

大正エビ生	0.87																	
ブラックタイガー生	0.88	0.99																
シハエビ生	0.93	0.98	0.98															
アカエビ (ムキエビ) 生	0.91	0.95	0.95	0.96														
ホッコクアカエビ生	0.95	0.96	0.96	0.98	0.98													
エビmix生	0.94	0.95	0.96	0.98	0.98	0.98												
ヨーロッパイチョウガニ加熱	0.96	0.85	0.84	0.90	0.87	0.92	0.90											
タラハガニ生	0.96	0.92	0.94	0.95	0.93	0.96	0.95	0.93										
カニ生	0.93	0.94	0.95	0.96	0.93	0.96	0.94	0.91	0.98									
シャコ加熱	0.96	0.88	0.87	0.92	0.93	0.96	0.93	0.94	0.94	0.91								
オキアミ加熱	0.98	0.87	0.86	0.93	0.91	0.95	0.93	0.94	0.95	0.91	0.98							
フジツボ加熱	0.97	0.85	0.83	0.90	0.90	0.93	0.90	0.93	0.93	0.90	0.99	0.99						
カメノテ加熱	0.96	0.84	0.84	0.90	0.90	0.93	0.91	0.94	0.94	0.91	0.97	0.98	0.98					
トロボミオシン	0.95	0.83	0.80	0.88	0.88	0.92	0.89	0.92	0.91	0.88	0.98	0.98	0.99	0.96				
	ホッコクアカエビ加熱	大正エビ生	ブラックタイガー生	シハエビ生	アカエビ (ムキエビ) 生	ホッコクアカエビ生	エビmix生	ヨーロッパイチョウガニ加熱	タラハガニ生	カニ生	シャコ加熱	オキアミ加熱	フジツボ加熱	カメノテ加熱				

図1、甲殻類種間でのIgE抗体価の相関関係

加熱ホッコクアカエビは非加熱の各エビ抗原に対してよりも加熱のカニや、シャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテの方が相関係数が高かった

水色：非加熱食品からの抽出、ピンク：相関係数 0.91-94、赤:0.95 以上

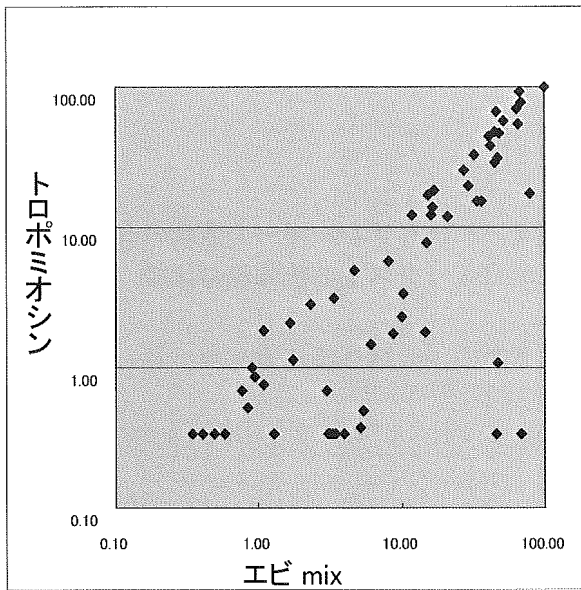


図2、 エビミックス (ホッコクアカエビ、ブラックタイガー、アカエビ(ムキエビ)) とリコンビナントトロポミオシン (ブラウンシュリンプ) に対する IgE 抗体価の相関関係

エビミックスとトロポミオシンに対する IgE 抗体価の相関係数は 0.89 と高値であった。エビミックス単独陽性のものが少数みられた

No.	エビ	カニ	No.	エビ	カニ	No.	エビ	カニ	No.	エビ	カニ
13	100.00		47	29.90	26.20	54	5.41	3.87	40	0.77	19.40
63	100.00	100.00	3	25.50	23.00	68	5.40	3.86	39	0.74	0.80
87	100	82.2	55	25.10	19.70	84	5.35	6.71	65	0.72	1.14
77	100.00	77.30	64	24.60	35.30	7	4.88		81	0.59	0.44
86	100.00	100.00	19	24.10	27.40	80	3.93	1.66	49	0.55	0.40
44	76.00	32.30	20	20.70	17.90	29	3.35	3.60	11	0.52	0.56
14	71.80		79	20.30	12.90	30	3.21	2.34	67	0.49	0.89
60	71.40	75.30	59	18.40	22.30	85	3.21	2.07	4	0.34	0.34
56	57.00	32.80	21	18.10		53	3.05	5.59	5	0.34	0.34
1	47.30	46.30	41	15.30	13.40	74	2.58	2.97	9	0.34	0.34
57	46.20	50.00	22	14.60	15.20	31	2.47	1.98	10	0.34	0.34
15	44.20	38.90	23	13.20	13.60	32	2.34	1.84	12	0.34	0.34
66	40.50	35.60	24	11.60	9.98	45	2.09	1.84	50	0.34	0.34
78	39.70	33.10	25	9.88	7.81	48	2.01	1.52	51	0.34	0.34
46	38.40	27.70	76	9.32	8.02	33	1.72	15.60	61	0.34	1.08
42	37.80	35.60	58	7.46	4.27	83	1.54	0.69	62	0.34	0.34
82	37.30	26.90	26	7.18		34	1.34	0.45	69	0.34	0.34
2	36.70	21.30	6	7.14	7.18	35	1.08	0.35	70	0.34	0.34
16	34.60		43	7.12	8.42	36	0.92		71	0.34	0.34
17	32.50	30.80	27	7.03	2.48	52	0.89	1.09	72	0.34	0.34
75	32.40	24.30	8	6.27	7.25	37	0.87		73	0.34	0.45
18	31.50	37.80	28	6.23	6.22	38	0.86	0.35			

図3 87例のエビ・カニ IgE 抗体価とエビ・カニ症状の有無

多くの症例がエビ・カニどちらかが陽性であった場合にもう片方は未摂取、あるいは両方未摂取であるものが多かった。両者の症状が陽性なのが11例、両者とも無症状で食べられるのが3例、エビ陽性でカニ陰性が4例、その逆が1例見られた。(橙色:症状あり、緑色:無症状、ピンク色:未摂取、無色:症状有無の記載なし)

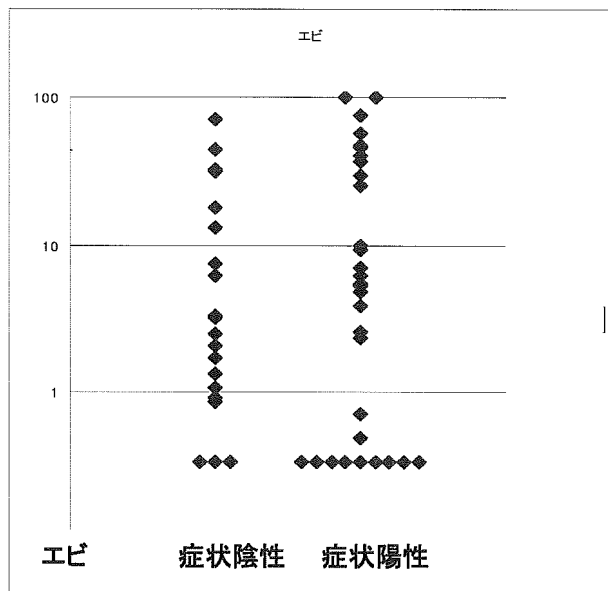


図4、 エビアレルギーの症状の有無で分けたエビミックス IgE 抗体価の比較

両者間の IgE 抗体価に有意差は見られなかった。

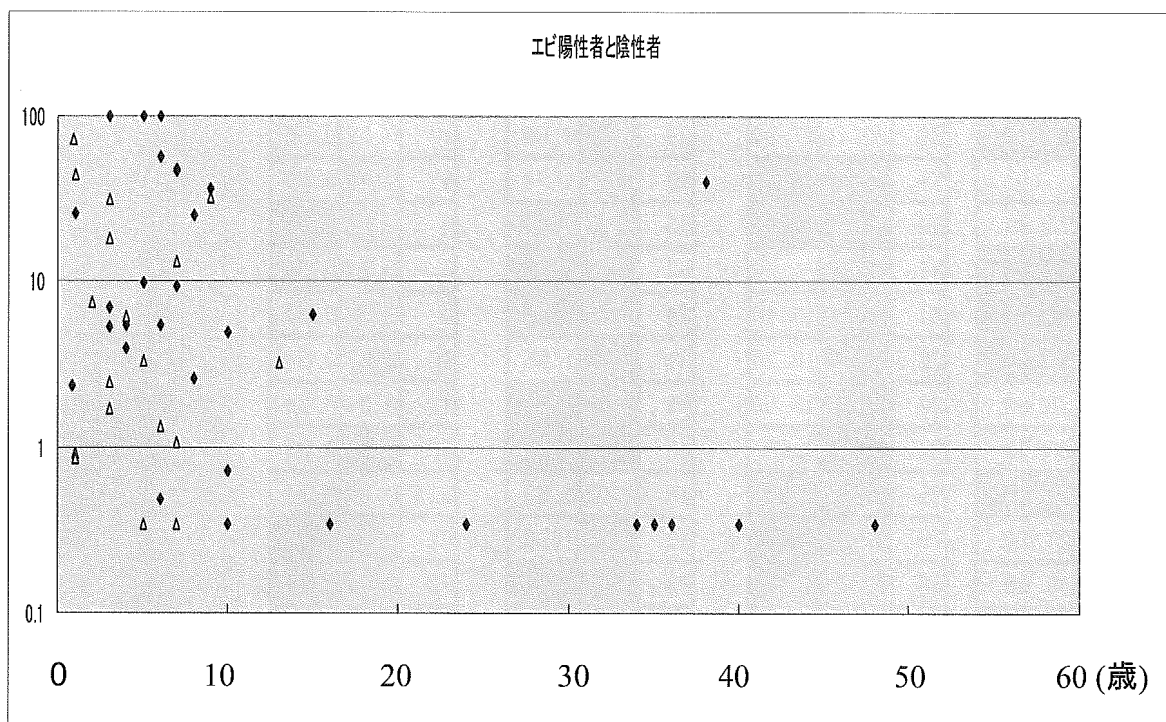


図5、 年齢別でみたエビアレルギー陽性者とエビアレルギー陰性者

高齢アレルギー陽性者の IgE 値は低いものが多かった

◆：症状陽性者、△：症状陰性者

表1. ピーナッツアレルギー患者

No	年齢	ピーナッツ IgE	症状	他の食物アレルギー
1	6	100	アナフィラキシー、喘息	牛乳、大豆(掻痒)
2	4	49.6	アナフィラキシー、蕁麻疹	牛乳
3*	3	45.6	アナフィラキシー	牛乳、クルミ(蕁麻疹)
4	66	10.3	アナフィラキシー	-
5	4	2.7	アナフィラキシー	牛乳、鶏卵
6	5	100	蕁麻疹	-
7	5	85.6	蕁麻疹、嘔吐、下痢	-
8	2	16.1	蕁麻疹	-
9	2	8.17	蕁麻疹	鶏卵、小麦、大豆(蕁麻疹)
10	2	1.00	蕁麻疹、腹痛	-
11	1	15.4	紅斑	鶏卵
12	3	2.01	紅斑、掻痒	-
13	8	1.08	紅斑	鶏卵、ゼラチン、大豆(湿疹)
14	2	100	2日後に湿疹	牛乳、鶏卵、エビ

表2. その他のナッツ類アレルギー患者

No	年齢	ナッツ	症状	クルミ IgE	ピーナッツ IgE	ピーナッツ アレルギー
1*	3	クルミ	蕁麻疹	0.35	45.6	+
2	5	クルミ	アナフィラキシー	5.52	0.8	-
3	2	クルミ	咳	0.65	2.2	-
4	3	クルミ	アナフィラキシー	3.36	0.5	-
5	6	クルミ	蕁麻疹	4.17	14.1	-
6	5	クルミ カシュー アーモンド	紅斑	4.21	3.4	-

*同一症例

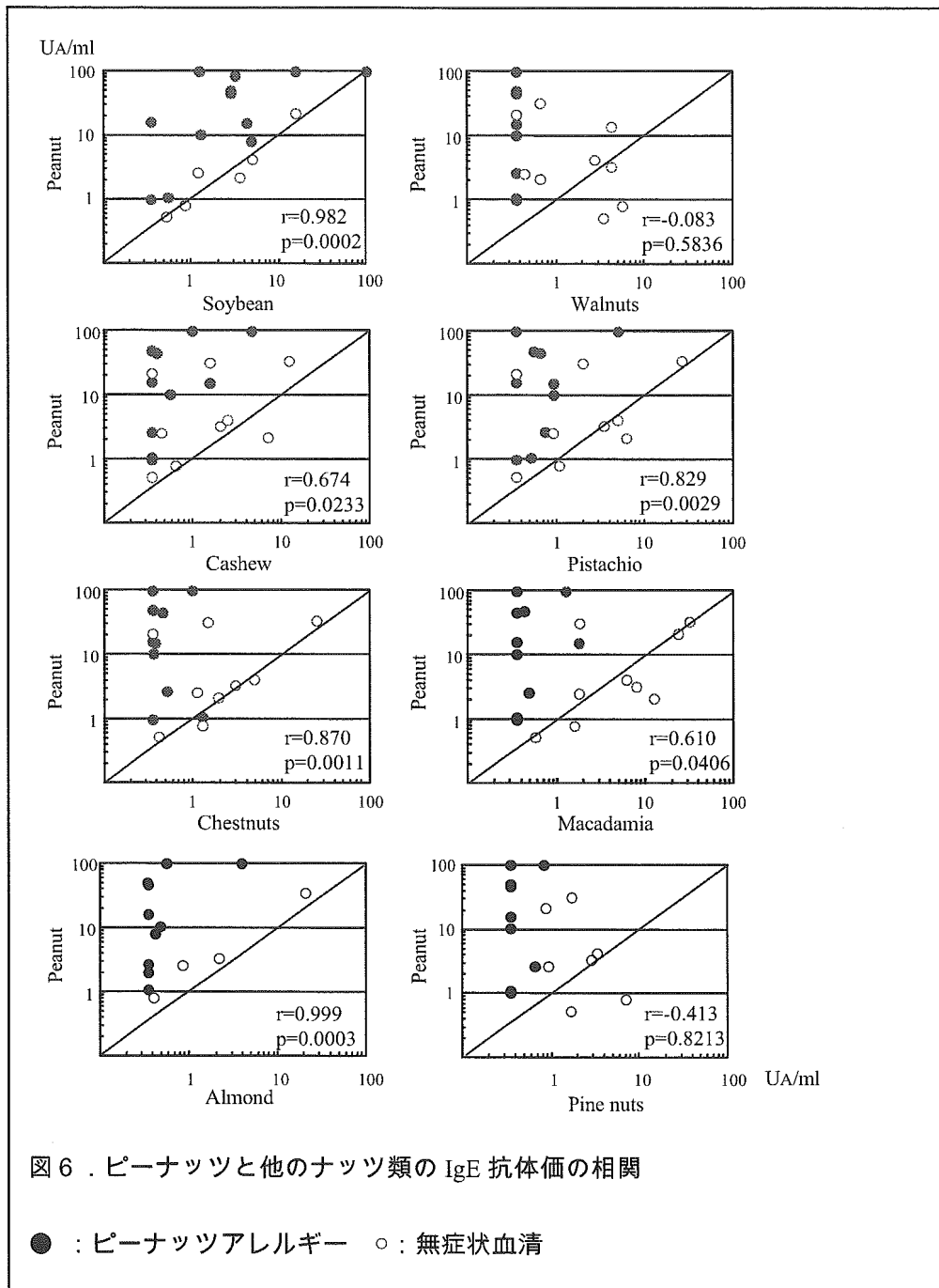


図6 . ピーナッツと他のナッツ類の IgE 抗体価の相関

● : ピーナッツアレルギー ○ : 無症状血清

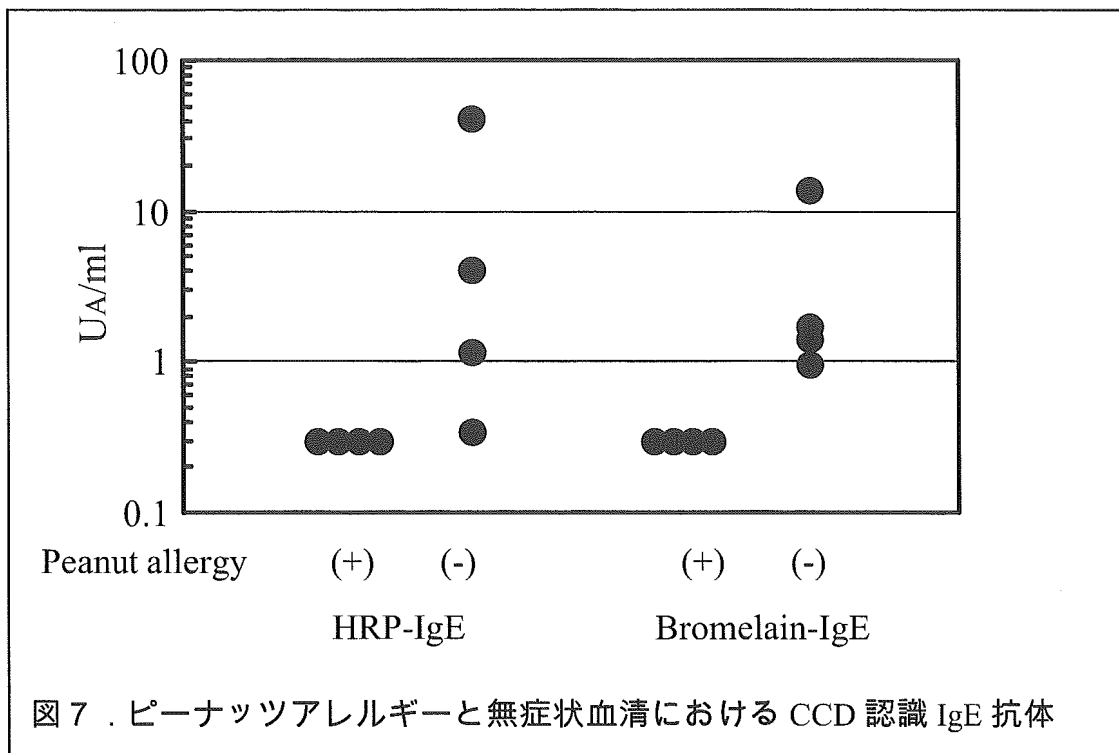


図7 . ピーナッツアレルギーと無症状血清における CCD 認識 IgE 抗体

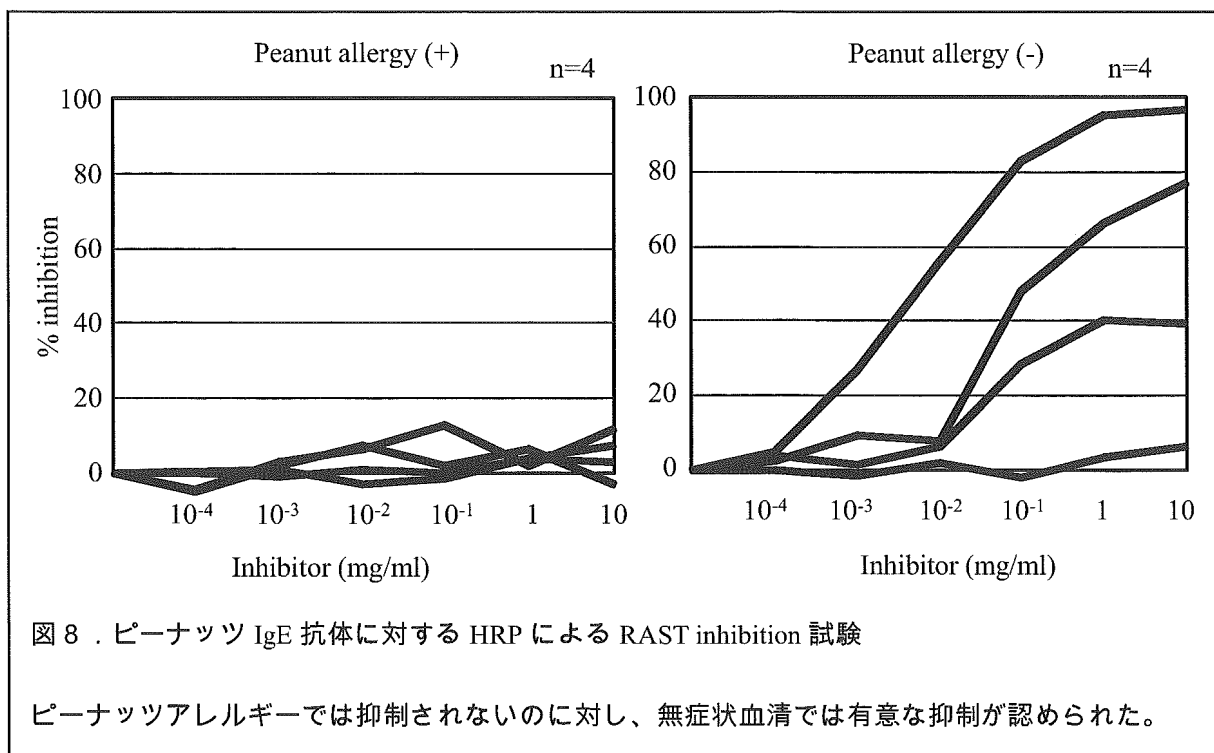


図8 . ピーナッツ IgE 抗体に対する HRP による RAST inhibition 試験

ピーナッツアレルギーでは抑制されないのに対し、無症状血清では有意な抑制が認められた。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究

豆類検知法の開発

分担研究者 穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究協力者

塩見一雄(東京海洋大学海洋食品科学科)
神谷久美子（日本ハム株式会社）
森山達哉（近畿大学農学部）
福永俊朗(森永製菓株式会社)
田口大夢（ハウス食品株式会社）
平尾宜司(ハウス食品株式会社)
清木興介(マルハ株式会社中央研究所)
中村幹彦、(株式会社アルバック)
渡邊敬浩(国立医薬品食品衛生研究所食品部)
米谷民雄(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

松本貴之（日本ハム株式会社）
森下直樹(日本ハム株式会社)
本庄勉（森永製菓株式会社）
山川宏人(株式会社日清製粉グループ本社)
正野仁慈（ハウス食品株式会社）
織田浩司（マルハ株式会社中央研究所）
鈴木友紀子(株式会社アルバック)
吉岡靖雄(国立医薬品食品衛生研究所食品部)
松田りえ子(国立医薬品食品衛生研究所食品部)

研究要旨:ダイズ ELISA 法の開発の検討に関しては、ダイズアレルゲンのひとつである GlymBd30K をターゲットとした抗体を調製し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。検量線の形状、バックグラウンドの値、トップの吸光値ともに良好であった。また確立した ELISA 系は特定原材料 5 品目をはじめとし、調査したほとんどの食品原材料に対して交差反応性は示さなかった。またダイズとして測定する必要がある品目である黒豆、枝豆、もやしなどは十分に検知した。ダイズ以外の豆類との反応性も少なく、調べた 10 種類の豆類中では、ささげ豆のみが検知した。モデル加工食品での回収率も良好で、未加熱食品のみならず、100℃加熱処理した食品からでも、良好な回収率を示した。クルミ ELISA 法の開発の検討に関しては、クルミの 2S アルブミンを高純度（95%以上）に精製し、その精製抗原をウサギに免疫して得られた抗血清を 2S アルブミンで固相化したカラムに通し、特異抗体を得られた。その抗体を固相化し、一部を酵素標識してサンドイッチの系を試作したところ、0.78ng/ml から 50ng/ml の範囲で測定可能であった。この系を用いて、他のナッツ類（ピーカン、ブラジルナッツ、マカダミア、ピーナッツ、アーモンド、カシュー、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ）の交差反応性を調べたところ、ピーカンナッツで 1/100 程度の反応性を示した。そこで、ピーカンナッツとの反応性を減少させるための処理を施し、1/10000 程度に低減させることが可能になった。ダイズ PCR 法の検討においては、検出限界およびダイズ特異性の検証によって 1 対のダイズ検知プライマー；Gym81/82 が選抜された。このプライマーは Glycine max repetitive sequence (Accession No. ;L06326) を検知するもので、検出限界は小麦粉中のダイズ粉の混入量として 10ppm（ダイズタンパク質として 3.5ppm）が確認された。また特異性の点においては、穀類 7 種、ナメ、種実類 8 種およびダイズ以外の豆類 10 種では PCR による増幅は認められず、ダイズ 9 品種でのみ増幅（増幅産物サイズ：118bp）が確認された。エビ PCR 検知法に関しては、甲殻類のエビとカニのうち、エビの確定試験法に必要とされる性能を有する PCR 検知法を開発した。今後は、さらに幅広い範囲での甲殻類や、甲殻類以外の動植物での感度と特異性確認、エビ由来の標的サイズのシークエンス確認、エキス原料等に使用される殻部分での検知確認、実際の食品を想定した既知濃度のエビを添加した擬似混入試料の分析により、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。また、水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルゲンの簡易測定法の開発の基礎的検討を行った。

A. 研究目的

食品中に含まれる特定原材料に準ずるアレルギー物質について、アレルギー表示の適正化の観点から、ELISA法、その他特定の蛋白質や核酸成分について定性、定量的に検証できる科学的検知法を開発する。本研究では、ダイズ及びクルミのELISA法の開発の検討と、ダイズ及びエビの遺伝子増幅法(PCR法)についての開発検討を行った。またアレルギーの新規簡易法の検討についても実施した。

B. 研究方法

ダイズ ELISA 検知法の開発の検討

ダイズアレルギーのひとつである GlymBd30K をターゲットとした抗体を用い、サンドイッチエライザの系を作製した。特定原材料 5 品目をはじめとした各種食品原材料を抽出し、非特異的反応性を含めた交差反応性を検討した。抽出率を加味して原材料に標準品を混入したモデル加工食品を作製し、回収率を検討した。

ダイズ PCR 検知法の開発の検討

ダイズ検出のためのターゲット遺伝子としてダイズの既知遺伝子配列9種類を選択し、その情報をもとに PCR プライマーをデザインした。DNA の抽出および PCR は通知検査法(「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」食発第 1106001号)に従って実施した。プライマー候補の中から、検出限界とダイズ特異性の検証によりダイズ検出プライマーを選抜した。最終的に確立されたプライマーを用いてダイズ由来原料を含む加工食品を対象に PCR を行い、この方法の実用性を確認した。

クルミ ELISA 検知法開発の検討

アセトンで脱脂したクルミから各種カラムクロマトグラフィーを繰り返し用いて 2S アルブミンを精製し、定法に従いウサギに免疫した。調製し得られたポリクローナル抗体を用いて ELISA の系を試作した。

エビ PCR 検知法の開発の検討

各種甲殻類の遺伝子配列を解析して、PCR 増幅予測ソフトウェア(Amplify 1.0)で特異性を予測した上で、「エビ、ザリガニ、イセエビ」検知用プライマーを設計した。また、設計したプライマーを用

いて PCR を行ない、特異性と感度を試験した。なお、全ての試験において、真核生物共通に存在する遺伝子配列を増幅する PCR で増幅産物が得られることを確認した DNA 試料を使用した。

PCR 反応液組成は、1xPCR 緩衝液、0.20mM dNTP、1.5mM 塩化マグネシウム、0.3 μ M 5' 及び 3' プライマー、及び 0.625units TaqDNA ポリメラーゼを含む液に、20ng/ μ L に調製した DNA 試料液 2.5 μ L(DNA として 50ng)を加え、全量を 25 μ L とした。PCR 反応条件は、95°C に 10 分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5 1 分間、56°C 1 分間、72°C 1 分間を 1 サイクルとして 45 サイクルの PCR 増幅を行い、終了反応として 72°C で 7 分間保った。

水晶発振子を用いたバイオセンサー法の検討

卵白タンパク質のオボアルブミンモノクローナル抗体を用いて水晶発振子を用いた方法により、オボアルブミンの半定量的な検討を行った。水晶発振子を用いた方法原理は一对の電極間に水晶板が挟まれてなる水晶振動子の一方または双方の電極に、食品成分に特異的に結合する物質が固定され、前記一对の電極が、該電極間に電圧を印加するための回路および周波数測定装置に電氣的に接続されていることを特徴とする検出装置である。食品サンプル中に検出対象のタンパク質が含有されていれば、その含有量に比例した量のタンパク質が水晶振動子1上の特異的結合物質に結合され、その結果、タンパク質の結合量が検出限界以上の量であれば、その結合量が多いほど水晶振動子1の周波数が小さくなる。すなわち、該水晶振動子1の食品サンプル接触前の周波数と当該タンパク質の接触後の周波数から、周波数の減少量を算出することで、当該タンパク質の結合量が算出されるので、その結合量から食品サンプル中の当該タンパク質含有量を判定量的に算出することができる。

C. 研究結果

ダイズ ELISA 検知法の開発の検討

検量線の形状、バックグラウンドの値、トップの吸光値ともに良好であった(図1)。感度は、0.78125ng/mL であった。特定原材料5品目をはじめとし、調査したほとんどの食品原材料に対し

て反応はしなかった。また、ダイズとして測定すべき品目である黒豆、枝豆、もやしなども十分に反応した。

ダイズ以外の豆類との反応性も少なく、調べた10種類の豆類中では、ささげ豆のみが反応した。モデル加工食品での回収率も良好で、未加熱食品のみならず、100℃加熱処理した食品からでも、ほぼ100%の回収率を示した。

クルミ ELISA 検知法開発の検討

クルミの2Sアルブミンを高純度(95%以上)に精製できた。ウサギに免疫して得られた抗血清を2Sアルブミンを固相化したカラムに通し、特異抗体を得た。その抗体の一部をプレートに固相化し、一部を酵素標識してサンドウィッチの系を作成したところ、0.78 ng/ml から 50 ng/ml の範囲で測定可能な検量線を作成できた(図2)。

この系を用いて、他のナッツ類(ピーカン、ブラジルナッツ、マカダミア、ピーナッツ、アーモンド、カシュー、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ)の反応性を調べたところ、ピーカンナッツで1/100程度の反応性を示した。そこで、ピーカンナッツとの反応性を減少させるための処理を施し、1/10000程度に低減させることに成功した。

豆類(ダイズ、小豆、空豆、黒豆、黒ごま、白ごま、ぎんなん、カカオ)の反応性を調べたところ、どの豆も測定感度以下だった。

穀類(玄米、ヒエ、アワ、キビ、大麦、小麦、ライ麦、そば)も、すべて測定感度以下だった。

エビ PCR 検知法開発の検討

設計したプライマーで、代表的な「エビ(4種)、ザリガニ(2種)、イセエビ(1種)」から標的とした約200bpのPCR産物が得られた(図3-1)。一方、カニ(3種)、シャコ、オキアミ、アミからは、標的サイズのPCR産物は得られなかった。検知限界は、エビ等のDNA量として2.5pg(鋳型DNA量50ngで検査した場合に50ppm(w/w)相当量(可食部の蛋白質含量から計算されるエビ蛋白質濃度としては10・g/g相当量)であった(図3-2)。なお、PCR増幅予測ソフトウェアでの解析結果から、「エビ、ザリガニ、イセエビ」以外の甲殻類からは、標的サイズの増幅産物は得られないと予測されたが、分類学上近縁の昆虫類からは標的サイズの増幅

産物が得られることが予測された。

ダイズ PCR 検知法開発の検討

検出限界およびダイズ特異性の検証によって1対のダイズ検知プライマー;Gym81/82が選抜された。このプライマーはGlycine max repetitive sequence(Accession No.;L06326)を検知するもので、検出限界は小麦粉中のダイズ粉の混入量として10ppm(ダイズタンパク質として3.5ppm)が確認された(図4-1)。また特異性の点においては、穀類7種(コムギ、ライムギ、オオムギ、オーツムギ、トモロコシ、コメ、ソバ)、ナタネ、種実類8種(アーモンド、カシュー、マカダミア、ピスタチオ、ヘーゼル、ブラジル、ピーカン、クルミ)およびダイズ以外の豆類10種(虎豆、手亡、あずき、ささげ、そら豆、えんどう、レンズ豆、ルーピン、ガルバンゾー、落花生)ではPCRによる増幅は認められず、ダイズ9品種(とよこまち、とよむすめ、りゅほう、たちはがな、えんれい、ふくゆたか、むらゆたか、Vinton、Navy)でのみ増幅(増幅産物サイズ:118bp)が確認された(図4-2)。Gym81/82を用いたPCR法により、ダイズ由来原料を含む市販加工食品、調味料および食品素材を分析した結果、醤油、ダイズタンパクを除く食品でダイズの混入が認められた(図4-3)。

水晶発振子を用いたバイオセンサー法の検討

ビオチン化されたオボアルブミン抗体を水晶板に固定化し、オボアルブミンを添加したところ、オボアルブミンの濃度依存的に周波数の減少量が観測された(図5)。

D. 考察

ダイズ ELISA 検知法開発の検討

モデル加工食品の種類によっては、回収率が良くないものがあったため、更なる改良が必要と考えられる。

クルミ ELISA 検知法開発の検討

ナッツ類でピーカンナッツとの反応性がみられたが、両者とも同じ科の植物なので、2Sアルブミンの配列が存在している可能性が示唆された。

ダイズ PCR 検知法開発の検討

供試した市販加工食品には焙煎、焼成およびレトルトなど加工度の高い食品も含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のダイズ検

知法として適用可能であることが示唆された。ダイズタンパクには様々な加工形態があるため、今後更に例数を増やして検証を行う必要がある。

エビ PCR 検知法の開発の検討

特定原材料に順ずる 20 品目に含まれる甲殻類のエビとカニのうち、エビの確定試験法に必要とされる性能を有する PCR 検知法を開発した。今後は、さらに幅広い範囲での甲殻類や、甲殻類以外の動植物での感度と特異性確認、エビ由来の標的サイズのシーケンス確認、エキス原料等に使用される殻部分での検知確認、実際の食品を想定した既知濃度のエビを添加した擬似混入試料の分析により、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。

水晶発振子を用いたバイオセンサー法の検討

確立した方法をさらに検討を加え、食品抽出液に応用することを今後検討する。この方法が実現可能になれば、食品中の食物アレルギーを、簡便な操作により低コストで精度良く検出することができ、水晶板チャンネルを複数設置することが可能になれば、同一抽出液から多項目のアレルギーを同時に測定することが可能になると考えられる。

E. 結論

ダイズ ELISA 法の開発の検討に関しては、ダイズアレルギーのひとつである GlymBd30K をターゲットとした抗体を調製し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。

クルミ ELISA 法の開発の検討に関しては、ポリクローナル抗体を用いた 0.78 ng/ml から 50 ng/ml の範囲で測定可能な ELISA の系を開発した。その系はナッツ類ではピーカンナッツと弱い反応性があったが吸収操作により約 0.1% 程度に交差反応性を減少することができた。豆類や穀類との反応性はみられなかった。

ダイズ PCR 法の開発の検討に関しては、ダイズの特異的検出が可能で、かつ検出感度の高いプライマーを構築し、この方法が幅広い食品に適用できることを確認した。

特定原材料に順ずる 20 品目に含まれる甲殻類のエビとカニのうち、エビの確定試験法に必要とされる性能を有する PCR 検知法を開発した。今後は、さらに幅広い範囲での甲殻類や、甲殻類以外

の動植物での感度と特異性確認、エビ由来の標的サイズのシーケンス確認、エキス原料等に使用される殻部分での検知確認、実際の食品を想定した既知濃度のエビを添加した擬似混入試料の分析により、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。

水晶発振子を用いたバイオセンサー法による食物アレルギーの簡易測定法の開発の基礎的検討を行い、オボアルブミン標準品の半定量が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Takahiro Watanabe and Hiroshi Akiyama *et al.*, A Specific Qualitative Detection Method for Peanut (*Arachis hypogaea*) in Foods using Polymerase Chain Reaction, *J Food Biochemistry*, in press.
2. Hiroshi Akiyama, Kozue Sakata, Yasuo Yoshioka, Yoshifumi Murata, Yoshihiro Ishihara, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada and Tamio Maitani PROFILE ANALYSIS AND ALLERGENICITY OF WHEAT PROTEIN HYDROLYSATES *International Archives Allergy Immunology*, in press.
3. Teshima, R., Okunuki, H., Sato, Y., Akiyama, H., Maitani, T., Sawada J., Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W^v mice. *Allergology International*, 55, 43-48 (2006)
4. Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Takahiro Watanabe, Megumi H. Nagaoka, Yasuo Yoshioka, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Kiyoshi Yamada, Mamoru Totsuka, Reiko Teshima, Yukihiko Goda, Jun-ichi Sawada, Tamio Maitani Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergy in murine model. *FEBS Lett.*, 579, 4485-4491 (2005).
5. Akiyama H, Amano H, Bienenstock J. Rat tracheal epithelial responses to water avoidance stress. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 318-324 (2005)

6. 橋本裕一郎、古林万木夫、宮澤いづみ、高畑能久、田辺創一、谷内昇一朗 “特異的抗体を用いた醤油原料(ダイズ、小麦)の分解機構の検討” 醤油の研究と技術 Vol.31 No.4 217-222 2005
7. 橋本裕一郎、吉田多恵子、古林万木夫、宮澤いづみ、高畑能久、森松文毅、田辺創一、谷内昇一朗 “醤油醸造における小麦アレルゲンおよびダイズアレルゲンの分解・除去機構の解明” 醤油の研究と技術 Vol.31 No.6 347-351 2005
8. 森下直樹、松本貴之、高畑能久、森松文毅、上條茂徳、秋山恵利、有川奈津実、飯田知美、多勢加奈子、浜路麻衣、平岡里海、白柳利江子、豊田正武 “調理加工モデル食品を用いたアレルゲン検査用イムノクロマトキットの評価” 食品衛生学雑誌 in press
9. Yumiko Watanabe, Kenichi Aburatani, Tasuku Mizumura, Masatoshi Sakai, Shiroo Muraoka, Shinichi Mamegoshi, Tsutomu Honjoh, Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent; *Journal of Immunological Methods* 300 (2005) 115-123
10. Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, and Kawada T. Dietary Fat and an Exogenous Emulsifier Increase the Gastrointestinal Absorption of a Major Soybean Allergen, Gly m Bd 30K, in Mice. *J Nutr.* 135, 1738-1744 (2005).
11. Moriyama T, Machidori M, Ozasa S, Maebuchi M, Urade R, Takahashi K, Ogawa T, and Maruyama N. A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Soybean β -Conglycinin, a Major Soybean Storage Protein, in Soybean and Soybean Food Products. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51, 34-39 (2005).
12. Iijima S, Moriyama T, Ogawa T. A case of anaphylaxis due to soy milk; Trial of detection of IgE-binding soybean proteins. *J Environmental Dermatology.* 12, 184-191 (2005).
13. Kitta K, Ohnishi-Kameyama M, Moriyama T, Ogawa T, and Kawamoto S. Detection of low molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* (in press)
- 学会発表
- 第 50 回日本農芸化学会 「モノクローナル抗体を用いたグリアジン検出ウエスタンブロットキットの開発」 森下直樹、宮澤いづみ、奥村朋之、松本貴之、高畑能久、森松文毅 (2006.3)
 - 第 10 回免疫化学測定法研究会学術シンポジウム 「新規複合抗原認識抗体を用いた加工食品中のアレルゲンの測定」 森下直樹 (2005.11)
 - 第 90 回日本食品衛生学会 「モノクローナル抗体を用いたアレルゲン検査用ウエスタンブロットキットの開発」 森下直樹、宮澤いづみ、奥村朋之、松本貴之、高畑能久、森松文毅、桑原慶考、石田由加、入江勉 (2005.10)
 - 第 55 回日本アレルギー学会 「店頭販売品に含まれるアレルギー物質含有調査」結果 神奈川芳行、伊藤節子、太田裕、本庄勉、森松文毅、高畑能久、今村知明 (2005.10)
 - 第 42 回日本小児アレルギー学会 「店頭販売品に含まれるアレルギー物質含有調査」結果(第 2 報) 神奈川芳行、伊藤節子、明石真美、太田裕、本庄勉、森松文毅、高畑能久、今村知明 (2005.11)
 - 第 89 回日本食品衛生学会学術講演会 題目—高回収率を可能とした特定原材料測定キット(ELISA 法)の応用例 (榎森永生科学研究所 ○油谷賢一・渡邊由美子・渡邊恵理子・本庄勉・橋爪秀一 国立医薬品食品衛生研究所 渡邊敬浩・穂山浩・松田りえ子・米谷民雄(財) 日本食品分析センター 佐藤秀隆
 - 免疫化学測定法研究会第10回(2005年)学術シンポジウム題目—加工食品における前処理法と特定原材料の測定、株式会社森永生科学研究所 油谷賢一

8. ERIKO WATANABE, YUMIKO WATANABE, KENICHI ABURATANI, MASAHIRO SHOJI, TSUTOMU HONJOH, SHUICHI HASHIZUME, HEMA SHAH, 2005.9.11-15, 119th AOAC Annual Meeting & Exposition. Novel ELISA System for detecting Milk protein (B-Lactoglobulin).
9. YUMIKO WATANABE, ERIKO WATANABE, KENICHI ABURATANI, MASAHIRO SHOJI, TSUTOMU HONJOH, SHUICHI HASHIZUME, HEMA SHAH, 2005.9.11-15, 119th AOAC Annual Meeting & Exposition Novel ELISA System for Detecting Wheat Protein,
10. Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Maitani T, Gamo R, Kihira Y, Honjoh T, Takahata Y, Sato Y. Preparation and specification of the calibration standards for the test kits for 5 allergenic foods. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.
11. Akiyama H, Matsuda R, Maitani T. Issues and challenges of Japan NIHS validation protocols. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.
12. RIEKO MATSUDA, YASUO YOSHIOKA, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, Preparation and Specification of the Calibration Standards for the Test Kits for 5 Allergenic Foods. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.
13. TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, HIROYUKI KIKUCHI, TAMIO MAITANI A SPECIFIC QUALITATIVE DETECTION METHOD FOR PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA*) IN FOODS USING POLYMERASE CHAIN REACTION. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA), September 11-15, 2005.

H. 知的財産権の登録

1. 特願2006-004982号(発明の名称 エビ検出用プライマーセット)
2. 特願2006-83585号(発明の名称 キウイフルーツ検出用プライマーセット)

図1. ダイズ検知 ELISA キット 検量線

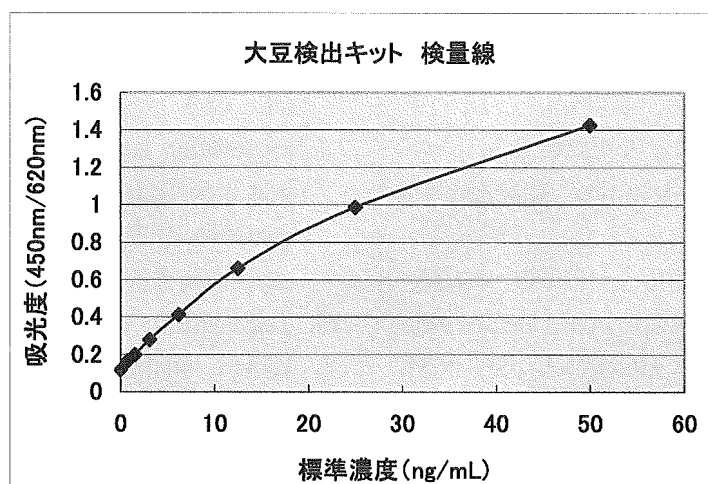


図2. クルミ検知 ELISA キット 検量線

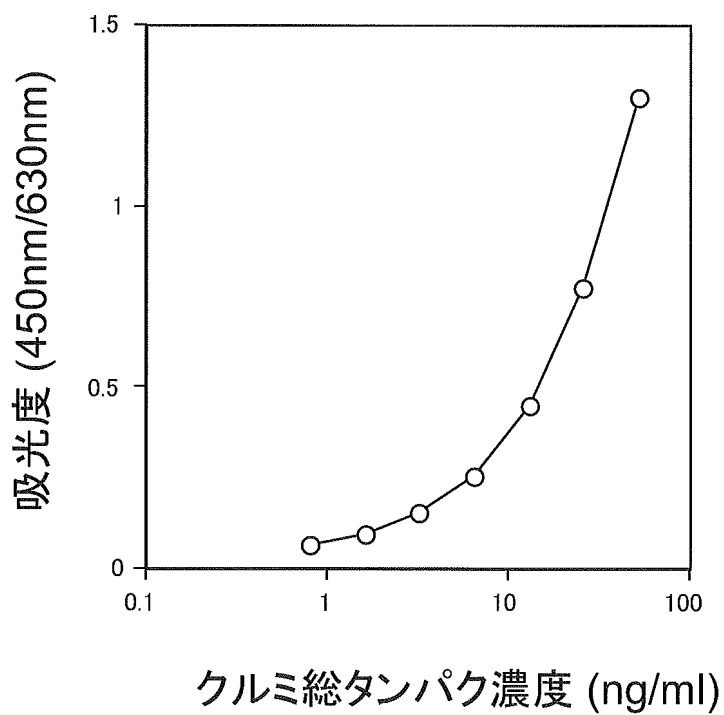


図 3. エビ検知 PCR 法

図 3-1 特異性の検討

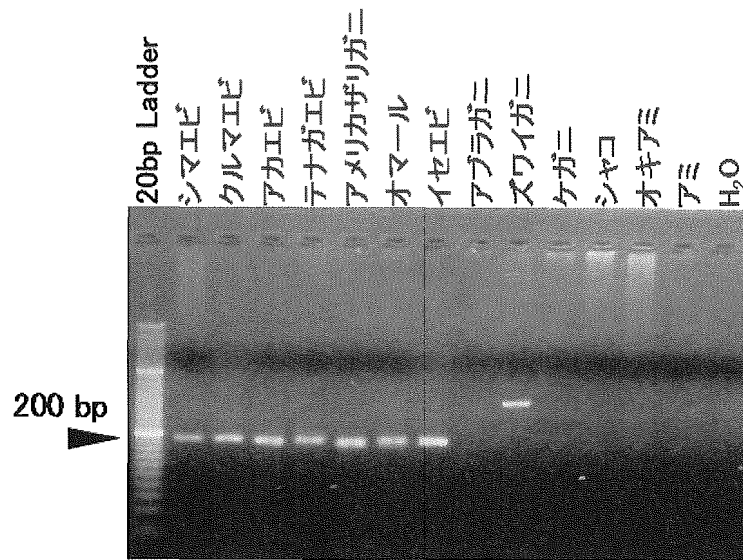


図 3-2 検知感度の検討

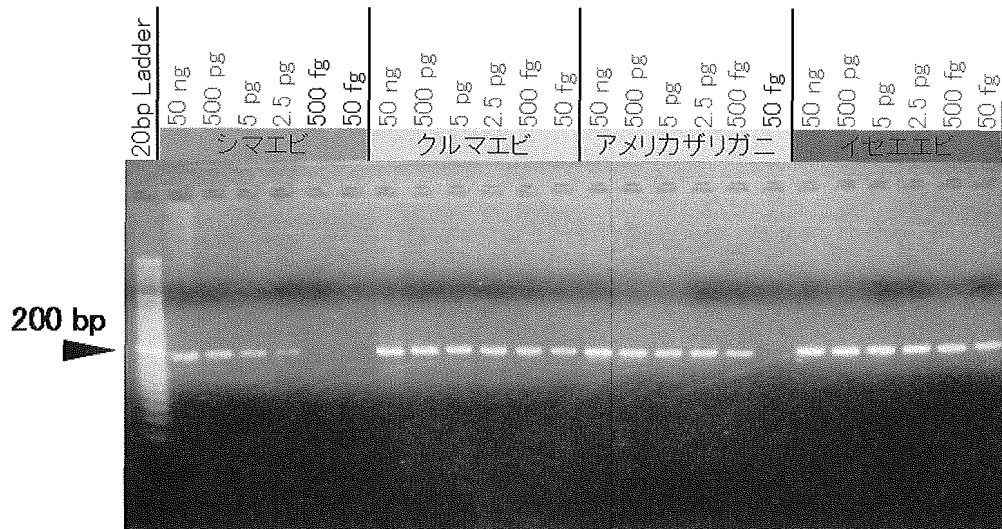


図 4. ダイズ検知 PCR 法

図 4-1 検知感度の検討

レーンNo.	ダイズ粉 /コムギ粉	Gym81/82 による増幅
2	10ppm	+
3	50ppm	+
4	100ppm	+
5	1000ppm	+
6	100%	+
N	No template	-

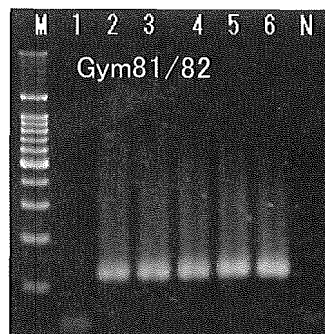
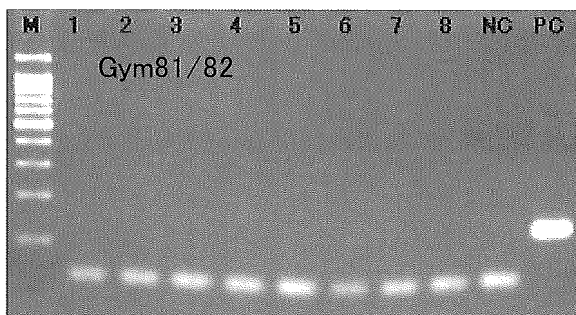


図 4-2 特異性の検討

Gym		Gym		Gym		Gym	
穀類	81/82	種実類*	81/82	他豆類	81/82	ダイズ	81/82
コムギ	—	アーモンド	—	虎豆	—	とよこまち	+
ライムギ	—	カシュー	—	手亡	—	とよむすめ	+
オオムギ	—	マカダミア	—	あずき	—	りゅうほう	+
オーツムギ	—	ピスタチオ	—	ささげ	—	たちながは	+
トウモロコシ	—	ヘーゼル	—	そらまめ	—	えんれい	+
コメ	—	ブラジル	—	えんどう	—	ふくゆたか	+
ソバ	—	ピーカン	—	レンズマメ	—	むらゆたか	+
		クルミ	—	ルーピン	—	Vinton	+
油脂類				ガルバンゾー	—	Navy	+
ナタネ	—			落花生	—		

*森永生化学研究所より入手



特異性の確認(種実類)

レーン#1:アーモンド, #2:カシュー, #3:マカダミア,
#4:ピスタチオ, #5:ヘーゼル, #6:ブラジル,
#7:ピーカン, #8:クルミ,
NC:DNAなし, PC:ダイズ

← 118b
← プライマーダイマー

図 4-3 加工食品検体への適用

レーンNo.	サンプル	CP03-5'/3'*	Gym 81/82
1	しょうゆ	±	—
2	みそ	+	+
3	ダイズレシチン	+	+
4	ダイズ食物繊維	+	+
5	ダイズタンパク	—	—
6	ちくわ	+	+
7	ロースハム	+	+
8	食パン	+	+
9	ビスケット	+	+
10	ポテトチップ	+	+
11	レトルト粥	+	+
12	レトルトソース	+	+
NC	No template	—	—
PC	ダイズ	+	+

*植物DNA検知プライマー

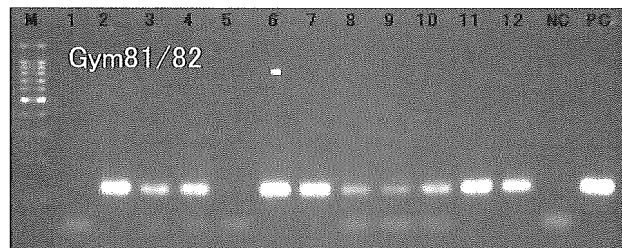
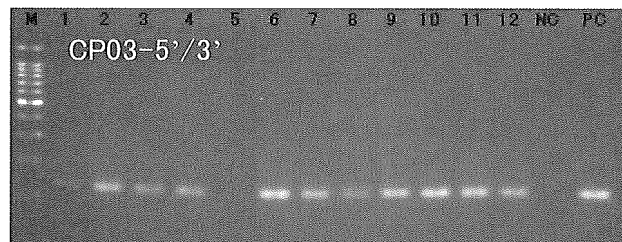
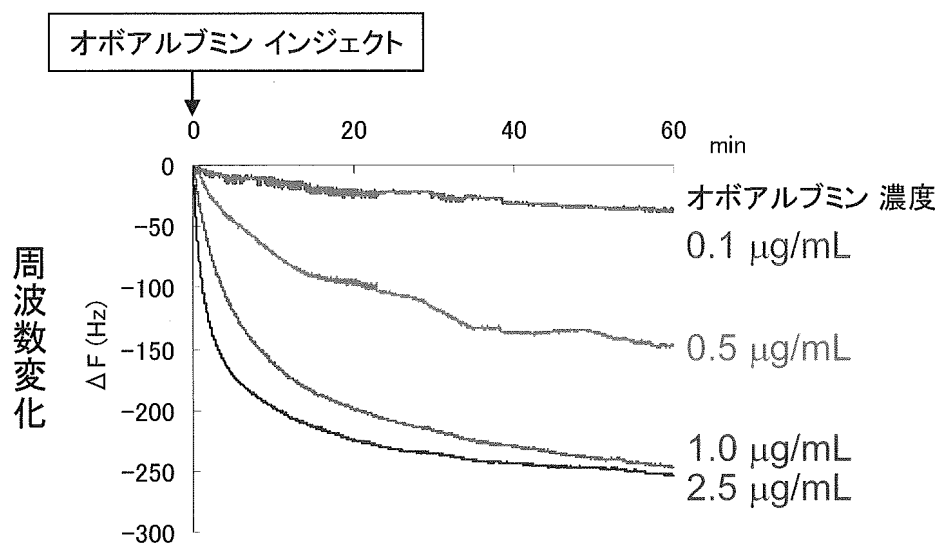


図5 水晶発振子を用いたバイオセンサー法の検討



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究
分担研究報告書

魚貝類アレルゲンの特定、抗原交差性・一次構造の解明および検知キットの開発

分担研究者	塩見一雄	東京海洋大学海洋食品科学科
研究協力者	佐伯宏樹	北海道大学大学院水産科学研究院
	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部
	大橋英治	日本水産株式会社食品分析センター
	阿部晃久	同上
	梅田 衛	日水製薬株式会社診断薬研究部
	岡 道弘	同上
	織田浩司	株式会社マルハグループ本社中央研究所
	清木興介	同上
	石原好博	株式会社マルハグループ本社環境・品質保証グループ

研究要旨

甲殻類のアレルゲン：ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、カメノテおよびミネフジツボの筋肉から調製した加熱抽出液をイムノブロッティングならびに阻害イムノブロッティングに供し、主要アレルゲンは共通して抗原交差性を示すトロポミオシンであることを確認した。ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミおよびミネフジツボのトロポミオシンについては、cDNA クローニングにより全アミノ酸配列を決定した。ミネフジツボトロポミオシンのアミノ酸配列は甲殻類よりも軟体動物のアワビ類に近かったが、その他 3 種甲殻類のトロポミオシンは既知の甲殻類トロポミオシンと 90%以上の配列相同性を示した。貝類のアレルゲン：アカガイ、アサリ、ウバガイ、トリガイ、マガキ、エゾバイ、クロアワビおよびサザエの主要アレルゲンも、共通して抗原交差性を示すトロポミオシンであることを確認するとともに、アカガイ、アサリ、クロアワビおよびサザエのトロポミオシンについては全アミノ酸配列を決定した。アカガイとアサリのトロポミオシンはお互いに 77%の配列相同性を示し、既知の軟体動物トロポミオシンとの相同性も 70-80%であった。クロアワビとサザエのトロポミオシンの配列相同性は 97%と高く、他のアワビ類トロポミオシンとも 95%以上の相同性を有していた。魚卵のアレルゲン：シロザケ成熟魚卵の卵黄タンパク質である β' -コンポーネント (β) とリポビテリン (Lv) について、食品中に含まれるイクラ検出方法に関わる対象タンパク質としての妥当性を検討した。ウサギ抗血清を用いた実験によると、 β は魚種間で強い交差性を有した。またイクラ β に強く反応する患者血清は、イトウ、ニジマス の β' -コンポーネントに相当する成分と強く反応した。一方、ウサギ抗 Lv 血清 (a-Lv) はイトウやニジマスなどサケ科魚類の Lv 重鎖または軽鎖と反応したが、その反応性は β の場合よりも弱かった。また、スケトウダラ卵のタンパク質は a-Lv と反応しなかった。甲殻類検知キット：2 研究グループでそれぞれ別個に、ブラックタイガートロポミオシンを免疫原としてポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製し、抗体は甲殻類のトロポミオシンに高い反応性と特異性を示すことを確認した。サンドイッチ ELISA 法による検出系を構築し、試作モデル加工食品に適用した結果、本測定系での回収率および希釈直線性は概ね良好であったが、一部食品で回収率などに問題があり原因を究明中である。

A.研究目的

アレルギーを起こすおそれがある魚貝類の適切な検知法および表示方法を検討するためには、アレルゲンに関する分子レベルの情報が必要である。本研究では、各種甲殻類、貝類および魚卵のアレルゲンを特定するとともに、抗原交差性ならびに一次構造を明らかにすることを目的と

した。また、甲殻類についてはサンドイッチ ELISA 法に基づく検知キットの開発も目指した。

B.研究方法

1) 甲殻類のアレルゲン

試料：軟甲亜綱十脚目長尾亜目のウシエビ(ブ

ラックタイガー)とホッコクアカエビ(甘エビ)、短尾亜目のケガニ、オキアミ目のナンキョクオキアミ、蔓脚亜綱有柄目のカメノテ、無柄目のミネフジツボの筋肉(ケガニについては脚肉と胴肉の2種類)を試料として用いた。

加熱抽出液の調製:各試料に4倍量の0.6 M KCl-0.01 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を加えてホモジナイズした。ホモジネイトを加熱(100°C、10分間)後、冷却遠心分離(18,000 g、4°C、20分間)により得られた上清を加熱抽出液とした。

SDS-PAGE: SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (Amersham Biosciences) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (Amersham Biosciences) を使用した。泳動に先立ち、各加熱抽出液およびアメリカンロブスターの精製トロポミオシン(fast タイプ)を5% ジチオスレイトール-2.5% SDS 溶液とし、沸騰水浴中で10分間加熱変性した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision plus protein standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

イムノブロッティング: SDS-PAGE で泳動させたタンパク質は PhastSystem の取扱説明書に従いニトロセルロース膜に転写した。転写後の膜は患者血清(1:500)と37°C、1時間、次いでペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体(1:5000; Kirkegaard & Perry Laboratories)と37°C、1時間反応させた。検出には ECL plus western blotting detection system (Amersham Biosciences) を用いた。阻害イムノブロッティングの場合は、アメリカンロブスターの精製トロポミオシン(fast タイプ)溶液(20 µg/ml)と患者血清(1:250)を等量ずつ混合し、37°C、1時間プレインキュベートしたものを一次抗体として用い、その他の操作は上述のイムノブロッティングと同様に行った。

cDNA クローニング: ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミおよびミネフジツボの筋肉(ケガニについては脚肉と胴肉の2種類)から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。ナンキョクオキアミ以外については、total RNA から 1st strand cDNA を合成し、3'RACE に供した。PCR 反応には、既知の甲殻類トロポミオシンをコードする cDNA の保存性の高い塩基配列領域に基づいて設計した特異プライマーを用いた。次に、3'RACE により明らかになった部分塩基配列をもとに 5'RACE を行い、残りの塩基配列を決定した。ナンキョクオキアミの場合、total RNA から mRNA を精製し、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。cDNA ライブラリーをテンプレートして 3'RACE および 5'RACE を行

い、トロポミオシンをコードする cDNA の塩基配列を解析した。

2) 貝類のアレルゲン

試料: 試料としてアカガイの足筋、アサリの可食部、ウバガイ(ホッキガイ)の足筋、トリガイの足筋、マガキの貝柱、エゾバイの足筋、クロアワビの貝殻筋およびサザエの足筋を用いた。

加熱抽出液の調製、SDS-PAGE、イムノブロッティング: 甲殻類の場合とすべて同じ方法で行った。

cDNA クローニング: アカガイの足筋、アサリの可食部、ウバガイの足筋、トリガイの足筋、マガキの貝柱、エゾバイの足筋、クロアワビの貝殻筋およびサザエの足筋から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。total RNA から合成した 1st strand cDNA をテンプレートとし、既知の甲殻類および軟体動物のトロポミオシンをコードする cDNA の保存性の高い塩基配列領域に基づいて設計した特異プライマーを用いて 3'RACE を行なった。3'RACE により明らかになった部分塩基配列をもとに 5'RACE を行い、残りの塩基配列を決定した。

3) 魚卵のアレルゲン

魚卵: 生のシロサケ、イトウ、ニジマス、スケトウダラ、アサバガレイ、ババカレイ、ホッケ、カペリンから卵黄形成途上の卵を採取し、冷却した 0.16 M NaCl で洗浄後、直ちに-60°Cに貯蔵した。また、シシャモは、卵を取り出さずに丸ごと-60°Cに貯蔵し、使用直前に解凍して卵を採取した。さらに同じ原料から製造した市販乾燥品からも卵を採取した。本報告書では、解凍したシシャモから採取した卵をシシャモ(生)、乾燥シシャモから採取した卵をシシャモ(乾)と表記した。

患者血清: イクラ CAP-RAST のスコア 4 以上またはイクラによってアレルギー症状を呈した 16 名の患者血清を実験に供試した。患者の内訳は、イクラの摂取によってさまざまなアレルギー症状を呈した 7 名(1-11 歳、男 1、女 6)、魚卵以外でアレルギー症状を呈した 7 名(1-6 歳、男 5、女 2)、魚卵以外でアレルギー症状を呈しかつイクラの食経験が無い 2 名(2-5 歳、男、ただしこのうち 1 名からは時間を置いて 2 度採血を行った)である。また、陰性コントロールとして、イクラを摂取しても過敏症状を起こさない 4 名(22-42 歳、男)の血清を用いた。各血清は、-60°C 以下で 2 ヶ月から 1 年間貯蔵した後、解凍して直ちに等容量の 0.2% アジ化ナトリウムを加えて 4°C で保管し、実験に供した。

魚卵抽出物の調製: 解凍した魚卵に 5 倍重量の 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を

加えてホモジナイズした後、2,000 g で 15 分間遠心分離し、沈殿および表層の油分を取り除いた。得られた抽出画分をさらに 2,000 g で 30 分間遠心分離した上清を魚卵抽出物とした。

シロサケβ'-コンポーネントおよびリポビテリン抗血清の調製: 精製したシロサケβ'-コンポーネント(β)およびリポビテリン(Lv)をアジュバントと混合し、ウサギに1週間おきに4回に分けて注射した。最後の注射から1週間以上経過後、採血し遠心分離によって血清を採取し、40%硫酸分画を行った上清を抗血清として用いた。得られた抗血清は等量の0.2%アジ化ナトリウムを加えて4°Cで保管した。以降、β抗血清およびLv抗血清を各々α-β、α-Lvと称する。

SDS-PAGE: アクリルアミドゲルおよび泳動バッファーの調製はLaemmli法で行った。分離ゲル濃度は12.5%、濃縮ゲル濃度は4.5%とした。

ウェスタンブロッティング: SDS-PAGE後のゲル中タンパク質成分を、セミドライブロッティング装置によってPVDF(polyvinylidene difluoride)膜に転写した。続いて3%カゼインと150 mM NaClを含む20 mM Tris-HCl(pH 7.5)で60分間ブロッティングした後、膜に転写したタンパク質成分を抗血清または患者血清と4°Cで18時間反応させた。次にこの膜を0.05% Tween 20を含む150 mM NaCl(pH 7.5)で3回、さらに150 mM NaCl(pH 7.5)で3回洗浄後、ペルオキシダーゼ修飾ヤギ抗ウサギIgG(5000倍希釈)と室温で3時間反応させた。最後に転写膜を上記と同様の方法で洗浄後、発光法(Immobilon Western Kit: Millipore)によって、血清中のIgEと反応したタンパク質成分を検出した。

4) 甲殻類検知キット①(日本水産、日水製薬)

甲殻類トロポミオシンの精製: クルマエビ、ブラックタイガー、アメリカンロブスター、タラバガニ、ズワイガニ、ナンキョクオキアミの筋肉を材料として、トロポミオシンの精製を行った。

交差反応性確認用トロポミオシンの精製: クロアワビ、マダコ、スルメイカ、ホタテガイ、アサリ、カキ、バイガイを材料として、トロポミオシンの精製を行った。

ポリクローナル抗体の作製: ブラックタイガー由来精製トロポミオシンを抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。抗血清よりアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製を行い、精製ポリクローナル抗体を作製した。

モノクローナル抗体の作製: ブラックタイガー由来精製トロポミオシンで免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞とマウスミエローマを融合して得たハイブリドーマをマウス腹腔内で増殖させ、腹水を採取した。採取した腹水よりアフィ

ニティーカラムにて精製し、精製モノクローナル抗体を作製した。

検出系の検討: モノクローナル抗体をマイクロプレートに固相化し、ブロッティング処理を行った。このマイクロプレートに抗原となる試料液を100 μL/well添加し、常温で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄した。次いでペルオキシダーゼで標識したポリクローナル抗体を100 μL/well添加し、常温で1時間反応させた後、再度洗浄した。検出はTMB基質液を100 μL/well添加し、常温で20分間反応させた後、H₂SO₄で反応を停止させることによって行った。測定はマイクロプレートリーダーを用いて、主波長450 nm、副波長650 nmで測定した。検量線にはブラックタイガーの筋肉から、0.5% SDS および2%メルカプトエタノールを含有するPBS(pH 7.4)により抽出し、2-D Quant kit(Amersham Biosciences)でタンパク定量した標準液を用いた。

モデル食品の試作製造: モデル食品としてシュウマイ、クリームコロッケ、トマトソースを作製した。魚肉ソーセージおよびフリーズドライ卵スープはマルハグループが作製したものを供与していただいた。各食品にはブラックタイガーより調製した標準粉末を加工前に添加した。添加濃度は10 mg/kgとした。シュウマイは豚肉、でん粉、食塩、醤油、小麦粉、クリームコロッケはバター、小麦粉、牛乳、食塩、胡椒、トマトソースはオリーブオイル、タマネギ、ニンニク、ホールトマト、食塩、胡椒を原材料とした。

検出系の評価: 5種類のモデル食品を用いて添加回収試験を行った。モデル食品の抽出はSDSおよびメルカプトエタノールを含む抽出用緩衝液を用いて一晚振盪することによって行い、さらに緩衝液で希釈し試料液を調製した。前処理における希釈倍率は、400倍希釈に相当する。

甲殻類エキスに対する反応性の検討: 8種類の甲殻類エキスを用いて検出系の反応性を試験した。エビ、カニ、オキアミを原料とするエキスからSDSおよびメルカプトエタノールを含む抽出用緩衝液を用いて試料液を調製し、検出系により測定した。

5) 甲殻類検知キット②(マルハグループ)

モノクローナル抗体の作製: ブラックタイガー由来精製トロポミオシン(BTTM)を抗原としてマウスに免疫した。常法に従いハイブリドーマを作製し、BTTMを用いて抗体産生クローンのスクリーニングを行った。

ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体の性質の検討: 得られたモノクローナル抗体の特異性を、ブラックタイガー、タラバガニ、マガキ、ホタテガイ、スルメイカ由来精製トロポミ

オシン (TM) を固相化した Direct-ELISA 法にて検討した。また、代表的な甲殻類 14 種類、軟体動物 10 種類 (表 1) の筋組織抽出液を作製して、それぞれのタンパク質量を一定にして SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロット分析を行った。ダニ 2 種類については市販の抗原溶液を用い同様に検討した。さらに、PBS に溶解した未変性の BTTM、PBS に溶解し加熱処理した BTTM、SDS およびメルカプトエタノールを含む PBS に溶解した BTTM、および SDS およびメルカプトエタノールを含む PBS に溶解し加熱処理を行った BTTM を用いて、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の可溶性抗原に対する反応性を、吸収 ELISA 法にて検討した。

サンドイッチ ELISA 測定系の構築：目的とする性質を有する抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築し、ブラックタイガー、タラバガニ、ガザミ、マガキ、ホタテガイ、スルメイカ由来精製 TM を用いて測定系の特異性を検討した。

標準溶液の調製：標準溶液調製に用いるブラックタイガーはベトナム産のものを使用した。ブラックタイガー尾肉をホモジナイザーで十分破砕し、凍結乾燥処理を行った。凍結乾燥後、バイブレーションミルにて粉末化した。ブラックタイガー尾肉粉末 100 mg をポリプロピレン製遠心管に取り、0.5% SDS、2%メルカプトエタノール、プロテアーゼインヒビターを含む PBS 20 ml を加え十分に攪拌した。遠心管を横にして振盪機で一晩 (15 時間、室温) 振盪しながら抽出を行った。抽出終了後、10,000 g、30 分間遠心分離し上清を分取した。上清を孔径 0.80 μm フィルターでろ過した。ろ液を 100°C で 10 分間加熱し、標準溶液原液とした。標準溶液原液のタンパク質量はアマシヤムバイオサイエンス社製 2-D Quant kit を用いて測定した。

各種エキスとの反応性の検討：履歴の明らかな 8 種類の甲殻類エキスをサンドイッチ ELISA 系を用いて測定し、甲殻類アレルギー患者血清の反応性との相関を検討した。

試作モデル加工食品を用いた ELISA 測定系の評価：モデル加工食品として、魚肉ソーセージ、フリーズドライ卵スープ、クリームコロッケ、シュウマイ、トマトソースを試作した(クリームコロッケ、シュウマイおよびトマトソースは、日本水産が試作したものを供与していただいた)。各モデル加工食品には抗原としてブラックタイガー尾肉粉末を添加した。添加濃度は 2 レベルとし、50 ppm、10 ppm とした。モデル加工食品をホモジナイザーで十分破砕し、均質混和して調製試料とした。調製試料 1 g をポリプロピレン製遠心管に取り、抽出液 (森永科学研

究所製、特定原材料抽出液) を 19 ml の割合で加え、均一に分散するよう十分に攪拌操作を行った。遠心管を横にして振盪機で一晩 (12 時間以上、室温) 振盪しながら抽出を行った。抽出終了後、3000 g、20 分間遠心分離し上清を分取した。上清をろ紙でろ過し抽出溶液とした。これらの溶液をサンプル希釈緩衝液にて 20 倍希釈し測定溶液とした。

C. 研究結果

1) 甲殻類のアレルゲン

6 種甲殻類 (ウシエビ、ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、カメノテ、ミネフジツボ) の加熱抽出液を SDS-PAGE で分析したところ、いずれにおいても約 37 kDa のトロポミオシンのバンドが検出され、イムノブロットイングではすべての甲殻類のトロポミオシンが IgE 陽性反応を示した (図 1)。アメリカンロブスター精製トロポミオシン阻害剤として用いた阻害イムノブロットイングでは、すべての甲殻類トロポミオシンのプロットが消失した (データ示さず)。

4 種甲殻類 (ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、ミネフジツボ) のトロポミオシンの全アミノ酸配列を cDNA クローニング法により決定し、既知甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列と並べて図 2 に示した。ミネフジツボトロポミオシンは他の甲殻類トロポミオシンとは配列相同性は非常に低く (約 55%)、データベース検索により軟体動物のアワビ類のトロポミオシンに最も近いことが判明した (ミネフジツボとアワビ類のトロポミオシンの配列相同性は 75-80%)。一方、ホッコクアカエビ、ケガニおよびナンキョクオキアミのトロポミオシンは他の甲殻類のトロポミオシンと 90% 以上の配列相同性を示した。なお、甲殻類トロポミオシンとしては fast タイプ、slow-twitch タイプおよび slow-tonic タイプの 3 種類が知られているが、アミノ酸配列の特徴から、ホッコクアカエビでは fast タイプ、ケガニの脚肉では slow-twitch タイプ、胴肉では slow-tonic タイプ、ナンキョクオキアミでは fast タイプであると判断された。

2) 貝類のアレルゲン

8 種貝類 (アカガイ、アサリ、ウバガイ、トリガイ、マガキ、エゾバイ、クロアワビ、サザエ) の加熱抽出液の場合、SDS-PAGE ではすべてに約 37 kDa のトロポミオシンのバンドが検出された (図 3A)。イムノブロットイングでは、一部貝類において 50-100 kDa にもプロットが観察されたが、8 種すべての貝類のトロポミオシンは IgE 反応性を示した (図 3B)。また、サザエ精製トロポミオシンを阻害剤に用いた阻害イムノブロットイングでは、トロポミオシンのブ