

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08694

研究課題名（和文）アニサキスアレルゲンの低アレルゲン化による再発予防法の確立

研究課題名（英文）Establishment of methods of prevention for anisakis allergy by reducing allergenicity

研究代表者

猪又 直子（INOMATA, NAKO）

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：20347313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アニサキスアレルギーに関する研究であり、種々の加工処理を施したアニサキスの抽出液を作成し、イムノブロットや好塩基球活性化試験、皮膚試験（プリックテスト）によってアレルゲン性を評価した。その結果、加熱や加圧によりアニサキスのアレルゲン性が低下する傾向がみられ、特に140℃以上の加熱ないし加圧ではその傾向が顕著であった。一方、冷凍処理（-80℃まで、24時間）では低減化する傾向は確認できなかった。また、アニサキス抽出液中の主要アレルゲン含有量の半定量解析では、加工処理のレベルによりアレルゲン含有量に変化が生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、アニサキスアレルギーにおいて、加工処理によるアレルゲン性の変化について十分解析されておらず、どの程度加工したものであれば経口摂取できるかは明らかではなかった。本研究結果は、アニサキスアレルゲンの低減化に関する新たな知見となった。同時に、本研究結果は、アニサキスアレルギー患者に対して、熱や加圧などの加工処理によるアレルゲンへの反応性を確認する検査方法の提案、およびその検査結果に基づいた必要最小限の除去指導の一助になることが期待される。今後、さらなる低アレルゲン化法の確立を目指しながら、アニサキスアレルギー患者のQoL向上に貢献できるように努める予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, extracts of Anisakis that had been subjected to various processing treatments were prepared, and their allergenicity was evaluated using IgE-immunoblotting, basophil activation tests and skin tests. As a result, it was found that the allergenicity of Anisakis tended to decrease when heated or pressurized at 140 °C or higher. On the other hand, freezing treatment (up to -80 °C, 24 hours) did not reduce the allergenicity. In addition, a semi-quantitative analysis of the major allergen content in the Anisakis extracts revealed that the allergen content changes depending on the level of processing.

研究分野：アレルギー

キーワード：アニサキスアレルギー アレルギー アナフィラキシー アレルゲン 予防

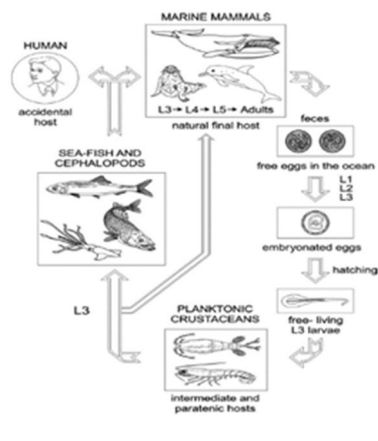
1. 研究開始当初の背景

アニサキス(*Anisakis simplex*)は魚に寄生する線虫の一種で、寄生された魚類を摂取すると、消化管アニサキス症や、アニサキスによる I 型アレルギーを発症することがある。アニサキスアレルギーでは、魚類を摂取した数時間以内に、蕁麻疹や血管性浮腫、喘息、消化器症状が現れ、ときにアナフィラキシーショックに進展する。近年、本症は、皮膚科のみならず内科、小児科、救急科など複数の診療科で数多く報告されるようになった。また、日本食のグローバル化により、海外でも生魚の摂取機会が増え、今後海外でも本症の増加が懸念される。

千葉県 の 3 施設で実施されたアナフィラキシーの疫学調査では、原因を特定できた症例のうち約 55% は魚摂取後に発症しており、うち 91% は魚類の特異的 IgE は陰性であったが、アニサキス特異的 IgE 抗体陽性であった。つまり、魚摂取後のアナフィラキシー症例の約 90% はアニサキスアレルギーであることが判明した (Morishima et al. *Allergy*, 00 : 14 , 2019)。「食物アレルギー診療の手引き 2017」によれば、20 歳以上で新規発症した食物アレルギーの原因食品の第 2 位は魚類であるため、これに隠れたアニサキスアレルギーの社会的インパクトは大きいといえる。

これに対し、アニサキスアレルギーの予防策は十分に確立していない。本来は一次予防が理想であるが、日本の食文化を考慮すると未病者に魚の生食を禁止することは現実的ではない。そこで、次善の策として、すでに発症した患者の再発予防、すなわち誤食を防ぐための食事指導を適切に行うことが重要になる。実際、不適切な食事制限からアニサキスによるアナフィラキシーを 4 回も繰り返した症例が報告されている (飯島 茨城県臨床医学雑誌 53:77;2018)。本症の食事指導は、アニサキス症に準じて死滅すれば摂取可との意見もあれば、アナフィラキシーを経験した症例であれば魚類を完全除去すべきとの意見もあり、議論がわかれている。死滅してもアレルギー性が残存するとの意見に従えば、焼く・煮るなどの調理品、缶詰め、練り物、出し汁などを含め、すべての魚類の全加工食品の除去を強いられ、患者の食生活の QOL は著しく低下する。その一方で、アレルギー性の検証なしに摂取を許可した場合、再発のリスクは免れない。このように食事指導が統一できない背景には、臨床的意義の高いアレルギー同定の遅れ、加工品中のアニサキスのアレルギー性の評価が十分に検討されておらず、低アレルギー化に適した加工処理に関する知見が不足していることが挙げられる。

そこで、「アニサキスアレルギーの臨床的特徴は何か」、「アニサキスのアレルギー性をなくすにはどの程度まで変性あるいは分解すればよいか」、「その変性や分解に適した加工法はなにか」、これらの問いについて解析することが必要と考えられる。



本研究でマサバから採取したアニサキス

アニサキスの生活環 Audicana MT, Kennedy MW. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008. 21:360-79

2. 研究の目的

アニサキスアレルギーの近年の動向を分析した上で、加工処理によるアニサキスアレルギーのアレルギー性への影響や量的な変化を解析することによって、低アレルギー化に有効な加工法を考案することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まずアニサキスアレルギーの過去 5 年間の動向および臨床的特徴を解析した。次に、アニサキスに種々の加工処理を施しアレルギー性が低下したか評価した。各処理方法による低減化効果を比較した。さらに、加工処理によるアレルギー量の変化を半定量的に評価した。

具体的な方法は、以下の通りである。

(1) アニサキスアレルギーの過去5年間の動向および臨床的特徴の解析

過去5年間に横浜市立大学附属病院を受診し、アニサキスアレルギーが疑われ、検査を実施した症例を対象に、疫学的情報やアレルギー検査結果を解析した。

(2) アニサキスアレルゲンの低アレルゲン化とその評価

アニサキスアレルゲン粗抽出液の作成

季節ごとに寄生率が多いとされる魚類(サバ、アジ、イワシなど)を購入し、ブラックライト照射下にピンセットでアニサキス第3期幼虫を採取した。採取したアニサキス虫体を計測し、一定量ずつに分けて、溶媒を加え、ソニケーターやミキサーで破碎後、懸濁液を作成し、冷蔵下で攪拌し、遠心による上清を採取した。さらに、溶媒置換、透析などを施行し、アレルゲン抽出液を作成した。

アニサキスアレルゲンの加工処理

アニサキスアレルゲンを低アレルゲン化するために、加工処理を施した。低アレルゲン化をもたらす加工には、変性、分解、除去による方法があり、本研究では変性を目的とした加熱、加圧、冷凍の3種類を用いた。加熱温度、圧力を変えてアニサキスを処理した後のアレルゲン性を調べ、温度や圧力依存性に低減化できるのか評価した。また、冷凍については、冷凍の温度、期間などの条件を設定して解析した。

加工処理によるアレルゲン性の評価

アレルゲン性の評価は、*in vitro*検査、*ex vivo*検査、*in vivo*検査の3段階の評価系を用いた。*In vitro*評価法としてイムノプロットを、*ex vivo*評価法として好塩基球活性化試験を、*in vivo*評価法として皮膚試験(プリックテスト)を行う。本研究は自施設の倫理審査委員会で承認を得た上で、当院患者から研究同意を得たのち、患者血清と全血の採取、およびプリックテストを施行した。

加工処理によるアレルゲンの定量評価

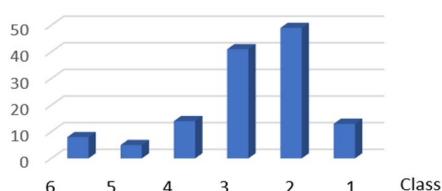
加工処理後に残存したアニサキスアレルゲンをイムノプロットで検出し、半定量解析を行った。イムノプロットに用いる抗アニサキスIgG抗体は次のように作成した。アニサキスアレルゲンのペプチドを合成し、アジュバントとともにウサギ腹腔内に反復投与した。免疫されたウサギから採血を行い、抗血清を分離し、アニサキスアレルゲンに対する抗体とした。得られた抗アニサキスアレルゲン抗体を用い、イムノプロットにてアニサキス抗原量の測定系を作成し、加工によるアレルゲンのタンパク量を測定した。

4. 研究成果

(1) アニサキスアレルギーの実態の把握および臨床的特徴の解析

2015年7月1日から2020年6月30日までの5年間に横浜市立大学附属病院を受診し、アニサキスアレルギーを疑われ、検査を実施した症例342例を対象とした。アニサキスアレルギーの血液検査を施行した件数は、2015年度72件、2016年度68件、2017年度73件、2018年度73件、2019年度56件で、年間約60~70件で推移し、過去5年間における、年度別検査件数に大幅な増減はなかった。また、アニサキス特異的IgE抗体測定(ImmunoCAP、Thermo Fisher Scientific)では、クラス6を示した症例は8例、クラス5は5例、クラス4は14例であった。最重症のクラス6を示した8例について、男女比は5:3と男性に多く、年齢は18~87歳(平均58歳)で1例を除き、40歳以上であった。臨床的特徴として、魚類やイカの刺身摂取後の蕁麻疹、血管性浮腫などの皮膚症状が多く、1例は消化器症状のみであった。7例はアナフィラキシーに進展し、うち3例は意識障害などショック症状を伴っていた。胃痛、腹痛、嘔吐、下痢などの消化器症状が主症状で消化器内科や外科で胃・小腸アニサキス症の診断(疑いを含め)を受けた例が3例含まれていた。原因食品摂取から症状出現までの時間は2~6時間、特に2~3時間が多く一般的なI型アレルギーより遅い傾向があることがわかった。魚の種類はサバ、イワシ、カツオ、サンマなどが多かった。

No. of cases



アニサキス特異的IgE抗体クラス別の陽性者数

(2) アニサキスアレルゲンの低アレルゲン化とその評価

アニサキス抗原抽出液の解析

アニサキス虫体を溶液と混合し、ソニケーターにより攪拌し、遠心分離後、上清を採取し粗抗原液とした。抗原液を用い、ポリアクリルアミドゲルを利用して電気泳動したところ、分子量1~200kDa以上の幅広い範囲に多数のバンドを検出した。以後、本抽出液を粗抗原液として使用することとした。患者血清を用いたイムノブロットでは、1名の患者血清が複数のタンパクバンドに結合する傾向がみられた。

加工処理によるアレルゲン性の評価

本研究では変性による方法を採用し、加熱、冷凍、さらに加圧を検討した。生きた虫体を採取し、の方法により粗抗原液を作成し、加熱は20~140℃まで、加圧は常圧と加圧、冷凍は-20~-80℃まで加工処理を行った。種々の加工処理を施した抗原液を抗原として、患者全血を用いた好塩基球活性化試験(CD203c 活性化解析)を施行した。好塩基球活性化試験やブリックテストの結果、温度や時間依存性にアニサキスアレルゲンのアレルゲン性が低下する傾向がみられ特に140℃以上の加熱ないし加圧で顕著であった。一方、冷凍処理(マイナス80℃まで、24時間)ではアレルゲン性が低減化する一定の傾向はみられなかった。また、種々の加工処理を施したアレルゲン抽出液を用いた皮膚試験(ブリックテスト)でも、好塩基球活性化試験と同様の傾向があることを確認した。

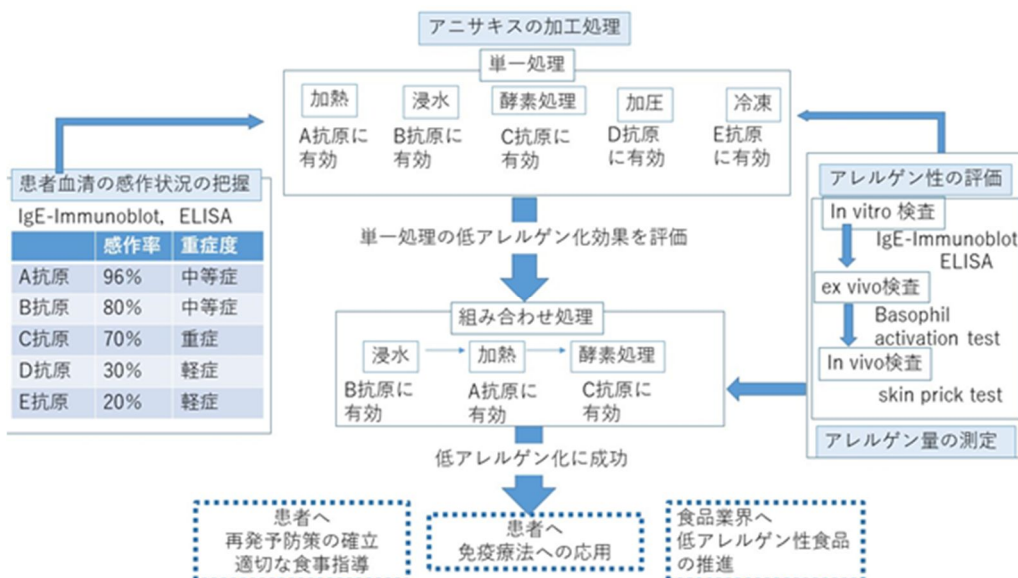
加工処理によるアレルゲンの定量評価

アニサキスの粗抗原液中の主要アニサキスアレルゲン含有量の半定量解析を行い、加工処理による影響を解析した。主要アレルゲンの中からAni s 1などの抗血清を作成し、イムノブロット法を用いて解析した結果、加工処理のレベルによりアレルゲン含有量に変化が生じることが明らかになった。

< 結論と今後の展望 >

本研究の結果から、アニサキスアレルギーでは、アニサキスに加熱や加圧などの加工処理を施してもアレルギー反応が生じる可能性が示唆された。一方、一部の患者ではアニサキスが寄生した海産物であっても、加熱や加圧により摂取できる可能性も示すことができた。このように個々の患者の感作状況により、摂取できる海産加工品が異なることが明らかになった。

今後、本研究成果が、加工方法別のアレルギー反応性を評価する検査法の開発や、精緻な個別化指導の推進に繋がるものと考ええる。また、本成果がアニサキスに関する低アレルゲン化食品の開発や根治に導く免疫療法へと応用され、今後の新たな展開により、患者のQoL向上に寄与することを期待する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 猪又直子	4. 巻 109
2. 論文標題 増えている大人の消化管アレルギー 109巻7号	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 診断と治療	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 食物によるアレルギー性蕁麻疹の診断と治療
3. 学会等名 日本皮膚科学会 東北六県合同地方会学術大会 第398回例会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 成人食物アレルギー
3. 学会等名 第16回相模原臨床アレルギーセミナー2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 ジベレリンGRP 納豆 成人FA診療実態
3. 学会等名 第59回日本小児アレルギー学会学術大会 APAPARI（Asia Pacific Academy of Pediatric Allergy, Respiriology & Immunology）2022合同開催（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 ペットと食物アレルギー
3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会 総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 皮膚科から見た、喘息・アレルギー疾患における臨床連携とその実際
3. 学会等名 第31回国際喘息学会日本・北アジア部会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Inomata
2. 発表標題 Clinical characteristics of patients with a high sensitization to Anisakis simplex
3. 学会等名 The APAAACI 2021 International Conference, Singapore, Singapore, 15/10/2021-17/10/2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 成人食物アレルギー
3. 学会等名 第15回相模原臨床アレルギーセミナー2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 経皮感作の基礎と臨床： up to date 皮膚科の立場から
3. 学会等名 第70 回日本アレルギー学会学術大会, 横浜, 10月8 - 10日 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoko Inomata
2. 発表標題 Mast cell-mediator induced angioedema, Update
3. 学会等名 UCARE 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 アレルギー診断検査の実際
3. 学会等名 2019年度 日本皮膚科学会研修講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 猪又直子
2. 発表標題 食物アレルギー診療におけるアレルギーコンポーネント活用法、特殊型FA診断へのアプローチ.
3. 学会等名 第69回アレルギー学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaura M, Inomata N et al.
2. 発表標題 Effect of food processing on allergenicity in anisakis allergy
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第49回年次学術大会・総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 猪又直子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 協和企画	5. 総ページ数 419
3. 書名 アレルギー総合ガイドライン	

1. 著者名 猪又直子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 277
3. 書名 見てわかる 見せて使える 季節の皮膚疾患	

1. 著者名 猪又直子(編著 永田 真)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 220
3. 書名 アレルギー診療必携ハンドブック	

〔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
---------	---------