

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00904

研究課題名(和文) 簡便かつ迅速な食物アレルギー検知法の開発と外食・中食オンサイト分析への利用

研究課題名(英文) Development of the simple and rapid detection method for food allergen

研究代表者

酒井 信夫 (Sakai, Shinobu)

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・室長

研究者番号：60370938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗原抗体反応を基盤とする新規食物アレルギー検知法の開発を試みた。初年度は、東京都内の公立小学校において食物アレルギーに関する講義及び実習を実施し、オンサイト分析を構築する際に重要な学術的理解度及び技術的習熟度について調査・分析した。次年度は、抗原抗体反応を基盤とするマルチプレックス分析法を構築するために必要な複合抗原溶液の調製と検出感度について検討した。最終年度は、複合抗原溶液と磁気ビーズ・プロテインA/プロテインG担体とを用いたオンサイト(可視)ビーズELISA法の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a simple and rapid detection method for food allergen based on antigen-antibody interaction. In the first year, we conducted a lecture about the food allergy in a board school in Tokyo and investigated the level of understanding and skill of end-user. In the second year, we prepared the complex antigen solution necessary to build multiplex detection system. In the last year, we developed the on-site (visible) detection system by magnetic beads-binding ELISA.

研究分野：分析化学

キーワード：食物アレルギー オンサイト分析

## 1. 研究開始当初の背景

2012年12月20日、東京都調布市立小学校の5年生女児が、給食を食べた後体調を悪くして亡くなるという傷ましい事故は記憶に新しく、その原因は「誤食」、すなわち食物アレルギーによるアナフィラキシーショックが強く疑われている。食物アレルギーは自然耐性化する傾向があり、その罹患率が年齢によって異なるため、正確な患者数を求めることは難しいが、アレルギー疾患に関する調査研究委員会(文部科学省)は、我が国の小中高生の食物アレルギーの罹患率が4.5%であると報告した。この罹患率は40人学級では1.8人と換算され、当該調査結果を受けて文部科学省は「アレルギー疾患は稀な疾患ではなく、学校保健を考える上で、既に学校に、クラスに各種のアレルギー疾患の子どもたちが多数在籍していることを前提としなければならない状況になっている」との認識を示すに至った。

他方、食物アレルギーの表示に関し、容器包装された加工食品については、食品衛生法(平成23年内閣府令第45号及び46号)によって表示が義務付けられているが、外食や中食(予め容器包装されず、注文に応じて容器に詰められて販売されるもの)については食品衛生法上のアレルギー表示義務が課せられていないため、食物アレルギー患者の健全な食生活に対する大きな障壁となっている。消費者庁は2014年4月21日に「第1回 外食等におけるアレルギー情報の提供の在り方検討会」を開催し、アレルギー臨床医、患者団体、法学者及び食品業界が中心となって外食等事業者の取組状況や課題を聴取し、事業者にとって実行可能性のある、外食等における食物アレルギー情報の提供促進のための方策について検討を進めている。また、食品中のアレルギーの定量・定性検知法に関しては、現在ELISA法、ウェスタンブロット法、PCR法が「ラボサイト」における公定法となっているが、学校給食、外食・中食等の様々な食環境における「オンサイト」分析法は未だ確立されておらず、食物アレルギー患者やその保護者からのニーズが極めて高い。

## 2. 研究の目的

2013年12月16日の文部科学省の「学校生活における健康管理に関する調査」中間報告において、我が国の小中高生の食物アレルギーの罹患率は4.5%(45万3,962人)と発表された。9年前の同調査では2.6%であったことから、食物アレルギーの罹患率は現在なお急激な増加の一途を辿っていることが容易に伺える。本研究「簡便かつ迅速な食物アレルギー検知法の開発と外食・中食オンサイト分析への利用」では、抗原抗体反応を基盤とする食物アレルギー検知法を新たに開発し、学校給食、外食・中食等の様々な食環境におけるオンサイト分析に利用することにより、食物アレルギー患者のQOL改善を目指す。

## 3. 研究の方法

食物アレルギーの罹患率は現在急激な増加の一途を辿っている。本申請研究では、抗原抗体反応を基盤とする簡便かつ迅速な食物アレルギー検知法を新たに開発し、現行の検知法では不可能であった「多重検出」(複数の食物アレルギーの同時検出)と「オンサイト分析」を可能にするための詳細な検討を行う。

平成27年度は、東京都内の公立小学校において食物アレルギーに関する講義及び実習(実験)を実施し、オンサイト分析を構築する際に重要な学術的理解度及び技術的習熟度について調査・分析した。平成28年度は、抗原抗体反応を基盤とするマルチプレックス分析法を構築するために必要な複合抗原溶液の調製と検出感度について検討した。最終年度は、複合抗原溶液と磁気ビーズ・プロテインA/プロテインG担体とを用いたオンサイト(可視)ビーズELISA法の開発を試みた。

## 4. 研究成果

初年度は東京都内の公立小学校において高学年(4~6年生)を対象とした食物アレルギーに関する講義「食物アレルギーってなんだ?」、ラテラルフロー法を用いた実習(実験)「イムノクロマトグラフィーによる牛乳アレルギー(カゼイン)の検出」を実施し、オンサイト分析を構築する際に重要な学術的理解度及び技術的習熟度について調査・分析した。その結果、小学校高学年(保護者を含む)の食物アレルギーに関する理解度は充分高いとは断定できないが、ラテラルフローを基盤とした実験については簡易分析法として適応可能な水準であることが推察された。

## 本日のスマイルスクール「食物アレルギーと加工食品」

本日の午後、理科室にてスマイルスクール講座が行われました。「食物アレルギーと加工食品」講座です。食物アレルギーというものは知っているけれど、その原因は？加工食品の裏によく書いてある表示の意味は？とても詳しく教えていただきました。

講座の後半には、2種類のビスケットから、成分を抽出し、どちらのビスケットに牛乳が含まれているのかを確かめる実験も行いました。

食物アレルギーは時に命にかかわることもあります。身のまわりにある加工食品に目を向けたり、アレルギーについて考えるよい機会となったのではないのでしょうか。

講師の酒井さん、中村さん、ご協力いただきました保護者の方々、本当にありがとうございました。



【学校行事】 2015-07-27 13:49 up!

## 東京都内の公立小学校における食物アレルギーに関する講義及び実習

抗原抗体反応を基盤とするマルチプレックス分析法を構築するために必要な複合抗原溶液の調製と検出感度の確認を実施した。【複合抗原溶液の調製】消費者庁次長通知「食品表示基準について」(消費表第139号平成27年3月30日)[別添] アレルゲンを含む食品に関する表示(別添3)に示される一次標準粉末を調製した。卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類(エビ)の一次標準粉末に抽出用緩衝液[0.6% SDS及び0.1M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ を含有するPBS (pH 7.4)]を加え、低温条件下一昼夜攪拌抽出した。抽出液を遠心分離した後、上澄液をフィルターを過し、標準品原液を調製した。最終濃度が各100 ng/mLとなるように、標準品原液をpH 7.4のPBSで希釈した後、0.2% BSAを含むPBS(pH 7.4)で希釈し、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類の複合抗原溶液とした。【検出感度の確認】検出感度の確認には食物アレルギーの簡易検査において使用される市販2社のイムノクロマトキットを用いた[両キットともに100 ng/mL以上(被検食品当たりに換算した場合約2 ppm以上)の濃度で検出可能]。複合抗原溶液を用いた確認試験を試みた結果、同濃度の単一抗原溶液と比較して小麦、そばを除く特定原材料の検出感度が低下した。複合抗原溶液の濃度が上昇することによりプロゾン現象が生じることが懸念されたことから、固相化抗体量を調整することで検出感度が改善できると考えられた。他方、加工食品における表示の閾値が10 ppmとなっているため、検出感度が閾値を上回る場合には、マルチプレックス分析における特定原材料の組み合わせを再考する必要があるため追加の検討を実施する。

抗原抗体反応を基盤とするマルチプレックス分析法として、複合抗原溶液と磁気ビーズ・プロテイン A/プロテイン G 担体とを用いたオンサイト(可視)ビーズ ELISA 法の開発を試みた。アレルゲンタンパク質のモデル抽出液は、平成28年度に検討した、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類の複合抗原溶液(最終濃度各100 ng/mL)を用いた。抗 ovalbumin 抗体(卵)、抗 beta-lactoglobulin 抗体(乳)、抗 gliadin 抗体(小麦)、抗 BwP16(Fag e 2)抗体(そば)、抗 Ara h 1 抗体(落花生)、抗 tropomyosin 抗体(甲殻類)を磁気ビーズ・プロテイン A/プロテイン G 担体の表面にそれぞれ固相化し、複合抗原溶液の IP 抗体と担体への競合および非特異的な結合について検討した。はじめに、各固相化抗体をアフィニティーリガンドとしてプロテイン A/プロテイン G 担体に結合させたところ、いずれの抗体も Fc 領域の heavy chain に対する特異性を示した。次に、各固相化抗体を磁気ビーズに結合させたところ、プロテイン A/プロテイン

G 担体と比較して 1/20～1/100 程度の結合量であった。固相化抗体量を調整し界面活性剤を除去することにより結合力の改善を試みたが、顕著な効果は認められなかった。各抗体を固相化したプロテイン A/プロテイン G 担体に複合抗原溶液を加えてインキュベートし、各固相化抗体結合磁気ビーズで釣り上げたところ、一部の組合せを除き、非特異的な結合は認められなかった。磁気ビーズもしくはプロテイン A/プロテイン G 担体を着色させることにより、マルチプレックス分析法として応用できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

酒井信夫、食物アレルギー分析のネクストジェネレーション：LC-MS による多重検出、フアルマシア、査読有、51 巻、2015、461

### 〔学会発表〕(計 3 件)

佐久間智宏、酒井信夫、石井里枝、大坂郁恵、岡本正志、後藤浩文、佐伯憲一、手島玲子、三野芳紀、食品成分試験法 食物アレルギー、日本薬学会第 136 年会、2016 年

手島玲子、酒井信夫、中村政志、五十嵐良明、T オリピエ、DP サンドラ、松永佳世子、小麦タンパク質加水分解の処理過程に伴う抗原性発現のエピトープ部位抗体を用いる解析、第 23 回日本免疫毒性学会学術年会、2016 年

酒井信夫、田原麻衣子、中村里香、中村亮介、佐々木和実、西嶋桂子、安宅花子、T オリピエ、DP サンドラ、佐藤奈由、中村政志、松永佳世子、手島玲子、安達玲子、五十嵐良明、酸加水分解コムギの脱アミド化エピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた抗原性の解析、日本薬学会第 137 年会、2017 年

### 〔図書〕(計 2 件)

手島玲子、安達玲子、酒井信夫、公益社団法人 日本食品衛生協会出版、食品衛生検査指針理化学編 2015：第 4 章 -アレルギー物質-、2015 年、45 ページ

三野芳紀、佐野満昭、五十嵐友二、石井里枝、岡野登志夫、岡本正志、金谷建一郎、川崎洋一、河村典久、後藤浩文、斉藤貢一、佐伯憲一、酒井信夫、佐久間智宏、手島玲子、金原出版株式会社、衛生試験法・注解 2015：2. 飲食物試験法 2.1 食品成分試験法、2015 年、88 ページ

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

**国内外の別：**

**〔その他〕  
ホームページ等**

<http://www.setagaya.ed.jp/yoga/>  
(学校日記：2015年7月27日)

## **6. 研究組織**

### **(1) 研究代表者**

酒井 信夫 (SAKAI, Shinobu)  
国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・室長  
研究者番号：60370938

### **(2) 研究分担者**

### **(3) 連携研究者**

安達 玲子 (ADACHI, Reiko)  
国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長  
研究者番号：10291113

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)  
国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長  
研究者番号：50333357

### **(4) 研究協力者**