

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K02200

研究課題名(和文) 食品中の花粉・食物アレルギー症候群のアレルゲン分析法を開発し、児童の発症を防ぐ

研究課題名(英文) Development of an allergen analysis method for pollen and food allergy syndrome in food with the aim of prevent onset in children.

研究代表者

吉光 真人 (Yoshimitsu, Masato)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主幹研究員

研究者番号：70321940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：セロリおよびニンジンに含まれる花粉・食物アレルギー症候群(PFAS)のアレルゲン一斉分析法を確立した。この分析法を用いて生鮮セロリおよびニンジン、ジュース類に含まれるアレルゲンの濃度を調査した。その結果、全ての生鮮食品からアレルゲンが検出された。また、生鮮食品と比較して、ジュース類では濃度が低い傾向がみられたものの、アレルゲンが検出された。以上から、これらのアレルゲンはジュースの製造工程で完全には消失せず、残存することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年増加している、花粉・食物アレルギー症候群(PFAS)による児童の果物アレルギーの発症を防ぐためには、様々な食品に含まれる複数の原因アレルゲンの種類や濃度を効率よく分析可能な分析法が必要である。本研究では、一部の食品でアレルゲンの一斉分析法を確立し、食品に含まれる濃度を明らかにした。今後、分析可能なアレルゲンを増やし、検査法として運用可能な体制を構築する必要がある。また、様々な食品に含まれる原因アレルゲンの含有量を調査し、摂取リスク等の把握に役立つ情報を提供していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：A simultaneous analysis method for pollen and food allergy syndrome (PFAS) allergens in celery and carrots was established. Using this method, the concentrations of these allergens in fresh celery and carrots, as well as in juices, were investigated. As a result, allergens were detected in all fresh foods. In addition, allergens were detected in juices, although their concentrations tended to be lower than those in fresh foods. These results suggest that these allergens are not completely eliminated in the juice production process.

研究分野：食品衛生学

キーワード：PFAS PR-10 family LC-MS/MS ペプチド 消化 アレルゲン ニンジン Dau c 1 セロリ Api g 1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本州で広く見られるハンノキや、主に北海道に分布するシラカンバ等のカバノキ科の花粉には感染特異的タンパク質の一種(PR-10 family)が含まれる。カバノキ科花粉症の患者が、カバノキ科 PR-10 family と類似した構造の PR-10 family を食品とともに摂取し、発症する食物アレルギーを、花粉・食物アレルギー症候群(PFAS)という。カバノキ科花粉症と関連する PFAS(カバノキ科 PFAS)の原因食品は、果物から種実類、野菜等、多岐にわたる。また、食品に含まれる PR-10 family は、食品ごとに構造が異なる。

近年、花粉症を発症する児童の割合は増加している(Kusunoki T., Allergol. Int, 2009)。カバノキ科 PFAS を引き起こすハンノキ等の花粉は、全国で 9.3%~23%のアレルギー性鼻炎患者の症状と関連があるとされ(鼻アレルギー診療ガイドライン 2013)、児童の花粉症患者の一部はこれらの花粉が原因と考えられた。一方、カバノキ科 PFAS と関連する果物でアレルギーを持つ児童の割合は増加している(2016 年横浜市教育委員会報告書)。また、低年齢層で新たにアレルギーを発症する食品の割合は果物が多いとされる。以上から、児童のカバノキ科花粉症を含む花粉症患者が増加し、結果として果物に対する PFAS(果物アレルギー)発症児童数が増加したと推測される。

繰り返しアレルギーに感作されると症状は悪化する(福富友馬, Pharma Medica, 2012)。カバノキ科 PFAS の原因食品は果物を含めて多種類存在するため、感作の危険性が高い。また、PFAS は生涯寛解しないとされる。一方、PFAS による口腔内粘膜の荒れは、粘膜から他の食品のアレルゲンを体内に容易に取り込む要因となるため、別のアレルゲン感作につながる可能性が高い。したがって、成人と比較して食物摂取期間が長い児童は、カバノキ科 PFAS 発症後に繰り返しアレルギーに感作され、症状悪化や他のアレルギーへの感作、発症につながる危険性が高い。

一方、食品中の PR-10 family 含有量の報告は少なく、その実態は不明である。そこで、本研究では PR-10 family の分析法を確立して実態を明らかにし、カバノキ科 PFAS を持つ児童の感作、および発症を防止することを考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では質量分析計を用い、食品に含まれる PR-10 family を食品ごとに個別に一斉分析可能な分析法を確立する。この方法を用いてその実態を明らかにし、児童の食事からの PR-10 family 摂取量を制御可能な情報を提供する。以上から、カバノキ科 PFAS を持つ児童への原因食品の感作、および発症を防止することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)標準品、試料、機器

標準品にはセロリ、ニンジン、リンゴ、イチゴ、モモの PR-10 family であるそれぞれ Api g 1 (異性体 2 種類)、Dau c 1、Mal d 1、Fra a 1、Pru p 1 の市販リコンビナントを用いた。試料は市販品を用いた。生鮮品の陽性試料：セロリ、ニンジン、リンゴ、イチゴ、モモ、陰性試料：種々の野菜および果物、加工品のジュース類を用いた。分析装置は ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S (Waters) を用いた。

#### (2)試験溶液の調製

生鮮品はミキサーで粉碎後、緩衝液を加えてホモジナイズ抽出し、その遠心上清を用いた。加工品は遠心上清を用いた。上清を還元アルキル化、トリプシン消化の順に処理後、消化液にギ酸を添加し、アセトニトリルと混合して試験溶液とした。

#### (3)ペプチドの選定

in silico でそれぞれの PR-10 family に特異的なペプチドおよび分析条件を複数設定した。その条件で標準品および陽性試料の試験溶液を測定し、高感度なペプチドを選択した。これらのペプチドのうち、陰性試料およびデータベース検索で特異性が確認されたものを選択し、最も感度が良いものを定量用、次を確認用とした。

#### (4)分析法の性能確認

セロリ、ニンジンおよびジュースの遠心上清にそれぞれの標準品を添加して試験溶液を調製し、添加回収試験を実施した。その結果から、分析法の真度、併行精度、および室内精度を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1)ペプチドの選定

セロリ Api g 1 の異性体 2 種類、およびニンジン Dau c 1 については感度が良く特異性が高いペプチドをそれぞれ 2 種類ずつ選定できた。一方、リンゴ、イチゴ、モモではそのようなペプ

チドを選定することが難しかった。この原因として、果物ではタンパク含有量が少なく、PR-10 family 濃度が低いことが考えられた。また、含まれる PR10 family のアミノ酸配列の相同性が高く、特異性の高いペプチドが少なかった。以上から、質量分析計を用いた、果物に含まれる PR-10 family の分析法確立は困難と判断した。

#### (2) Api g 1 分析法の確立

Api g 1 の異性体 2 種類について、標準品の消化物で検量線を作成した。その結果、一方のペプチドで、特に低濃度域での検量線の直線性が悪化して定量が困難となった。この原因として、ペプチドの吸着、あるいは凝集等が考えられたため、吸着を防ぐ処理を導入した。その結果、直線性は改善し、検量線範囲内の定量が可能となった。また、もう一方の異性体でも同様の処理を導入し、検量線の直線性および定量に影響がないことを確認した。

続いて、陰性試料およびデータベースでペプチドの特異性を確認したところ、一方の異性体でパセリを検出した。同一の科に属する両者のアミノ酸配列の相同性が高かったため、この異性体では両者を判別可能なペプチドは存在しなかった。そこで、新たな判別法として DNA に基づいた PCR を検討した。セロリ、パセリをそれぞれ特異的に検出可能なプライマーを設計し、セロリおよびパセリと、その他のセリ科およびハーブ類 13 種類から抽出した DNA を用いて PCR を実施した。その結果、セロリ、パセリ、およびその他の食品との判別が可能であった。以上から、この異性体が検出、定量された場合、PCR を実施し、セロリ、パセリの含有の有無を確認することとした。

分析法の性能確認のため、2 種類の異性体をセロリ抽出液および野菜果実ジュースの遠心上清に添加し、分析法の真度、精度を算出した。その結果、全ての組み合わせで良好な結果が得られた (表 1)。

表 1. セロリ Api g 1 分析法の性能評価結果

		真度 (%)	室内精度 (%)	併行精度 (%)
生鮮品	異性体 A	95.0	7.8	7.8
	異性体 B	80.4	9.9	4.4
野菜果実 ジュース	異性体 A	89.2	11.0	8.0
	異性体 B	86.2	5.1	2.2

#### (3) Dau c 1 分析法の確立

Dau c 1 について、標準品の消化物で検量線を作成した。セロリとの一斉分析を考慮し、同様に吸着を防ぐ処理を導入したところ、検量線の直線性および定量に影響はみられなかった。また、陰性試料およびデータベースでペプチドの特異性を確認したところ、ニンジンのみを特異的に検出可能であった。分析法の性能確認のため、Dau c 1 をニンジン抽出液およびニンジンジュースの遠心上清に添加し、分析法の真度、精度を算出した。その結果、セロリ同様、全ての組み合わせで良好な結果が得られた (表 2)。

表 2. ニンジン Dau c 1 分析法の性能評価結果

		真度 (%)	室内精度 (%)	併行精度 (%)
生鮮品		98.5	8.1	7.1
ニンジンジュース		89.1	6.3	5.8

#### (4) 抽出条件の検討

生鮮セロリからの Api g 1、生鮮ニンジンからの Dau c 1 抽出条件について、それぞれ緩衝液 2 種類、振とうおよびホモジナイズの 4 通りの組み合わせで検討した。その結果、セロリではどの組み合わせでも良好な結果が得られた。一方、ニンジンではホモジナイズ抽出が必要であった。以上から、生鮮品については、緩衝液とホモジナイズ抽出の組み合わせを用いることで、Api g 1 および Dau c 1 の同時抽出が可能であることが分かった。続いて、加工品からの抽出を想定し、変性剤である尿素、およびグアニジン酸を用いた条件を検討した。その結果、これらの変性剤が含まれると抽出効率が低下したため、抽出条件のさらなる検討が必要と考えられた。今後、別の変性剤、あるいは界面活性剤を使用した抽出条件を検討する。

#### (5) 実態調査

生鮮セロリおよびニンジン、ジュース類について実態調査を実施した。結果を表 3 および表 4 に示した。表 3 より、セロリでは、異性体 A は B の 5.4-14.8 倍の濃度であった。また、セロリと比較し、セルリアックは Api g 1 濃度が 5 倍以上高く、ホワイトセロリは同程度であった。以上から、生鮮セロリでは異性体 A が多く含まれること、またカバノキ科 PFAS の患者は Api g 1 を高濃度に含むセルリアックの摂取に注意が必要と考えられた。また、表 4 より、Dau c 1 の濃度は、ニンジン生鮮品 5 試料で 27.7-53.6  $\mu\text{g/g}$ 、ニンジンを原材料に含む加工品 6 試料で 0.23-1.78  $\mu\text{g/mL}$  であった。この結果から、加工品の製造行程を経ても、Dau c 1 が残存する可能性が示唆された。一方、結果には示していないが、野菜果実ジュースの原材料にはセロリが含まれていた。分析したところ、定量下限を下回ったものの、異性体 A のピークが検出された。以上から、Api g 1 の異性体 A に関しても、Dau c 1 同様、加工品での残存の可能性が示唆された。このような情報は、花粉・食物アレルギー症候群の患者のアレルゲン摂取リスクの低減化に役立つと考

えられる。

表3. セロリApi g 1実態調査結果

試料の種類	Api g 1		濃度比*1
	異性体A 試料中濃度(μg/mL)	異性体B 試料中濃度(μg/mL)	
セロリA	6.35	0.98	6.5
セロリB	4.59	0.31	14.8
セロリC	15.12	1.73	8.7
セロリD	2.71	0.37	7.3
セロリE	4.03	0.39	10.3
ホワイトセロリ	5.64	N.D.*2	_*3
セルリアック	76.92	14.33	5.4

定量下限: 0.125 μg/mL、n=5

\*1: 異性体A/異性体B、\*2: 定量下限未満、\*3: 算出不能

表4. ニンジンDau c 1実態調査結果

産地	Dau c 1濃度 (μg/g)	試料名	Dau c 1濃度 (μg/mL)
兵庫県産	27.7	ニンジン ジュース	1.24
青森県産	53.6		0.92
長崎県産#1	38.8		0.16
長崎県産#1	38.8	野菜果実 ジュース#2	1.38
北海道産	46.8		0.40
定量下限: 0.125 μg/g, n=5			0.29
#1: 商品が異なる		定量下限: 0.025 μg/g, n=5	
		#2: 原材料にニンジンを含む	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉光真人、清田恭平
2. 発表標題 ニンジンアレルギーDauc 1の分析法開発
3. 学会等名 日本食品衛生学会第117回学術講演会（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉光真人、清田恭平
2. 発表標題 セロリアレルギーApi g 1分析法について
3. 学会等名 第57回全国衛生化学技術協議会年会（紙上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉光真人、清田恭平、角谷直哉
2. 発表標題 食品中の花粉-食物アレルギー-症候群を引き起こすアレルギーの分析法検討
3. 学会等名 第56回 全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------