)を対象として、甲殻類タンパク質の混入量に関する検討を行った。検出には、特定原材料ELISAキット2種(FAテストEIA-甲殻類II「ニッスイ」(日水製薬(株)製)、及び甲殻類キットII「マルハニチロ」(マルハニチロ(株)製))を使用した。その結果、全ての検体において、ELISAキットの検出限界値(0.31µg/g)以下となり、甲殻類タンパク質は検出されなかった。

次に、健康食品製品となる前の原材料段階のキチン粉末 4 検体、キトサン粉末 8 検体、グルコサミン類粉末 13 検体、及びキチン精製の原料となるカニ殻粉末 1 検体について製造メーカー（複数）から提供を受け、同様に甲殻類タンパク質の混入量に関する検討を行った。結果を表 3 に示す。カニ殻粉末では 1g あたり 108 μ g の甲殻類タンパク質が検出されたが、その他のキチン粉末、キトサン粉末、グルコサミン類粉末では甲殻類タンパク質は検出されなかった。この結果から、

健康食品等に使用されるこれらのキトサン及びグルコサミン類は高度に精製されており、甲殻類タンパク質の混入はないことが示された。従って、キトサンやグルコサミンを含有する健康食品等でアレルギー／アレルギー様反応が起きた場合には、原材料に混入した甲殻類タンパク質ではなく、キチン、キトサン、あるいはグルコサミンそのものが原因物質である可能性も考える必要があるだろう。症例数が少ないため、研究期間中に患者検体を入手することができなかったが、今後患者検体を入手できた場合には、キチン、キトサン、グルコサミン類に対する反応性を、BAT あるいは EXiLE 法を用いて検討し、アレルゲンの特性や発症機序に関する解析を進めることが重要である。

表 3 キチン、キトサン、グルコサミン類の甲殻類タンパク質含有量

検体番号	サンプル	起源	甲殻類タンパク質定量結果 (μ g/g)
1	カニ殻粉末		108
2	キチン	カニ	n.d.
3	キチン	カニ	n.d.
4	キチン	カニ	n.d.
5	キチン		n.d.
6	キトサン		n.d.
7	キトサン		n.d.
8	キトサン		n.d.
9	キトサン		n.d.
10	キトサン	カニ	n.d.
11	キトサン	カニ	n.d.
12	キトサン	カニ	n.d.
13	キトサン	カニ	n.d.
14	グルコサミン	カニ	n.d.
15	グルコサミン	エビ・カニ	n.d.
16	グルコサミン	エビ・カニ	n.d.
17	グルコサミン	カニ	n.d.
18	グルコサミン	カニ	n.d.
19	グルコサミン塩酸塩	カニ	n.d.
20	グルコサミン塩酸塩	カニ	n.d.
21	グルコサミン塩酸塩	カニ	n.d.
22	N-アセチルグルコサミン	エビ・カニ	n.d.
23	N-アセチルグルコサミン	エビ	n.d.
24	N-アセチルグルコサミン	エビ	n.d.
25	オリゴ-N-アセチルグルコサミン	エビ	n.d.
26	オリゴグルコサミン		n.d.

※n.d.:0.31 μ g/g以下

7) 個別課題名：ポリビニルピロリドン 手島玲子（徳島文理大学）

PVP に反応する患者は非常にまれであることが予想されたが、PVP のヨードキレートであるイソジンにより惹起された方を含め、3 例の方々の症例情報を得ることができた。このうち、1 例から血液の提供を受けることができ藤田保健衛生大学で、BAT 解析が行われ、引き続き、手島の方で、EXiLE 法での解析を行った。PVP に対する BAT 及び EXiLE 法で多少の上昇傾向はみられたが、明らかな陽性は示さなかった。なお、ヨード造影剤アレルギー患者の 8 割がヨードを含有する食品添加物エリスロシンで惹起できたという報告があることもため、BAT (図 10) 及び EXiLE 試験時に、エリスロシンを作用させたが、好塩基球の活性化はひきおこされなかった。1 例しか検討できず、陰性が検査感度の問題な

のか、臨牀診断上の問題なのかの判別が困難であり、今後症例を蓄積して検討する必要があると考えられた。

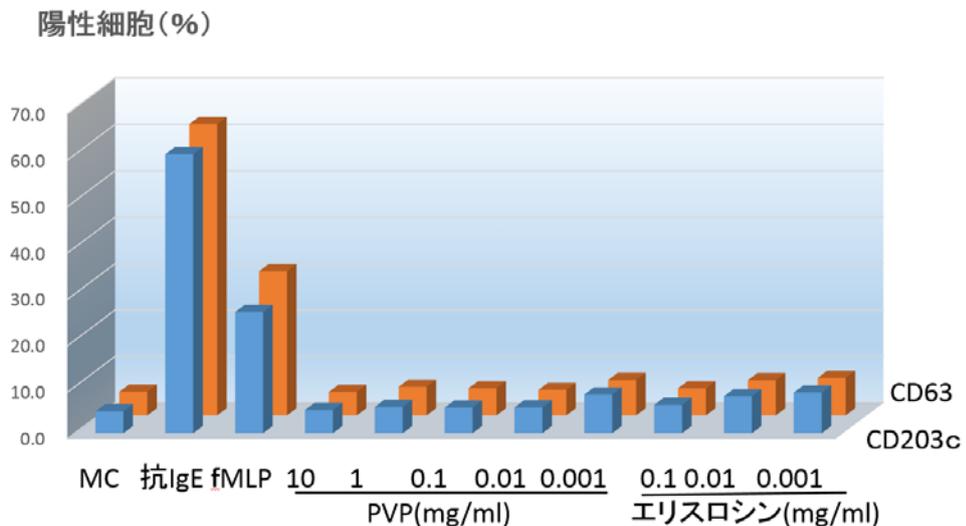


図10 ポリビニルピロリドン (PVP)、エリスロシンによる好塩基球活性化をCD203c(青のバー)、CD63 (茶のバー) の発現増強により検討した。

2 環境中のアレルゲンにより経皮、あるいは経気道的に感作され、食物アレルゲンにより発症するアレルギー／アレルギー様反応

1) 個別課題名：大豆アレルゲン Gly m 4 近藤康人（藤田保健衛生大学）

カバノキ科花粉で感作された花粉症患者が、homology の高いダイズアレルゲン Glym4 を含む豆乳でアレルギーを起こすことが知られている。今回の、アレルギー専門医アンケート調査でも、83 例の回答をいただいたが、うち 60 例は 3 人の専門医からで、こうした回答や文献検索からは Gly m 4 の関与がほぼ確定していると考えられた。しかし、その後の重症豆乳アレルギーに関する情報収集で、Gly m 4 の陰性例が存在することがわかった。更に自身で重症豆乳患者症例の血清を収集し、Gly m 4 の測定を行ったところ Gly m 4 陰性例を確認した。また、論文化はされていないものの、Gly m 4 が、消化の影響を受けやすいとの報告も、重症豆乳アレルギーの原因としての Gly m 4 に疑問を残すものである。そこで今回、新たな責任アレルゲンとして、大豆にも存在すると考えられている Gibberellin Regulated Protein (GRP)の可能性につき検討した。GRP は、1992 年トマトにおいて初めて発見され、シロイヌナズナで植物ホルモンであるジベレリンにより発現が制御されている一群の遺伝子 GASA(Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis) gene family に属すタンパク質である。従来電気泳動では LTP(9 kDa)と重なっており、これまで発見されていなかったが、2013 年、精製モモ LTP に混在する新規アレルゲン Peamaclein (Pru p 7)として同定された。モモの重症アレルギーを起こすタンパクとして報告されており、生体防御タンパ

クとして大豆にも存在することが考えられる。そこで、当院受診中の豆乳アレルギー4名の血清を用いて、抽出し精製したモモ GRP に対する IgE 結合を ELISA にて調べてみたところ、4名とも陰性であった。本来であれば大豆 GRP を抽出して行うべき研究であり、今後は大豆 GRP を抽出してそれに対する IgE 結合を検討する必要がある。

2) 個別課題名：遅発性食肉アレルギー 宇理須厚雄（藤田保健衛生大学）

Galactose- α -1,3-galactose(α -Gal)は、ヒト・霊長類以外の哺乳類の糖蛋白、糖脂質に広く認められる エピトープであり、抗 α -Gal 抗体はヒトが保有する自然抗体の中で最も量が多いとされている(Galili U.Immunology. 2013 140:1)。近年、ヒト-マウスキメラ抗体製剤 (cetuximab) 投与後の副反応および遅発型食肉アレルギーの原因が α -Gal 特異的 IgE であること、IgE への class switch にダニ咬傷が関与することが明らかにされ、新しいタイプの食物アレルギーの出現として注目されている。本研究実施中にも、フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の棲息地である島根県を中心に、30例の遅発性食肉アレルギー患者の詳細な解析が報告された (Takahashi H et al.Allergy 69:199-207, Chinuki Y et al. Allergy 71:421-5)。

我々のアレルギー専門医に対するアンケートでも、59例の回答をいただいたが、うち40例は島根県からのものであった。2次アンケートでは島根以外の11例から回答をいただき、うち検体提供をいただいた7例について BAT および α -Gal 特異的 IgE の検討を行った (表4, 図11)。

表4 BATを行った遅発性食肉アレルギー患者

症例	年齢	性	住所(都県)	症状	症状発現時間	sIgE* (class)	
						α -gal	牛肉
M1	50	F	岩手	牛肉で蕁麻疹、腹痛、嘔吐、下痢、血便、 血圧低下	30分— 2時間	0.453 (1)	0.171 (0)
M2	73	F	岩手	牛肉で蕁麻疹、呼吸困難、嘔声、嘔吐	数時間	9.63 (3)	6.70 (3)
M3	59	F	岩手	牛肉で蕁麻疹、血圧低下、ふらつき	数時間	<0.1 (0)	<0.1 (0)
M4	62	F	東京	鯨肉、鶏肉、豚肉、牛肉、牛乳で嘔吐、全身蕁麻疹	数十年未 摂取	<0.1 (0)	<0.1 (0)
M5	35	F	東京	牛肉、豚肉で全身蕁麻疹、牛乳で下痢	数時間	<0.1 (0)	<0.1 (0)
M6	9	F	東京	牛肉、豚肉を大量に食べると全身蕁麻疹	数時間	<0.1 (0)	<0.1 (0)
M7	4	F	東京	牛肉、豚肉を大量に食べると全身蕁麻疹	数時間	<0.1 (0)	<0.1 (0)

* s IgE ; 特異的IgE(UA/ml)

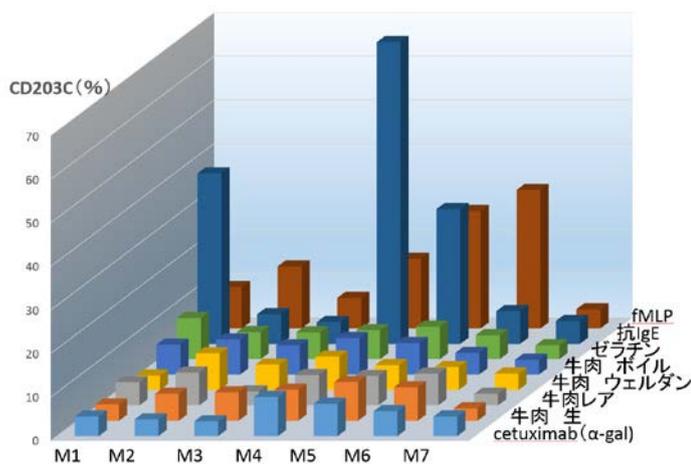


図 11 cetuximab (α-gal)、種々の加熱状態の牛肉、ゼラチンによる BAT

結果は、α-gal、牛肉による BAT は全例で陰性であった。ただ一人 α-gal と牛肉に対する特異的 IgE が陽性であった症例 (M2) も、抗 IgE 抗体によるクロスリンクでも反応のみられない low responder であったため、好塩基球の活性化がみられなかったものと考えられる。他の症例は、遅発性牛肉アレルギーではないか、長期の除去により IgE が低下したものと考えられた。本研究は、好塩基球上の IgE をクロスリンクしうるような、臨床上意義のある抗 α-gal 抗体の検出における BAT の有用性を検討することを目的としたが、これについてはさらに症例を選び検討を続ける必要があると思われた。

3) 個別課題名：加水分解小麦など、化粧品中の食品由来物質 手島玲子 (徳島文理大学)

3)-1 米ぬか

コメ 50kDa グロブリンタンパクに対して作成したポリクローナル抗体を用いて、玄米、白米、米ぬかタンパク質のウェスタンブロット解析を行ったところ、本タンパク質は、玄米及び米ぬかで検出されたが、白米ではほとんど検出されなかった。一方、19kDa グロブリンタンパク質は、玄米、白米で検出され、米ぬかではほとんど検出されなかった。化粧品や健康食品約 50 種を購入し、52kDa, 19kDa タンパク質の残存を確認したところ、加工度の低い製品で、これらタンパク質と特異的に反応する動物抗体を用いて確認することができた。次いで米ぬかに対するアレルギー症例を持つ患者のアンケート調査の二次調査結果で、ぬか床を扱っていた人など 4 名の症例が得られていたが、そのうち 1 名の患者血液を供与いただいた。この患者の血清と玄米、白米、米ぬか画分それぞれについて SDS-PAGE 後ウェスタンブロットで反応させ IgE 抗体の結合するタンパク質を解析した結果、この患者血清は、玄米、白米の 19kDa タンパク質に強く反応すること、また、米ぬかでは、40-50kDa のタンパク質と反応することが確認された。また、化粧品で、袋にぬかを入れたような加工のほとんどされていない製品の 40-50kDa とも反応することが確認された。さらに患者血清を用いた抗原解析は継続してゆく予定である。

3)-2 パパイヤ

パパイヤ成分を含むとされる化粧品や健康食品約 50 種を購入し、加工度の低い化粧品、健康食品それぞれ 5 検体程度で、パパイヤの主要アレルゲンであるパパイン(22kDa)が存在していることが、パパインに対する動物抗体を用いるウェスタンブロットで確認された。次いで、パパインに対するアレルギー症例のアンケート調査の二次調査結果で、システインプロテアーゼであるパパインとの交差反応性の高いブロメライン酵素を含むパイナップルを食した人とブロメライン軟膏使用者でアレルギー症例の 2 例の症例情報が得られた。このうち、後者の患者の血液が供与され、その血清を用いて、パパイン及びブロメラインの抗原特異的 IgE 抗体の測定を、EXiLE 法で行ったが、結果は陰性であった。また、パパイン、ブロメラインについて SDS-PAGE 後ウェスタンブロットで反応させ患者血清中 IgE 抗体との反応性を解析したが、結果は陰性であった。患者血清中 IgG 抗体との反応については継続して解析を行う予定である。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

食物アレルギーは、本来食品中の蛋白アレルゲンに対する免疫学的機序を介した反応に基づくが、近年、蛋白アレルゲンによる古典的食物アレルギーの概念では説明しがたい、食品に起因する新たなアレルギー／アレルギー様反応の報告が相次いでいる。また、食物中の蛋白アレルゲンによるアレルギー反応であっても、その感作の成立には、経口ルート以外の経皮、経気道ばく露が重要であることを示す事例が着目されている。本研究では、食品の摂取によるアレルギーに関連する健康への影響の評価に資することを目的に、新規アレルギー／アレルギー様反応に関する、これまでに行われている国内外の研究や調査結果、疫学情報、海外における取組状況などを収集するとともに、疫学調査を実施して、実態と問題点を把握し、これらを踏まえて機序解明とバイオマーカーの探索に関する基礎的検討を行った。

食物中の非蛋白低分子化合物による即時型アレルギー成立の機序としては、(1)低分子化合物が他の蛋白と結合してハプテンとして働く、(2)低分子化合物がマスト細胞、好塩基球などの機能を修飾することで、他の食物由来蛋白によるアレルギー反応を増強する、(3)低分子化合物製品に混入する蛋白によりアレルギーが惹起される、といった機序が考えられる。

今回の検討品目の中では、糖アルコールのアレルギーが(1)のハプテナーキャリアーの機序で発症することが示唆された。即ち、エリスリトールやキシリトールは、患者好塩基球を活性化するが、この反応は IgE と血液中の非血球成分の両者に依存性であることが示された。さらに糖アルコールと結合した人血清アルブミンと患者血清と反応性をイムノブロットにより検討したが、これは陰性であり、キャリアーの候補としてのアルブミンは否定的と考えられた。これらより、糖アルコールアレルギーの診断には、BAT が有用であると考えられたが、感度や簡便性の面からは、今後キャリアーを同定して、何らかの方法で糖アルコールとキャリアーの結合物を固相化し、IgE との結合を検出する方法を確立することが必要と考えられた。一方、糖アルコール自体のアレルゲン性ではなく、糖アルコールとりわけ頻度の多いエリス

リトールが、他の食品によるアレルギーを増強している可能性を検討する目的で、培養細胞株やマウスを用いて、腸管上皮の透過性に及ぼす影響、腸管細菌叢、腸管ムチン量について検討し、エリスリトール摂取により、腸管透過性が亢進し、ムチン量が減少し、さらに腸管細菌叢に影響することで食物アレルギーを増強する可能性を示唆する結果を得た。

タートラジン色素（食用黄色 4 号）は、好塩基球のヒスタミン遊離試験を用いてアスピリンや安息香酸同様に、他の蛋白アレルギーによる好塩基球・マスト細胞の活性化を増強すると報告されている。今回我々も、BAT を用いて同様な検討を行ったが、協力の得られた患者検体が一例にとどまり、この患者が抗 IgE 抗体によるクロスリンクにも反応しない low responder であったため、判定不能の結果であった。low responder の存在とそれに伴う判定不能は好塩基球活性化試験の課題の一つであり、これの克服に努めるとともに、症例を増やして検討する必要があると考えられた。

コチニールアレルギーは、低分子のカルミン酸自体のアレルギーではなく、エンジムの分泌性リパーゼ様タンパクなど夾雑物がアレルギーとなると考えられている。今回行った、コチニールの材料や製品中のタンパク質含量の測定では、カルミン酸に 0.4%、化粧品用カルミン原料に 29.7%、化粧品製品（カルミン 2-3% 含）に 0.52%、化粧品製品（カルミン 5% 含）に 1.3%、食品添加物用カルミンに 26.5% 含有されていた。患者の検討からは、検討し得た 3 例中 1 例は、夾雑物を含むコチニール色素刺激で BAT と EXiLE が陽性を示したのに比し、純度の高いカルミン酸(和光)刺激での反応は微弱で、夾雑物に対するアレルギーであることが示唆された。

同じく夾雑物アレルギーと想定されるキチン・キトサン・グルコサミンであるが、今回の検討で、健康食品等に使用される原材料は高度に精製されており、甲殻類タンパク質の混入はないことが示された。従って、アレルギー患者の協力が得られず確認できていないが、キトサンやグルコサミンを含有する健康食品等でアレルギー／アレルギー様反応が起きた場合には、原材料に混入した甲殻類タンパク質ではなく、キチン、キトサン、あるいはグルコサミンそのものが原因物質である可能性も考える必要があると考えられる。

環境中のアレルギーにより経皮、あるいは経気道的に感作され、食物アレルギーにより発症するアレルギー／アレルギー様反応については、豆乳により全身症状をきたす大豆アレルギー、マダニ咬傷により経皮感作されて起こる遅発性食肉アレルギー、化粧品中に含まれ経皮感作により発症する米ぬか、パピインについて検討した。

豆乳アレルギーに関しては、白樺花粉 Bet v 1 と豆乳の Gly m 4 と交叉反応により発症するとの考えが優勢であるが、Gly m 4 では説明のできない現象も存在する。このため、他のアレルギーも探索すべきと考え、モモの全身性アレルギーの原因として注目される GRP に着目して検討した。結果は陰性であったが、今後ダイズ由来の GRP についても検討する予定である。

遅発性食肉アレルギーについては、島根県の症例を中心に先行する解析が進ん

でいるが、我々も BAT をもちいて臨床的に意義のある多価の抗 α -gal 抗体の検出を試みた。しかし協力が得られたのは島根県以外に在住する患者のみとなり、好塩基球の活性化を検出できなかった。岩手在住で α -gal 特異的 IgE が陽性の患者は、抗 IgE 抗体によるクロスリンクでも好塩基球が活性化しない low responder で、判定不能であり、他の症例は α -gal 特異的 IgE も検出できない症例であった。特に好発地域以外での診断の難しさが痛感されたが、さらに症例を蓄積して検討する必要があると考えられた。

化粧品中の食物由来物質による感作で成立する食物アレルギーについては、加水分解小麦含有石ケンによる小麦アレルゲンの誘発に関しては、先行する研究が成果をあげているため、本研究では米ぬかとパパイヤを取り上げた。米ぬかアレルゲンについては、コメの 50kDa グロブリンが主に米ぬかに、19kDa グロブリンが白米に存在し、経皮感作が推測される米ぬかアレルギー患者では、両者に対する IgE が検出された。さらに、症例を蓄積して両抗原のアレルギー診断における有用性を検討する必要があると考えられた。パパイヤについても、化粧品や健康食品にパパイヤの主要アレルゲン (22kDa) が存在していることが示されたが、パパイヤ特異的 IgE の検出できる患者血清が得られず、患者血清との反応性は検討できなかった。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
 1. 手島玲子、経皮感作が関与する食物アレルギー、単行本：「食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発」p32-36 CMC 出版 (2015 年 3 月)
 - 2 本研究を基にした学会発表の実績
 1. 佐藤里絵、手島玲子：玄米粒におけるアレルゲンの分布と玄米成分を含む製品におけるアレルゲン性の解析、日本食品化学学会第 21 回学術大会 (2015.5 東京)
 2. Satoh R., Teshima R.: Analysis of distribution of rice allergens in brown rice grain and allergenicity of the products containing rice bran. 6th ISMA(International Symposium on Molecular Allergology) (2015.11 Lisbon)
 - 3 特許及び特許出願の数と概要
なし
 - 4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)
 - 1)近藤康人;2016 年 3 月 1 日の中日新聞に重症豆乳アレルギーの記事が掲載された。
 - 2)近藤康人;Thermo scientific 発行の季刊紙 ALLAZiN に大豆アレルギーについて記載した。

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
<p>1 食品添加物などタンパク以外の分子に起因するアレルギー／アレルギー様反応 (1)エリスリトール等甘味料 本年度は、今年度の結果を踏まえ、以下の検討を行う予定である。</p> <p>1. Caco-2細胞、ヒト小腸上皮細胞などの<i>in vitro</i>培養系を用いて、各種糖アルコールの透過性を比較し、腸管からの吸収性を検討する。</p> <p>2. アレルギーモデルマウスを用いて、各種糖アルコールの腸内菌叢への影響を検討する。</p> <p>3. 発酵食品におけるエリスリトール生成過程を解析し、中間代謝産物の抗原性および抗原交差性を検討する。</p> <p>4. 吸収後の挙動について、特に血液中のタンパク質との相互作用について検討する。</p> <p>5. 臨床検体を用いBATにより検討する。</p>	4	<p>Caco-2細胞を用いた<i>in vitro</i>培養系検討からは、エリスリトールがタイトジャンクションを介する透過性を増強する可能性を示した。また、マウスを用いた腸管への影響の検討では、エリスリトール摂取により、腸内ムチン量が低下すること、腸内細菌叢に影響することが示された。ムチンは腸管からの吸収を抑制することから、その低下はさらに、アレルギー吸収を増加させ、アレルギー感作や惹起を亢進するものと思われる。腸内細菌叢への影響はさらなる検討を要するが、宿主の免疫機構を介してアレルギーを増強している可能性は大いにありうると思われる。</p> <p>一方、患者検体を用いた検討からは、エリスリトール、キシリトールは患者好塩基球を活性化するが、この反応性は、皮膚プリックテスト結果と一致し、また、IgEと血液中の非血球成分の両者に依存性であることが示され、これらより、糖アルコールがハプテンとしてアレルギー反応を起こしていることが示唆された。</p> <p>これらの結果は、さらなる検討は必要であるが、糖アレルギーの発症機序や診断法の確立に貢献しうると考えられる。</p>
<p>2) コチニール コチニール色素に比べ、カルミン（カルミン酸のアルミニウムレーキ化合物）のタンパク質含量が高いことから、コチニール、カルミンに関してアレルギー含量、蛋白含量の評価（純度）を行うとともに、コチニール色素、カルミンによるアレルギー発症事例について、カルミン酸によるBATを用いてIgE抗体産生性について検討する。</p>	4	<p>コチニールは、低分子のカルミン酸自体のアレルギーではなく、原料となるエンジムの分泌性リパーゼ様タンパクなど夾雑物がアレルギーとなると考えられている。今回コチニールのタンパク質含量を測定したところ、カルミン酸に0.4%、化粧品用カルミン原料に29.7%、化粧品製品（カルミン2-3%含）に0.52%、化粧品製品（カルミン5%含）に1.3%、食品添加物用カルミンに26.5%含有されていることが判明した。患者の検討からは、検討し得た3例中1例は、夾雑物を含むコチニール色素刺激でBATとEXiLEが陽性を示したのに比し、純度の高いカルミン酸(和光)刺激での反応は微弱で、夾雑物に対するアレルギーであることが示唆された。既知の事実の追認にはなったが、コチニールアレルギーの予防を考える基礎データになったと評価される。</p>

<p>3) タートラジン 患者検体を用いたBATにより、タートラジン自体に対する特異的IgE抗体産生と、他のアレルゲンによる好塩基球活性化の増強作用の両者について検討する。</p>	<p>3</p>	<p>文献検索上、タートラジンの過敏反応で直接的に症状が誘発されたという報告は少ない。気管支喘息の悪化との関係が疑われていたが、過去の研究ではプラセボとの差がないことが示されている。しかし、今回のアレルギー専門医に対する全国調査では、タートラジンによる過敏症状疑いの報告を9例把握しており、潜在的な有症状患者の存在が示唆された。慢性蕁麻疹患者では、タートラジンはIgEのクロスリンクによる末梢血好塩基球活性化を増強することが示されており、過敏性反応に対する関与が疑われるため、全国調査の結果をもとに、患者検体の提供をお願いし、これまでに1例のBATによる検討を行った。結果は、本患者はfMLP刺激では好塩基球活性化がみられるにもかかわらずIgEの架橋では活性化の起きない、いわゆる“low responder”であったことが一因の可能性はあるが、いずれの刺激に対してもタートラジン、アスピリン、安息香酸による増強効果は見られなかった。さらに症例を集積して検討する必要があると思われる。</p>
<p>4) イチョウ葉（ギンコール酸） 今後は、患者検体を用い、イチョウ葉エキス（ギンコール酸）に対する反応性をBATあるいはIgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE法)を用いて検討し、アレルゲンの特性や発症機序に関する解析を進める。</p>	<p>3</p>	<p>イチョウ葉エキスは、欧州では医薬品としても認められており、記憶障害等に対して有効であるとされているが、成分の1つであるギンコール酸はアレルギー原因物質であることが知られており、イチョウ葉エキス製品中の濃度は5ppm以下と規定されている。わが国においても（財）日本健康・栄養食品協会が同様の基準を設けているが、イチョウ葉エキスによる皮膚アレルギー等の症例の報告は少数であるが存在する。そこで、26年度において、これまでに国内及び海外において論文等で報告されている健康危害事例（アレルギー／アレルギー様反応と思われるもの）について調査した。その結果、5例の報告が確認され、また、国内の専門医に対する調査では8例の回答を得た。症例数が少ないため、研究期間中に患者検体を入手することができなかったが、今後患者検体を入手できた場合には、イチョウ葉エキス（ギンコール酸）に対する反応性を、BATやEXiLE法を用いて検討し、アレルゲンの特性や発症機序に関する解析を進めることが重要である。</p>
<p>5) 葉酸 患者検体を用い、葉酸に対する反応性をBATあるいはIgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE法)を用いて検討し、</p>	<p>3</p>	<p>葉酸は水溶性ビタミンの1種である。栄養補助を目的としてサプリメント類に配合されているが、アレルギーの原因物質となることが知られている。重篤なアナフィラキシー症状を呈する症例も報告されているため、注意が必要である。そこで、2</p>

<p>アレルギーの特性や発症機序に関する解析を進める。</p>		<p>6年度において、これまでに国内及び海外において論文等で報告されている健康危害事例(アレルギー／アレルギー様反応と思われるもの)について調査した。その結果、13例の報告が確認された。また、国内の専門医に対する調査では2例の回答を得た。</p> <p>27年度も同様の健康危害事例の調査を行ったところ、葉酸を含むサプリメントの摂取によりアナフィラキシーを呈した症例が、海外で1例新たに報告されていた。症例数が少ないため、研究期間中に患者検体を入手することができなかったが、今後患者検体を入手できた場合には、葉酸に対する反応性を、BATあるいはEXiLE法を用いて検討し、アレルギーの特性や発症機序に関する解析を進めることが重要である。</p>
<p>6) キトサンあるいはグルコサミン キトサンあるいはグルコサミン含有健康食品類を対象とし、原材料である甲殻類のタンパク質混入量について実態調査を行う。また患者血清を用い、キトサンあるいはグルコサミンに対する反応性を検討し、アレルギー解析を進める。</p>	<p>4</p>	<p>キトサンは、主に甲殻類外殻から精製される多糖であるキチンを脱アセチル化して製造され、グルコサミンは、主にキチンを分解して製造される。キトサン含有健康食品については、これまでに、アナフィラキシー症状を呈した症例が報告されているほか、キチン含有外用製品の使用による皮膚炎に関して、原因物質はキトサンであるという報告がある。そこで、26年度において、国内及び海外において論文等で報告されている健康危害事例(アレルギー／アレルギー様反応と思われるもの)について調査した。その結果、キトサン及びグルコサミンについて3例の報告が確認された。国内の専門医に対する調査では、キトサン2例、グルコサミン3例の回答を得た。</p> <p>キトサン、グルコサミンの原料となるキチンは、主にエビ・カニ等の甲殻類外殻から精製される。この時、食物アレルギーである甲殻類タンパク質が混入する可能性があり、そのためにキトサンあるいはグルコサミン含有健康食品によりアレルギー症状を呈することも考えられる。そこで、市販のキトサン含有健康食品、及びグルコサミン含有健康食品それぞれ20検体(錠剤、カプセル、粉末等)を対象として、甲殻類タンパク質の混入量に関する検討を行った。その結果、全ての検体において、検出限界値以下となり、甲殻類タンパク質は検出されなかった。従って、キトサンやグルコサミンを含有する健康食品等でアレルギー／アレルギー様反応が起きた場合には、原材料に混入した甲殻類タンパク質ではなく、キチン、キトサン、あるいはグルコサミンそのものが原因物質である可能性も考える必要があるだろう。以上有用な</p>

		<p>情報が得られたが、症例数が少ないため、研究期間中に患者検体を入手することができなかった。今後患者検体を入手できた場合には、キチン、キトサン、グルコサミン類に対する反応性を、BATあるいはEXiLE法を用いて検討し、アレルゲンの特性や発症機序に関する解析を進めることが重要である。</p>
<p>7) ポリビニールピロリドン (PVP) BATやEXiLE法による検討を行うとともに、ヨード過敏に対しては、ヨード造影剤アレルギー患者の8割が食品添加物エリスロシンで惹起できたという報告があるため、エリスロシンのアレルギー事例も加えて検討を行う。</p>	3	<p>PVPに反応する患者は非常にまれであることが予想されたが、PVPのヨードキレートであるイソジンにより惹起された方を含め、3例の方々の症例情報を得ることができた。このうち、1例から血液の提供を受けることができ藤田保健衛生大学で、BAT解析が行われ、引き続き、手島の方で、EXiLE法での解析を行った。PVPに対するBAT及びEXiLE法で多少の上昇傾向はみられたが、明らかな陽性は示さなかった。なお、ヨード造影剤アレルギー患者の8割がヨードを含有する食品添加物エリスロシンで惹起できたという報告があるため、BAT及びEXiLE試験時に、エリスロシンを作用させたが、好塩基球の活性化はひきおこされなかった。1例しか検討できず、陰性が検査感度の問題なのか、臨床診断上の問題なのかの判別が困難であり、今後症例を蓄積して検討する必要があると考えられた。</p>
<p>2 環境中のアレルゲンにより経皮、あるいは経気道的に感作され、食物アレルゲンにより発症するアレルギー/アレルギー様反応 1) 大豆アレルゲンGly m 4 豆乳によるアナフィラキシー症例に関してアレルゲン分析を行い、Gly m 4以外の原因アレルゲンの有無について検討する。 また、大豆関連のアレルギーで発症機序が明らかにされていないものとして納豆アレルギーに着目し、ウェスタンブロットあるいはBATによる検討を行う。</p>	3	<p>アレルギー専門医アンケート調査では、83例の回答をいただいたが、うち60例は3人の専門医からの回答であり、こうした回答や文献検索からはGly m 4の関与がほぼ確定していると考えられた。しかし、その後の重症豆乳アレルギーに関する情報収集で、Gly m 4の陰性例が存在することが判明した。更に自身で重症豆乳患者症例の血清を収集し、Gly m 4の測定を行ったところGly m 4陰性例を確認した。また、論文化はされていないものの、Gly m 4が、消化の影響を受けやすいとの報告もあり、重症豆乳アレルギーの原因としてのGly m 4に疑問を残すものである。そこで今回、新たな責任アレルゲンとして、大豆にも存在すると考えられているGibberellin Regulated Protein (GRP)の可能性につき検討した。GRPは、1992年トマトにおいて初めて発見され、シロイヌナズナで植物ホルモンであるジベレリンにより発現が制御されている一群の遺伝子GASA(Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis) gene familyに属すタンパク質である。従来電気泳動ではLTP(9kDa)と重なっており、これまで発見されて</p>

		<p>いなかったが、2013年、精製モモLTPに混在する新規アレルゲンPeamaclein (Pru p 7)として同定された。モモの重症アレルギーを起こすタンパクとして報告されており、生体防御タンパクとして大豆にも存在することが考えられる。そこで、当院受診中の豆乳アレルギー4名の血清を用いて、抽出し精製したモモGRPに対するIgE結合をELISAにて調べてみたところ、4名とも陰性であった。本来であれば大豆GRPを抽出して行うべき研究であり、今後は大豆GRPを抽出してそれに対するIgE結合を検討する必要がある。</p> <p>納豆アレルギーに関しては、10例の2次アンケートのお答えをいただいたが、検体提供の協力が得られず、さらなる検討はできなかった。</p>
<p>2) 遅発性食肉アレルギー 食品中のアレルギー惹起能を有するα-galエピトープの半定量法について、以下のように検討する。すなわち、まずCetuximabを用いたBATにより診断を確定した患者血清を蓄積し、これを用いた受け身BATあるいはEXiLE法により、食肉由来食品中のα-galエピトープの半定量を行う。</p>	3	<p>初年度に行ったアレルギー専門医を対象とするアンケートでは、59例の回答があったが、うち40例は島根大からのもので、これに関してはすでに英文論文化されていた。島根大の症例を除く11例から2次アンケートの返事が得られ、7例につきセツキシマブおよび牛肉アレルゲンを用いたBATをおこなったが、いずれも陰性であった。島根以外での症例の収集が必要であると考えられたが、臨床診断のむつかしさも判明し、今後も診断法の確立を目指した検討を継続する必要があると考えられた。</p>
<p>3) 加水分解小麦など、化粧品中の食品由来物質 本項目では、化粧品中の食品由来物質として、米ぬか、パパイアのアレルギーについて検討するものとする。</p> <p>米ぬかについては、コメ50kDaグロブリンタンパクに対して作成したポリクローナル抗体を用いて、玄米、白米、米ぬかタンパク質のウェスタンブロット解析を行い、本タンパクが、玄米及び米ぬかで検出されるが、白米ではほとんど検出されないことを示しており、また、化粧品や健康食品で、米ぬかを使用している場合において、本タンパクの残存を示すデータも得られた。今後、患者検体を用いた本タンパクに対する</p>	4	<p>コメ50kDaグロブリンタンパクに対して作成したポリクローナル抗体を用いて、玄米、白米、米ぬかタンパク質のウェスタンブロット解析を行ったところ、本タンパク質は、玄米及び米ぬかで検出されるが、白米ではほとんど検出されなかった。一方、19kDaグロブリンタンパク質は、玄米、白米で検出され、米ぬかではほとんど検出されなかった。化粧品や健康食品約50種を購入し、52kDa, 19kDaタンパク質の残存を確認したところ、加工度の低い製品で、これらタンパク質と特異的に反応する動物抗体を用いて確認することができた。次いで米ぬかに対するアレルギー症例を持つ患者のアンケート調査の二次調査結果で、ぬか床を扱っていた人など4名の症例が得られていたが、そのうち1名の患者血液を供与いただいた。この患者の血清と玄米、白米、米ぬか画分それぞれについてSDS-PAGE後ウェスタンブロットで反応させIgE抗体の結合するタンパク質を解析した結果、この患者血清は、玄米、白米の19kDaタンパク質に強く反応すること、</p>

<p>反応性を検討する。 パパイヤについても患者検体を用いたアレルゲン解析を行うとともに、化粧品や健康食品で、パパイヤ成分を使用している製品でのパインアレルゲンの残存の有無をウェスタンブロット法で解析する。</p>		<p>また、米ぬかでは、40-50kDaのタンパク質と反応することが確認された。また、化粧品で、袋にぬかを入れたような加工のほとんどされていない製品の40-50kDaとも反応することが確認された。この患者は、ぬかをフロにいれて入浴し、全身じんましんをおこした方で、アトピー性皮膚炎の既往があり、コメとぬか両方に反応することが考えられることより、19kDa, 40-50kDaの両方のタンパク質に対するIgE抗体を有しているものと考えられた。さらに患者血清を用いた抗原解析は継続してゆく必要がある。</p> <p>パパイヤについても、化粧品や健康食品にパパイヤの主要アレルゲン(22kDa)が存在していることが示されたが、パパイヤ特異的IgEの検出できる患者血清が得られず、患者血清との反応性は検討できなかった。</p>
--	--	---

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	3	<p>本研究は蛋白アレルゲンによる古典的食物アレルギーの概念では説明しがたい、新たな食物アレルギー/アレルギー様反応、あるいは、食物中の蛋白アレルゲンによるアレルギー反応であっても、その感作の成立に、経口ルート以外の経皮、経気道ばく露が重要なアレルギーについて、これまでに行われている国内外の研究や調査結果、疫学情報、海外における取組状況などを収集するとともに、疫学調査を実施して実態と問題点を把握し、これらを踏まえて機序解明とバイオマーカーの探索に関する基礎的検討を行うことを目的とした。疫学調査の中心になったのは、アレルギー専門医3,093人に行ったアンケート調査で、実態の把握に有用であった。本研究ではさらにこのアンケート調査を踏まえ、患者検体を収集し、これを用いた検討から、これら新規アレルギー/アレルギー様反応の病態を解明し、有用なバイオマーカーを見出すことを目指したが、診断が主治医の判断によったこと、および、時期を問わず経験の有無をお答えいただくアンケートであったため、すでに経過観察が終了している症例もあるなどして、検体提供の協力が得られた症例数は十分でなく、診断にも疑問の残る症例が含まれた。こうした状況の中でも、比較的多くの症例のご協力がいただけた糖アルコールアレルギーについては、反応がIgE依存性且つ血液中の非血球成分依存性であることを示唆する知見を得るな</p>

		どの成果があげられ、また、患者検体に依存しない検討からは、糖アルコール摂取が腸管透過性や腸内細菌叢に影響を及ぼすこと、多くのキチン・グルコサミン製品に混入する甲殻由来蛋白は限定されること、栄養食品や化粧品中のコメ由来蛋白、パパイヤ由来蛋白の実態についての有用な情報が得られた。
(2) 研究成果の有用性	3	<p>栄養食品・化粧品中のアレルゲン性食物由来蛋白の混入に関する検討結果は、これらによる食物アレルギーの感作や惹起の予防に直接的に有用な情報となる。</p> <p>一方、現状に関する疫学調査やこれに基づいた病態解析は、直近の有用性をもたらすものではないが、近い将来におけるこれら新規アレルギー/アレルギー様反応のより正確な診断法、より有効な予防治療法に繋がるものであるといえる。</p>
<p>総合コメント</p> <p>本研究は、新規食物アレルギー/アレルギー様反応あるいは、食物中の蛋白アレルゲンによるアレルギー反応であっても、その感作の成立に、経口ルート以外の経皮、経気道ばく露が重要なアレルギーについて、これまでに行われている国内外の研究や調査結果、疫学情報、海外における取組状況などを収集するとともに、疫学調査を実施して、実態と問題点を把握し、これらを踏まえて機序解明とバイオマーカーの探索に関する基礎的検討を行うことを目的とした。主治医の判断に基づくアンケート調査であることから、診断における限界があること、もともと稀なアレルギーの調査であることから、患者検体の収集が十分でなかったなどの限界はあったが、比較的症例数が確保できた糖アルコールアレルギーについては、反応がIgE依存性且つ血液中の非血球成分依存性であることを示唆する知見を得るなどの、成果があげられた。また、患者検体を用いない検討からも、糖アルコール摂取が腸管透過性や腸内細菌叢に影響を及ぼすことが示され、糖アルコールアレルギー発症機序解明の一助となると考えられた。栄養食品・化粧品中のアレルゲン性食物由来蛋白(米ぬか、パパイン、甲殻類蛋白)の混入の検討は、食物アレルギーの感作や惹起の予防に直接的に有用な情報となった。このように、充分とは言えないものの、新規食物アレルギー/アレルギー様反応の実態把握と病態解明に寄与しえた研究であったといえる。</p>		

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。