

〔原 著〕

食物負荷試験用に製造した乾燥食品粉末の アレルギー性の *in vitro* による評価

東京水産大学食品生産学科

嶋倉邦嘉 長島裕二 塩見一雄

キュービー株式会社研究所

久能昌朗

国立相模原病院小児科

海老澤元宏

国立成育医療センター総合診療部

赤澤 晃

昭和大学小児科学教室

飯倉洋治

食物負荷試験 (FPT) は食物アレルギーの重要な診断法の一つであるが、FPT 用の標準抗原は開発されていない。本研究では、5 種類の食物 (牛乳、鶏卵、鶏肉、大豆および小麦) からスプレードライ法またはフリーズドライ法により粉末を製造し、FPT 用抗原としての有用性を *in vitro* で調べた。SDS-PAGE では、各粉末およびその原料の抽出液は同じまたは類似した泳動パターンを示した。食物アレルギー患児の血清を用いた ELISA で分析したところ、各粉末抽出液の反応性と原料抽出液の反応性との間には良好な相関 ($r=0.853-0.978$) がみられた。さらに、牛乳、鶏卵および大豆では、粉末抽出液および原料抽出液を固相化抗原として用いても阻害剤として用いても、ほぼ同じ ELISA 阻害曲線が得られた。これらの結果から、各粉末は原料と同じアレルギーを同レベルで含み、FPT 用抗原として有用であると判断された。なお、粉末のアレルギー性は -20°C または 5°C 貯蔵では 18 カ月以上安定であることも判明した。

Key words : allergenicity — dried food powder — ELISA — food allergy —
food provocation test

はじめに

食物負荷試験 (FPT) は食物アレルギーの原因食物

の確定診断法であり、アメリカにおいてもゴールドスタンダードとして推奨されている¹⁾。しかし、FPT に必須の標準抗原が確立されていないため、各医療機関では必要に応じて独自に FPT 用抗原を調製しているのが現状であり、異なった医療機関間での試験成績はもとより、同一機関内での試験成績も客観的に比較評価することが困難である。

食物はそれぞれ固有の形態、色調、風味、香気、テクスチャなどを有している。シングルブラインドで FPT を実施する場合には被験者に、ダブルブラインドで FPT を実施する場合には被験者および検者の両者

Received : November 11, 2002

Accepted : April 28, 2003

Abbreviations : ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ; FPT food provocation test ; SDS-PAGE sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

嶋倉邦嘉 : 東京水産大学食品生産学科 [東京都港区港南 4-5-7]

E-mail : kunisan@tokyo-u-fish.ac.jp

Table 1 Manufacturing process of five kinds of powders

Material	Manufacturing process
Cow's milk	Sterilization (110°C, 30sec) → Concentration → Spray-drying
Hen egg	Pasteurization (63°C, 30min) → Spray-drying
Chicken	Pasteurization (85°C, 30min) → Freeze-drying → Grinding
Soybean	Peeling testae → Grinding → Mixing with water → Pasteurization (85°C, 45min) → Freeze-drying → Grinding
Wheat	Flouring → Mixing with water → Pasteurization (85°C, 30min) → Freeze-drying → Grinding

に、検査する食物の種類がわからないようにすることが重要である。ところが、そのままあるいは食べられるように加熱しただけの検査対象の食物を用いて FPT を実施すると、マスキング剤の多用による用量増加を招きかねない。その結果、たとえば投与量を変えつつあるいは複数の食物を対象として同時に FPT を実施する場合、投与しきれないことが検査の有効性や試験成績の定量性に影響するなどの問題が想定される。また、実際には FPT の現場で常にアレルギー性が均一な負荷食物を準備することは難しい。これらの問題を回避するには負荷食物に何らかの加工を施す必要があるが、均一性の点で粉末化が最も適していると考えられる。

乾燥粉末であれば保存性が向上し、不透明なカプセルに充填したり必要最少量のマスキング用の飲食物に混和して供試できる。また、原因食物を一樣な方法で、しかも同時に多品目を対象として検査し易いこと、さらに医療現場で要時調製が容易であるという利点も挙げられる。したがって乾燥粉末は、食物本来のアレルギー性が保持されていること、一定期間の保存中にもアレルギー性が変化しないことが保証されれば、FPT 用の共通の標準抗原として多くの医療機関で採用されることが期待される。そこで本研究では、5 種類の食物（牛乳、鶏卵、鶏肉、大豆および小麦）から製造した FPT 用の乾燥粉末について、そのアレルギー性を原料食物を対照として酵素標識免疫吸着法（ELISA）および阻害 ELISA によって明らかにするとともに、貯蔵中のアレルギー性の変化を検討した。

試料および方法

食物試料

FPT 用の乾燥粉末試料（本論文では単に「粉末」と

称する）は、牛乳、鶏卵（全卵）、鶏肉、大豆および小麦を原料とし、Table 1 に示す工程に従ってスプレードライ法またはフリーズドライ法によって製造した（キューピー（株）製）。各粉末は直ちに約 5g 毎に不透明でガス不透過性の材質（本体、ポリプロピレン/エチレンビニルアルコール共重合樹脂/ポリプロピレン；蓋、ナイロン/アルミ蒸着ポリエチレンテレフタレート/ナイロン/ポリエチレン）から成る容器に充填、密封した（キューピー（株）製）。一方、対応する原料（本論文では単に「対照」と称する）として、市販の牛乳（成分無調整、高温短時間殺菌牛乳）、鶏卵、鶏肉（皮を除いた胸肉）、大豆（国産）および小麦粉（薄力粉）を購入した。

抽出液の調整

各粉末に 3 倍量の 0.15mol/l NaCl を含む 10mmol/l リン酸緩衝液（pH 7.2, PBS）を加え、5°C 下で一晩攪拌した。懸濁液を遠心分離（18000×g, 5°C, 20 分間）後、得られた上清を孔径 0.8μm のフィルターでろ過し、ろ液を各粉末の抽出液とした。各抽出液は使用するまで -20°C 下に凍結保存した。以下に述べる対照の抽出液調製にあたっては、遠心分離およびろ過はすべて粉末と同じ条件で行った。

対照の食物の抽出液は次のように調製した。牛乳は 4 倍量の PBS で希釈後、よく攪拌してから遠心分離後ろ過し、ろ液を加熱対照牛乳抽出液とした（抽出液調製時には加熱していないが、対照に用いた牛乳は加熱殺菌されているので、本論文では対照牛乳の抽出液は加熱抽出液とする）。鶏卵は割卵後よく混合し、その一部を 4 倍量の PBS とホモジナイズした。ホモジネートの一部を 63°C で 30 分間加熱した。加熱および非加熱のホモジネートを遠心分離し、上清のろ液をそれぞれ加熱対照鶏卵抽出液、非加熱対照鶏卵抽出液とした。鶏肉は 4 倍量の PBS とホモジナイズし、ホモジネート

Table 2 Total IgE and RAST class of patient sera

Subject number	Total IgE (IU/ml)	RAST class				
		Cow's milk	Hen egg	Chicken	Soybean	Wheat
1	242	<u>3</u> *	<u>3</u>	N.D.**	N.D.	N.D.
2	469	<u>2</u>	<u>4</u>	N.D.	N.D.	N.D.
3	545	<u>3</u>	<u>4</u>	N.D.	N.D.	N.D.
4	890	<u>6</u>	<u>6</u>	N.D.	<u>4</u>	<u>4</u>
5	1366	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>N.D.</u>	<u>N.D.</u>	<u>4</u>
6	3297	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>4</u>
7	4349	<u>5</u>	<u>6</u>	N.D.	<u>3</u>	<u>4</u>
8	4435	<u>3</u>	<u>4</u>	N.D.	<u>3</u>	<u>3</u>
9	5049	<u>6</u>	<u>5</u>	N.D.	<u>6</u>	<u>5</u>
10	11900	<u>6</u>	<u>6</u>	N.D.	<u>4</u>	<u>6</u>

* Underline: tested and provoked foods. ** N.D.: not determined.

の一部を沸騰水浴中で 10 分間加熱した。加熱および非加熱のホモジネートを遠心分離し、上清のろ液をそれぞれ加熱対照鶏肉抽出液、非加熱対照鶏肉抽出液とした。大豆は PBS に一晚浸漬後、種皮を除いてから湿重量に対して 3 倍量の PBS を加えてホモジナイズした。このホモジネートから鶏肉と同様に加熱対照大豆抽出液、非加熱対照大豆抽出液を調製した。小麦粉の場合、4 倍量の PBS を用いて粉末と同様な方法により非加熱対照小麦抽出液を調製した。さらに、この抽出液の一部を沸騰水浴中で 10 分間加熱し、遠心分離で得られた上清のろ液を加熱対照小麦抽出液とした。いずれの抽出液も使用するまで -20°C に凍結保存した。

タンパク質の定量

ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質に用い、Lowry ら²⁾の方法に従って定量した。

SDS-PAGE

各抽出液の SDS-PAGE は全自動電気泳動システム (PhastSystem, ファルマシア) を用いて行った。既製のゲル (Gradient 8-25, ファルマシア) およびバッファーストリブス (PhastGel SDS Buffer Strips, ファルマシア) を使用した。泳動およびクーマシーブリリアントブルー R-250 による染色は、PhastSystem のマニュアルに記載されたプログラムに従った。泳動に先立ち、各抽出液のタンパク質濃度を 0.02mol/l トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて 5mg/ml に調整後、等量の 40% グリセロール-10% ジチオスレイトール-5% SDS 溶液と混合し、沸騰水浴中で 10 分間加熱した。なお、分子量マーカーとして LMW マーカー

キット (アマシャムバイオサイエンス) を用いた。ヒト血清

10 名の食物アレルギー患児 (subjects 1~10, 1~5 歳) から得た血清を患児血清として用いた。患児血清の総 IgE および牛乳、鶏卵などに対する CAP RAST クラスを Table 2 に示す。各患児において牛乳、鶏卵、鶏肉、大豆および小麦のうちのいくつか、あるいはすべてについて既報³⁾による FPT を実施したところ、供試したすべての食物において症状誘発を確認した。各患児毎の誘発を確認した食物は、Table 2 中にアンダーラインで示してある。コントロール血清としては即時型アレルギーの既往歴も自覚症状もない成人 2 名 (subjects 11 および 12) の血清を用いた。

ELISA

ELISA は既報⁴⁾に準じて次のように行った。まず、固相化緩衝液 (0.15mol/l NaCl を含む 50mmol/l 炭酸緩衝液, pH9.5) で適宜希釈した試料溶液 $100\mu\text{l}$ を 96 ウェル平板 ELISA プレート (ELISA 用プレート H, 住友ベークライト) の各ウェルに分注し、 37°C で 2 時間インキュベートした。0.05% Tween 20-Dulbecco's リン酸緩衝液 (pH7.4, DPBS) $400\mu\text{l}$ で 5 回洗浄 (以下の洗浄操作はすべて同様に行った) 後、 $450\mu\text{l}$ のブロッキング液 (1.0% BSA-DPBS) でウェルを満たし 37°C で 2 時間インキュベートした。洗浄後、一次抗体溶液として血清希釈液 (0.1% 3-[(3-クロルアミドプロピル) ジメチルアミノ] プロパン硫酸塩-DPBS, pH 7.4, CHAPS-DPBS) で 1:50 に希釈した血清試料を $100\mu\text{l}$ ずつ分注後、 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体溶液としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗



Fig. 1. SDS-PAGE of the crude extracts from powders and controls. **M**, molecular weight markers ; **H**, heated control ; **P**, powder ; **R**, raw control.

ヒト IgE 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories) を CHAPS-DPBS で 1 : 2500 に希釈した溶液を 100 μ l ずつ分注し, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベート後, 洗浄した. 次いで基質溶液 (0.1% α -フェニレンジアミン二塩酸塩—0.03% 過酸化水素—0.05mol/l リン酸—クエン酸緩衝液, pH5.0) を 100 μ l ずつ加え, 室温遮光下で 10 分間反応させた. 1 mol/l 硫酸 100 μ l を加えて酵素反応を停止後, マイクロプレートリーダー (パイオラッド, Model 450) を用いて 490nm における吸光度を測定した. 試験は各試料について少なくとも 3 回行い, 結果は平均値で示した.

阻害 ELISA

牛乳, 鶏卵および大豆の粉末抽出液, 加熱対照抽出液とともにタンパク質濃度を 10 μ g/ml に調整し, ELISA プレートに 100 μ l ずつ固相化した. DPBS を用いてタンパク質量を 0.01~1000 μ g/ml に調製した各抽出液と CHAPS-DPBS で 1 : 25 に希釈した患者血清を等量混ぜ, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間プレインキュベートした溶液を一次抗体として用いた他は, ELISA の項で述べた方法と同様に行った.

貯蔵安定性

密封包装された 5 種の粉末を製造日から -20, 5 および 20 $^{\circ}$ C でそれぞれ 600 日間, 18 カ月間および 6 カ月間保存した. -20 $^{\circ}$ C では 200 日毎に, 5 $^{\circ}$ C では 3 カ月毎に, 20 $^{\circ}$ C では 1 カ月毎に容器を開封して得た粉末から抽出液を調製した. 各抽出液は調製後直ちに -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した. 各温度における最終貯蔵期間経過時に調製した抽出液は凍結せずに, 直ちにそれまでの抽出液とともにタンパク質量を 10 μ g/ml に調整して

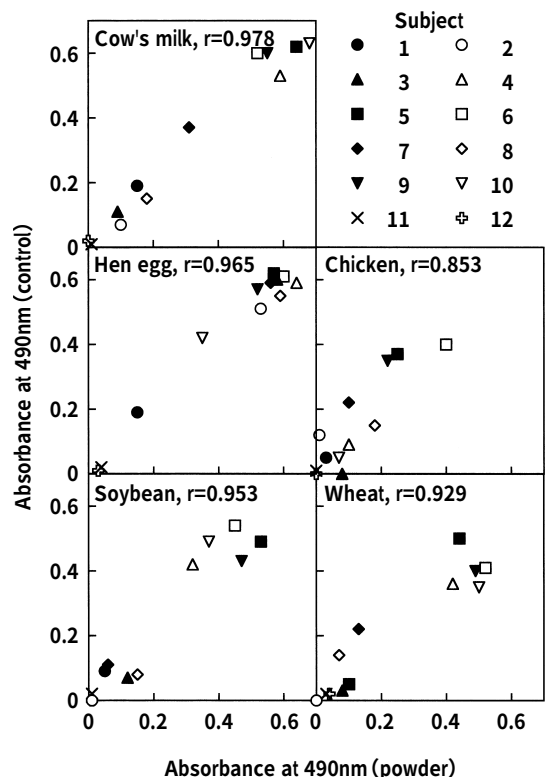


Fig. 2. Analysis by ELISA of the IgE reactivities to the crude extracts from powders and controls. Correlation coefficient (r) between the results with each powder and control is indicated at the upper left corner after the name of food in each graph. Subjects 1-10 are as in Table 2 and subjects 11 and 12 are controls.

ELISA に供した.

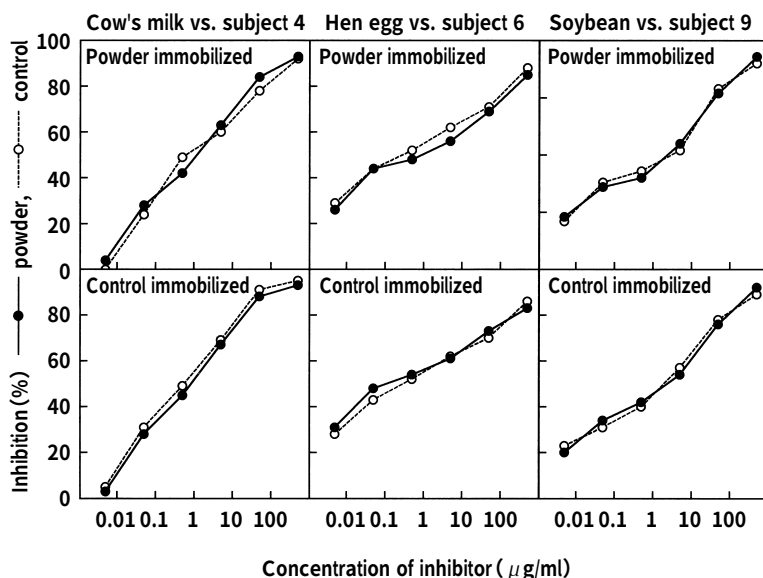


Fig. 3. Inhibition of the binding of IgE antibodies in patient sera to immobilized powders or controls by powders or controls. Each serum (1 : 25 dilution) was incubated with an equal volume of inhibitor solution (0.01-1,000 μ g/ml) at 37°C for 1 hr and then added to the plate that had previously been coated with powders or controls (1 μ g/well). Subjects 4, 6 and 9 are as in Table 2.

結 果

SDS-PAGE

各試料の泳動結果を Fig. 1 に示す。牛乳では粉末と対照のバンドのパターンは酷似していた (レーン 2 と 3)。鶏卵では対照において加熱と非加熱間におけるバンドのパターンの相違は認められなかった (レーン 4 と 6)。一方、鶏卵粉末では加熱および非加熱対照に比べるとバンドが相対的に濃く検出されているが (レーン 5)、対照とのバンドのパターンとの大きな相違は認められなかった。鶏肉では加熱対照と非加熱対照ではバンドのパターンが著しく異なっており (レーン 7 と 9)、粉末のバンドのパターン (レーン 8) は加熱対照と類似性を示した。しかし、粉末鶏肉で 35kDa に認められたバンドは加熱、非加熱両者の対照鶏肉に認められなかった。大豆においても加熱対照と非加熱対照間のバンドのパターンに多少の相違が認められ (レーン 10 と 12)、加熱対照では 37kDa および 76kDa のバンドが非加熱対照に比べて濃く検出された。粉末ではこれらの両バンドに加えて 23kDa および 45kDa のバンドも濃く検出された (レーン 11)。小麦では非加熱対照で 60kDa 付近にバンドが濃く検出されているが (レーン

15)、加熱対照および粉末ではこれに相当するバンドが検出されず (レーン 13 と 14)、粉末において 40kDa および 58kDa のバンドが検出されたが、その他のバンドのパターンは、加熱対照に対応していた。

粉末と対照に対する IgE 反応性の比較

各粉末抽出液および加熱対照抽出液のタンパク質量を 10 μ g/ml に統一し、患者血清との反応性を ELISA で比較した。Fig. 2 に見られるように、いずれの血清に対しても 5 種すべての食物において粉末と対照でほぼ同等の反応性が認められ、相関係数は 0.853~0.978 の範囲であった。t 検定および Wilcoxon 検定の結果、粉末と対照間での有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。なお、コントロール血清 (subjects 11 および 12) ではいずれの試料に対してもほとんど反応が認められなかった。

阻害 ELISA

牛乳、鶏卵および大豆を試料として実施した阻害 ELISA の結果を Fig. 3 に示す。これら 3 種の食物において、粉末抽出液を固相化して粉末抽出液および加熱対照抽出液を阻害剤に用いた場合でも、加熱対照抽出

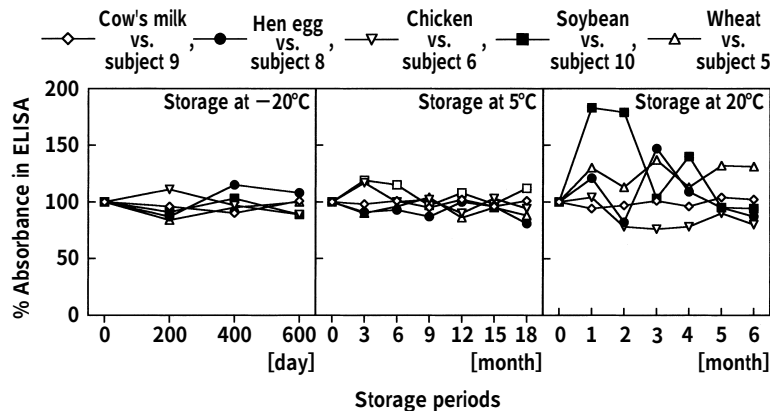


Fig. 4. Change in IgE reactivity of powders during storage at -20, 5 or 20°C. The absorbance in ELISA obtained with the sample before storage was expressed as 100 %. Subjects 5, 6, 7, 8, 9 and 10 are as in Table 2.

液を固相化して粉末抽出液および加熱対照抽出液を阻害剤に用いた場合でも、阻害率は患児血清とのプレインキュベート時における阻害剤の濃度に対し依存的に変化した。また、阻害率の変化の様相は、それぞれの食物における4通りのアッセイ間で相互によく類似していた。なお、Fig. 3に示した他に牛乳では subjects 7 および 9 血清、鶏卵では subjects 4 および 7 血清、大豆では subjects 4 および 6 血清についても同様な検討を行ったが、いずれも Fig. 3 とほぼ同様な傾向が認められた(図示せず)。なお患児血清量の都合上、鶏肉と小麦については検討に至らなかった。

貯蔵安定性

粉末試料を-20, 5 および 20°C に貯蔵した時の ELISA における結果を、0 日目の試料より得られた吸光値を 100% とし、各貯蔵期間を経た試料の吸光値に対する百分率を算出して Fig. 4 に示す。-20°C 貯蔵および 5°C 貯蔵の場合、吸光値は貯蔵中に上下したが、いずれの試料においてもその変動幅は小さかった。したがって、5 種粉末のアレルゲン性は-20°C 貯蔵では 600 日間、5°C 貯蔵では 18 カ月間はおおむね維持されていると判断された。一方 20°C 貯蔵の場合、牛乳のみは貯蔵中の吸光値は安定していたが、鶏卵と大豆では吸光値の変動は著しく、また鶏卵では貯蔵中の減少、小麦では上昇傾向が認められた。

考 察

本研究で対象とした5種食物(牛乳、鶏卵、鶏肉、大豆および小麦)のうち、鶏卵は生で摂取されることも多いが、その他の4種は一般的に加熱して摂取されている(市販牛乳は加熱殺菌されているので、加熱して摂取される食物と考えておく)。加熱対照抽出液は加熱して摂取されることを想定したものであるが、その SDS-PAGE パターンを粉末抽出液と比べると、牛乳では完全に、小麦では 40kDa および 58kDa のバンドを除いて一致し、鶏卵、鶏肉および大豆においてもかなり類似していた。これらの結果は、FPT 用に製造した粉末のタンパク質構成が、5 種いずれの食物においても実際に加熱して負荷させるときとほぼ同じであることを意味し、粉末の FPT への適用の有用性を示唆している。また FPT 用粉末は、殺菌のための加熱やスプレードライ、フリーズドライなどの工程を経て製造したが、これらの工程が各食物のタンパク質の構成にほとんど影響を及ぼさないことも確認されたと言える。なお、鶏卵を除く非加熱対照抽出液の SDS-PAGE パターンは加熱対照抽出液とはかなり異なったが、鶏卵では両者は一致していた。したがって、鶏卵から製造した FPT 用粉末のタンパク質の構成は、鶏卵を加熱して摂取する場合だけでなく生で摂取する場合も反映していると判断された。

Fig. 2 に示したように、粉末と対照間の ELISA の結果には高い相関性が認められた。これらの結果はどの粉末も FPT に適用できることを強く支持するもので

ある。なお、本検討では各食物中のアレルゲン毎の比較を行っていないが、阻害 ELISA の結果 (Fig. 3) より、少なくとも牛乳、鶏卵および大豆においては粉末と対照の IgE 結合性が同等であるばかりではなく、それぞれの供試血中 IgE が同じアレルゲンに反応していることが強く示唆された。よって、これらの粉末のアレルゲン性は対照によく対応しているものと考えられる。いずれもそれぞれ 3 名の患児血清に対する検討しか行っていないので例外が出てくる可能性も否定できないが、Fig. 2 に示した相関性から類推すると少なくとも本検討に用いた患児の多くに対して同様な結果が得られることが期待される。しかし、鶏肉や小麦については今回は検討していないので、今後確認する必要もあろう。

貯蔵実験の結果から、5 種類の粉末の IgE 結合性は冷凍 (−20℃) では 600 日間、冷蔵 (5℃) では 18 カ月間は変わらないものと判定された。これに対して 20℃ 貯蔵では、牛乳を除くと粉末の IgE 結合性は大きく変動した。IgE 結合性の変動の原因については不明であるが、この変動にともない粉末のアレルゲン性も変化するものと推察される。よってこれらの結果から、粉末のアレルゲン性を保持するためには室温保存は避けるべきで、冷蔵または冷凍貯蔵することが必須であると判断した。本研究では、密封容器を一度開封した後の粉末の貯蔵性は検討しなかったが、乾燥粉末には吸湿性があるので、たとえ低温下に貯蔵しても水分活性の上昇によりカビや細菌類の増殖を招く可能性がある。また、油脂の酸化などアレルゲン性とは別の品質上の問題も加味しなければならない。したがってこれらの粉末は、乾燥剤を入れた上で水蒸気や酸素などのガス不透過性の密封可能な容器に必要最小単位毎に小分けして低温下に貯蔵し、開封後はできるだけ早く使い切るのが望ましいと思われる。

以上、述べたように、5 種類の食物から FPT 用に製造した粉末は、SDS-PAGE, ELISA および阻害 ELISA から実際に摂取する食物とほぼ同等のタンパク質を含むこと、同等のアレルゲン性を示すであろうと考えられ、FPT に適した抗原であると判断された。なお、これらの粉末は既に一部の医療機関において、ショ糖を加えたいちごピューレに混ぜて FPT が実施され好成績が得られていることから⁵⁾⁶⁾、本研究での *in vitro* の成績にとどまらず *in vivo* での有用性も証明されつつあるといえる。本粉末を用いた FPT の成績の客観的な比較を可能にするためには、ロット間のばらつきの抑制やコンタミネーション防止に向けた厳密な製造工程の管理が不可欠である。さらに、アレルゲン性が常時安定した粉末を製造するためには、原料の品種、産地、サイズなどを規定することも必要かもしれない。一方、粉末のアレルゲン性については統一的な評価方法 (たとえば、各食物中のアレルゲンに対するモノクローナル抗体を利用した ELISA や、患児のプール血清を利用した ELISA) を導入し、各医療機関においてその実施体制を整備することも重要である。

本研究の一部は、平成 8~10 年度財団法人旗影会の研究助成を受けて遂行されたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Bock, S.A., Sampson, H.A., Atkins, F.M., Zeiger, R. S., Lehrer, S., et al. : Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure : A manual. *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**, 986-997, 1988.
- 2) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
- 3) 海老澤元宏, 中村弘典 : 食物除去・負荷試験. 食品アレルギー対策ハンドブック (上野川修一, 近藤直実編). サイエンスフォーラム, 東京, pp. 143-150, 1996.
- 4) Ishikawa, M., Shimakura, K., Nagashima, Y. and Shiomi, K. : Isolation and properties of allergenic proteins in the oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.* **63**, 610-614, 1997.
- 5) Ebisawa, M., Nakamura, N., Akiyama, K., Shimakura, K., Kunou, M., et al. : Diagnosis of food allergy by using food provocation kits. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, S93, 1998.
- 6) 海老澤元宏, 赤澤 晃, 久能昌朗, 飯倉洋治 : 食物アレルギーの診断法の確立—乾燥食品粉末を用いた食物負荷試験—. *医療* **54**, 79-84, 2000.

IN VITRO EVALUATION OF ALLERGENICITY OF DRIED FOOD POWDERS
MANUFACTURED FOR FOOD PROVOCATION TEST

Kuniyoshi Shimakura¹⁾, Yuji Nagashima¹⁾, Kazuo Shiomi¹⁾, Masaaki Kunou²⁾,
Motohiro Ebisawa³⁾, Akira Akasawa⁴⁾ and Yoji Iikura⁵⁾

¹⁾*Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries*

²⁾*R. & D. Division, Q. P. Corporation*

³⁾*Division of Pediatrics, National Sagamihara Hospital*

⁴⁾*Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development*

⁵⁾*Department of Pediatrics, Showa University School of Medicine*

Food provocation test (FPT) is one of important diagnostic methods for food allergy, but no standard antigens for FPT have yet been developed. In this study, dried powders were manufactured from five kinds of foods (cow's milk, hen egg, chicken, soybean and wheat) by spray-drying or freeze-drying and examined *in vitro* for their usefulness as antigens for FPT. In SDS-PAGE, the migration pattern of the extract from each powder was the same as or closely similar to that of the extract from its material. When analyzed by ELISA, a good correlation ($r=0.853-0.978$) in the reactivity with sera from food-allergic patients was observed between the extracts from each powder and its material. Moreover, in cow's milk, hen egg and soybean, almost the same ELISA inhibition curves were drawn, regardless of whether the extracts from each powder and its material were used as immobilized antigens or inhibitors. These results demonstrated that each powder contains the same allergens as its material at almost the same levels, being useful as an antigen for FPT. Favorably, the powders were found to be stored without significant changes in IgE reactivity at -20°C or 5°C for more than 18 months, although their storage at room temperature was suggested to be avoided.
