

ロットはすべて消失あるいは減弱した（データ示さず）。

cDNA クローニング法により、4 種貝類（アカガイ、アサリ、クロアワビ、サザエ）のトロポミオシンについては全アミノ酸配列を、3 種貝類（ウバガイ、トリガイ、マガキ）のトロポミオシンについては部分アミノ酸配列を決定し、既知の軟体動物トロポミオシンのアミノ酸配列と並べて図 4 に示した。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。

3) 魚卵のアレルゲン

シロザケ a-β と a-Lv の各種魚卵抽出物に対する反応性：10 種類の魚卵（うち 1 種類は乾製品）から得た魚卵抽出物に対する a-β と a-Lv の反応性を、ウエスタンブロッティングによって調べた結果を図 5 に示す。すべての魚卵抽出物中に、a-β と反応するタンパク質成分が存在した。a-β が反応する卵黄抽出成分は主に 14-20 kDa (β) であったが、魚種によって反応成分の数と分子量とが異なっていた。一方、a-Lv と反応するタンパク質はスケトウダラとホッケを除く魚卵抽出物中に存在した。反応するタンパク質は Lv-軽鎖 (Lv-LC) と推定される <30 kDa 成分で、カレイ 2 魚種、イトウ、カペリンにおいては Lv 重鎖 (Lv-HC) に相当する 67-90 kDa 成分とも反応した。<30 kDa 成分に対する反応性は 67-90 kDa 成分よりも強かった。

患者血清の各種魚卵抽出物に対する反応性：17名のイクラアレルギー患者血清の各種魚卵抽出物に対する反応性を表 2 に取りまとめた。全患者血清がシロザケ、イトウ、ニジマスの各種魚卵抽出物と反応した。スケトウダラの魚卵抽出物とは患者血清のうち 11 検体が反応した。上記以外の魚卵抽出物とも反応する患者血清が認められ、現在分析を継続中である。

患者血清と反応した魚卵タンパク質成分の検討：魚卵抽出物に含まれるタンパク質成分の中で、患者血清と反応するものは以下の通りであった。

シロザケでは SDS-PAGE 上で分画された 8 成分（分子量の大きい順に CS 1 から CS 8）について検討した。全供試血清 (n=17) が β (CS7 および CS8) ときわめて強く反応した。Lv-HC に対する反応性は弱かったが、n=10 が CS2 (約 80kDa) と強く反応した。5 名の患者血清は Lv-LC (CS6) と反応し、この反応性は β に次いで強かった。

イトウでは SDS-PAGE 上で分画された 5 成分（分子量の大きい順に ST1 から ST5）について検討した。全供試血清が ST-5 (シロザケ a-β と反応する成分) ときわめて強く反応した。11 名の患者血清が弱いながらも ST2 (シロザケ a-β と反応する成分) と、4 名の患者血清が ST4 (シロザケ a-Lv と反応する成分) と反応した。

ニジマスでは SDS-PAGE 上で分画された 6 成分（分子量の大きい順に RT1 から RT6）について検討した。14 名の患者血清が、RT6 (シロザケ a-β と反応する成分) と強く反応した。10 名の患者血清が弱いながらも RT2 (シロザケ a-β と反応する成分) と、6 名の患者血清が RT5 (シロザケ a-Lv と反応する成分) と反応した。シロザケ a-Lv と反応する高分子成分 (Lv-HC に相当) は検出されなかった。

スケトウダラでは SDS-PAGE 上で分画された 6 成分（分子量の大きい順に WP 1 から WP6）について検討した。シロザケ a-Lv と反応する成分は見あたらなかった。4 名の患者血清が WP-4、5、6、(シロザケ a-β と反応する成分) と強く反応し、8 名の患者血清が WP1 あるいは WP12 と弱く反応した。

4) 甲殻類検知キット① (日本水産、日水製薬)

特異性：精製トロポミオシンを用いて特異性を検討した。その結果、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に対して反応を示したが、軟体動物との反応性は認められなかった。

添加回収試験：5 種類のモデル食品を測定し添加回収率を求めた。シュウマイ、クリームコロッケでは回収率は 60~90%であったが、その他の 3 種類では回収率は低く、50%以下であった。トマトソースの pH は約 3.5 と酸性であるが、測定時の pH は緩衝液により中性であった。

甲殻類エキスに対する反応性：8 種類の甲殻類エキスについて、検出系で測定した結果と患者血清との反応性を表 3 に示す。煮出しにより製造された 4 種類のエキスに対してはいずれも強い反応を示した。一方、酵素分解処理により製造された 4 種類のエキスのうち 3 種類では陰性、あるいは弱い反応しか認められなかった。カニを原料とし酵素分解されたエキス 1 種類では強い反応を示した。これら検出系による測定結果は患者血清との反応性をほぼ対応していた。

5) 甲殻類検知キット② (マルハグループ)

Direct-ELISA 法による抗体の特異性：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 TM を用いて抗 BTM 抗体の特異性を検討した結果、軟体動物 TM にほとんど反応性を示さないクローンが 15 種類得ら

れた。そのうち、ブラックタイガー、タラバガニにはほぼ同等の反応性を示すものは9クローン、ブラックタイガーのみに反応性を示し、タラバガニには反応性を示さないものは6クローンであった。今回はブラックタイガー、タラバガニにはほぼ同等の反応性を示す9クローンを対象に以後の検討を進めた。

ウエスタンブロット分析による検討：モノクローナル抗体9クローンのうち、クルマエビ族、コエビ族、イセエビ族、ザリガニ族、異尾族、短尾族に反応性を認め、頭足類、二枚貝類、腹足類といった軟体動物には反応性を認めなかったクローンが6種類あった。この6クローンはトゲエビ上目であるシャコには反応性を認めたが、オキアミ、ダニ類には反応性を認めなかった(図6)。

可溶性抗原との反応性：各種可溶性抗原との反応性を検討した結果、抗BTMポリクローナル抗体は加熱処理抗原に対して反応性がやや低下するものの、SDSおよびメルカプトエタノール存在下では反応性が回復することが認められた。一方、モノクローナル抗体の場合、いずれの可溶性抗原に対しても高い反応性を認めたもの(クローン10A3)もあれば、特に加熱処理抗原に対する反応性の低下が顕著なもの(クローン3B9)があり、今回は各種可溶性抗原との反応性の高いモノクローナル抗体を選択することとした。

サンドイッチELISA測定系の特異性：上記の通り各種抗体の性質を検討した結果から、一次抗体にモノクローナル抗体を、二次抗体にポリクローナル抗体を選択し、サンドイッチELISA系を構築した。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ところ、本測定系は甲殻類に高い特異性を示すことが確認された(図7)。

各種エキスとの反応性：8種類の甲殻類エキスの測定結果、患者血清との反応性を表3に示す。表に示すとおり、各種甲殻類エキスの患者血清との反応性と本測定系での測定結果はほぼ一致しており、患者血清に反応性を示さないエキス(カニパイン消化エキス、オキアミエキス)は本測定系でも検出することは困難であった。

試作モデル加工食品を用いたELISA測定系の評価：各種モデル加工食品の添加濃度毎の回収率および希釈直線の回帰係数を表4に示す。魚肉ソーセージ50ppm、10ppm、フリーズドライ卵スープ50ppm、10ppm、シュウマイ50ppm、10ppm、クリームコロッケ10ppm、トマトソース50ppmでは回収率が50%~150%の範囲に入

っており、概ね良好な回収率を示した。一方、クリームコロッケ50ppmでは200%以上と高めの回収率を示した。また、トマトソース10ppmの回収率は低く、30%程度であった。すべてのモデル加工食品において回帰係数0.988~0.999と、良好な希釈直線性が認められた。

D. 考察

1) 甲殻類のアレルゲン

甲殻類の主要アレルゲンはトロポミオシンであることが証明されているが、これまでに調べられている甲殻類は、トゲエビ亜綱十脚目のシャコを除くとすべて軟綱亜綱十脚目に属しているいわゆるエビ・カニ類である。本研究では、いわゆるエビ・カニ類であるホッコクアカエビとケガニの他に、軟綱亜綱オキアミ目のナンキョクオキアミと蔓脚亜綱のカメノテ、ミネフジツボを取り上げたが、SDS-PAGEならびにイムノブロッティングによりいずれも主要アレルゲンはトロポミオシンであることが確認された。さらに阻害イムノブロッティングの結果から、トロポミオシンの抗原交差性は分類上の位置が異なる幅広い甲殻類間で認められた。ナンキョクオキアミやカメノテ、ミネフジツボは一部で食用にされているので、アレルギーの発症には警戒が必要である。とくにカメノテとミネフジツボは、外見上は甲殻類というより貝類に近いので、甲殻類アレルギー患者ならびにこれらを食品として提供している業者に対して甲殻類であることを周知することが望まれる。

本研究では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アミノ酸配列を明らかにすることができた。ミネフジツボトロポミオシンのアミノ酸配列は、甲殻類より軟体動物のアワビ類のトロポミオシンに近いというトロポミオシンの分子進化を考える上で非常に興味深い事実が判明した。食物アレルギーの点では、フジツボ類は甲殻類ではなく軟体動物として扱った方がいいかもしれない。ミネフジツボ以外の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のアミノ酸配列と非常に類似していた。甲殻類トロポミオシンはfastタイプ、slow-twitchタイプおよびslow-tonicタイプの3種類に分けられるが、これまでの知見と本研究結果とを総合すると、エビ類、イセエビ、オキアミおよびシャコはfastタイプ、ザリガニ類(アメリカンロブスター)およびヤドカリ類(タラバガニ)はfastタイプとslowタイプ、カニ類はslowタイプのトロポミオシンをもつといえる。すなわち、いわゆるエビ類はfastタイプのトロポミオシンのみを、いわゆるカニ類はタラバガニを除くとslowタイプのトロポミオシンのみを

もっている。fast タイプと slow タイプは 43-79 残基の領域で変異が、slow-*tonic* のみは 269-284 残基の領域で変異がみられる。エビアレルギー患者の多くはカニアレルギー、あるいはカニアレルギーの患者の多くはエビアレルギーであるが、エビだけあるいはカニだけにアレルギーを示す患者もいる。エビだけあるいはカニだけにアレルギーを起こす患者の違いは、fast タイプと slow タイプのトロポミオシンの変異によって説明できると思われるので、今後のこれら患者血清を用いた IgE 結合エピトープ解析が望まれる。

2) 貝類のアレルゲン

軟体動物の主要アレルゲンは甲殻類同様にトロポミオシンであるとされているが、食用にされている貝類は非常に多様で、これまでに調べられた種類は限られている。本研究では 8 種貝類を取り上げたが、いずれも主要アレルゲンは抗原交差性を示すトロポミオシンであることが確認された。

これまでに明らかにされている軟体動物トロポミオシンのアミノ酸配列をみると、頭足類(コウイカ、アオリイカ、スルメイカ、アカイカ、マダコ)、アワビ類(トコブシ、アカネアワビ、ミミガイ)、イガイ類(ヨーロッパイガイ、ムラサキイガイ、イガイ類)、ホタテガイ類(ヒオウギ、アズマニシキ、ホタテガイ)といったグループ内では 90%以上の高い配列相同性があるのに対し、グループ間での配列相同性は 70-80%と低い。本研究では、クロアワビトロポミオシンのアミノ酸配列を解明し、既知のアワビ類トロポミオシンと配列が近いことを確認した。さらに、アワビ類と比較的近縁のサザエのトロポミオシンもアワビ類トロポミオシンと同等に考えていいことを示した。しかし、アカガイとアサリのトロポミオシンのアミノ酸配列は互いに大きく異なるだけでなく、既知の軟体動物トロポミオシンとの配列相同性も 70-80%程度しかなく、これら 2 種貝類はそれぞれ独立したグループを形成していると判断された。このように軟体動物トロポミオシンのアミノ酸配列は分類上の位置によって変異が大きいので、IgE 結合性や抗原交差性の基礎データとしてできるだけ多くの種類の軟体動物についてトロポミオシンのアミノ酸配列を解明することが必要である。

3) 魚卵のアレルゲン

まず、イクラアレルギーの主要アレルゲンである β を検査対象タンパク質とする可能性について述べる。 α - β (シロザケ:モノクローナル抗体)と患者血清は、いずれもシロザケの β と高い反応性を有している。そして α - β は、供試魚種すべての魚卵タンパク質に含まれる特定の

タンパク質成分(たとえば ST5、RT6、WP6)と反応し、さらに、すべての患者血清がサケ属 3 魚種の β 相当成分(ST5、RT6 は分子サイズによる推定)と反応した。すなわち、 β の魚種間における免疫学的交差性はかなり高いものと推定できる。以上の結果を踏まえると、抗血清 α - β を用いた食品中のイクラの判別は不可能と思われる。またイクラの検出に利用する β モノクローナル抗体の作成についても、魚種間の高い交差性を認識しながら検討する必要がある。

次に、卵黄タンパク質の主要成分である Lv を検査対象タンパク質とする可能性について述べる。 α -Lv についても、多くの魚卵抽出物中に反応するタンパク質が見られたが、反応した各魚卵においては高分子側のタンパク質成分(たとえば CS1 と CS2 に相当)の反応性はそれほど高くない。シロザケの CS1 または CS2 部分を用いた検査系の開発が妥当と思われる。なおアミノ酸一次構造に対する情報がほとんどないので、この点を明らかにする必要がある。

食品原料として多用される家禽(ニワトリ、ウズラ)卵と魚卵の免疫学的交差性についても、本研究と並行した検討が必要である。

4) 甲殻類検知キット①(日本水産、日水製薬)

現在、サンドイッチ ELISA 法を用いた検出系および 5 種類のモデル食品について、組成、製造方法の検討を継続している。今回、検出系およびモデル食品の試作を行い測定した。

ブラックタイガー由来精製トロポミオシンを免疫原として作製したモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体はエビとカニの両方に反応性を示すことをサンドイッチ ELISA 法を用いて確認した。甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列は相同性が高いことがすでに明らかとなっている。今回取得した抗体は、エビとカニに共通のアミノ酸配列を認識していることが示唆された。

取得した抗体を用いて試作した検出系はモデル食品を用いた検討から、原料段階で添加された甲殻類を検出可能であることが確認された。添加回収試験における回収率はシューマイとクリームコロッケでの良好であったが、トマトソース、魚肉ソーセージおよびフリーズドライ卵スープではやや低かった。トマトソースと魚肉ソーセージの場合、レトルト処理が回収率の低さに影響していると考えられる。

甲殻類エキスには、煮出し等により製造されたものと酵素処理により製造されたものがある。今回試作した検出系は、煮出し等により製造されたエキスには強い反応性を示したが、酵素処理されたエキスに対する反応は弱いことが確認された。

5) 甲殻類検知キット② (マルハグループ)

作成した種々抗体の性質解析結果に基づき、甲殻類に特異性の高いサンドイッチ ELISA 系を構築した。現行の特定原材料 5 品目検出キットにおけるサンプル調製プロトコールに準拠し、本測定系を用いてモデル加工食品を測定した結果、当初、いずれの食品についても非常に低い回収率しか得られず、希釈直線性も悪かった (data not shown)。そこで、測定系に若干の改良を加えたところ、一部の食品を除き回収率、希釈直線性が改善された。

今後、バリデーションに向けて、問題点の残った食品における反応性改善を検討するとともに、再現性や保存安定性を検討する必要がある。

E. 結論

- 1) 甲殻類のアレルゲン：甲殻類は分類上の位置が異なっても、主要アレルゲンはお互いに抗原交差性を示すトロポミオシンである。甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列は、蔓脚綱を除くと相同性が非常に高く、抗原交差性を裏付けている。
- 2) 貝類のアレルゲン：貝類の主要アレルゲンはお互いに抗原交差性を示すトロポミオシンである。しかし、貝類を含めた軟体動物のトロポミオシンのアミノ酸配列はお互いに変異が大きく、今後さらにアミノ酸配列解析を継続する必要がある。
- 3) 魚卵のアレルゲン：イクラの検出検査に β -コンポーネントを用いるのは、種間交差性の強さから難しさが伴う。リポビテリン重鎖部分を用いる検査系の検討が妥当であると思われる。
- 4) 甲殻類検知キット① (日本水産、日水製薬)：エビとカニのトロポミオシンを特異的に検出可能な抗体を作製し、サンドイッチ ELISA を試作した。また 5 種類のモデル食品を試作し反応性を確認した結果、原料段階で添加された甲殻類を検出可能であることが確認された。しかし、一部の食品で回収率が低い傾向が認められたことから、さらなる検討が必要であると考えられた。
- 5) 甲殻類検知キット② (マルハグループ)：甲殻類に特異性の高いサンドイッチ ELISA 測定系を構築した。試作したモデル加工食品の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。しかし、バリデーションに向けては一部食品に対する反応性を改善する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Shimakura, Y. Tonomura, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion. *Food Chem.* 91, 247-253 (2005)
 - 2) 塩見一雄：魚介類アレルギーの現状と表示の課題. *食品と開発* 40, 7-10 (2005)
 - 3) 久保友和、渡辺一彦、原 彰彦、清水 裕、佐伯宏樹：シロサケ卵中に含まれる主要アレルゲンの探索. *北大水産彙報* 56, 55-59 (2005)
 - 4) A. Kobayashi, H. Tanaka, Y. Hamada, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 61, 357-363 (2006)
 - 5) 塩見一雄：水産物によるアレルギー. *食品工業* 49, 32-41 (2006)
 - 6) 塩見一雄：魚貝類のアレルゲン. *アレルギー・免疫* (印刷中)
 - 7) Y. Lu, T. Ohshima, H. Ushio, Y. Hamada and K. Shiomi: Immunological characteristics of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. *Food Chem.* (in press)
 - 8) K. Motoyama, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem. Toxicol.* (in submission)
- #### 2. 学会発表
- 1) 元山かん奈、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：数種甲殻類の主要アレルゲン (トロポミオシン) の一次構造特性. 平成17年度日本水産学会大会 (2005年4月、東京)
 - 2) 須磨洋太、濱田友貴、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：アメリカンロブスターの速筋および遅筋に含まれるトロポミオシンのアレルゲン性評価. 平成17年度日本水産学会大会 (2005年4月、東京)
 - 3) 金森真紀、濱田友貴、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：魚類アレルゲンのイムノプロット分析. 平成17年度日本水産学会大会 (2005年4月、東京)
 - 4) 小林綾子、濱田友貴、田中洋行、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：魚類普通肉および血合肉のアレルゲン性およびアレルゲンの比較. 平成17年度日本水産学会大会 (2005年4月、東京)
 - 5) 小林征洋、嶋倉邦嘉、石崎松一郎、長島裕二、塩見一雄：アニサキス新規16kDaアレルゲンのcDNAクローニングおよび大腸菌における発現. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2005年6月、岡山)
 - 6) 小林征洋、池田 薫、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄：アニサキス新規アレルゲンDnaJ様タンパク質のcDNAクロー

ーニングおよび発現. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2005年10月、盛岡)

- 7) 塩見一雄、元山かん奈、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二：頭足類の主要アレルゲンとして同定されたトロポミオシンの一次構造解析. 第55回日本アレルギー学会秋季学

術大会 (2005年10月、盛岡)

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

表 1 ウエスタンブロット分析に供した動物種

トゲエビ上目	口脚目	シヤコ	
	オキアミ目	オキアミ	
本エビ上目	十脚目	クルマエビ族	ブラックタイガー、ギアナピンク
		コエビ族	アマエビ、テナガエビ、サクラエビ
		イセエビ族	イセエビ (尾肉) fast、イセエビ (爪肉) slow、ウチワエビ
		ザリガニ族	オマール (尾肉) fast、オマール (爪肉) slow、キューバロブスター
		異尾族	タラバガニ
		短尾族	ズワイガニ (脚肉)、ガザミ (脚肉)
軟体動物	頭足類	八腕目	イイダコ、ミズダコ
		十腕目	スルメイカ
	二枚貝類	遊泳 type	ホタテガイ、ハマグリ、シジミ、ホッキガイ
		付着 type	マガキ
	腹足類	サザエ、アカネアワビ	
その他		ダニ (<i>D. pteronyssinus</i>)、ダニ (<i>D. farinae</i>)	

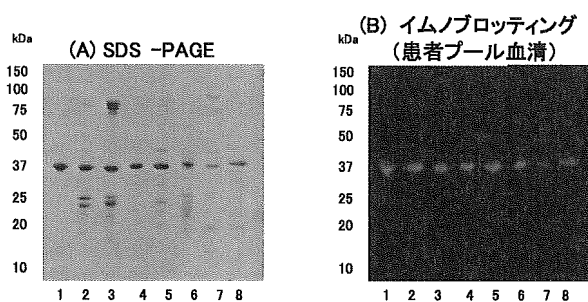


図1 甲殻類抽出液のSDS-PAGEおよびイムノブロッティング. 1:アメリカンロブスター精製トロポミオシン、2:ウシエビ、3:ホッコクアカエビ、4:ケガニ脚肉、5:ケガニ胴肉、6:ナンキョクオキアミ、7:カメノテ、8:ミネフジツ。

```

1 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS 80
2 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
3 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
4 MLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
5 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
6 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
7 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
8 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
9 MLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
10 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
11 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
12 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
13 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
14 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
15 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
16 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS
17 MDAIKKKMQANKLEKDNAMDRAADTLEQQNKEANRAEKSEEEVHNLQKRMOOLENDLDQVOESLLKANKIQLVEKDKALS

1 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR 160
2 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
3 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
4 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
5 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
6 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
7 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
8 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
9 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
10 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
11 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
12 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
13 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
14 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
15 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
16 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR
17 AECEVAALNRRIQLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSESRMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEAEADR

1 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE 240
2 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
3 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
4 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
5 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
6 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
7 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
8 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
9 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
10 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
11 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
12 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
13 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
14 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
15 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
16 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE
17 KYDEVARKLANVVEADLERAEERAEETGESKIVELEEEELRVVGNLKSLEVSSEERKANQREEEAYKEQIKTLTNKLLKAAEARAE

1 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
2 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
3 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
4 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
5 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
6 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
7 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
8 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
9 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
10 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
11 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
12 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
13 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
14 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
15 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
16 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY
17 FAERSVQKLQKEVDRLDEDELVNEKEKYYKSIITDELDDQTFSELSGY

```

図2 甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列。1：ブラウンシュリンプ、2：クルマエビ、3：ウシエビ、4：ヨシエビ、5：ホッコクアカエビ、6：アメリカンロブスター-fast、7：アメリカンロブスター-slow-twitch、8：アメリカンロブスター-slow-tonic、9：サガミイセエビ、10：タラバガニ fast、11：タラバガニ slow-tonic、12：ズワイガニ slow-tonic、13：ケガニ slow-twitch、14：ケガニ slow-tonic、15：ナンキョクオキアミ、16：シヤコ、17：ミネフジツボ。 ブラウンシュリンプトロポミオシンと異なる残基は影をつけて示す。

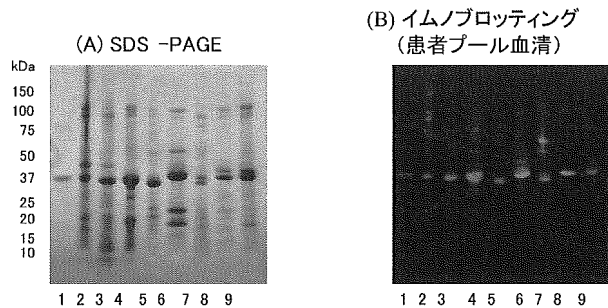


図3 甲殻類抽出液の SDS-PAGE およびイムノブロットイング。1：サザエ精製トロポミオシン、2：アカガイ、3：アサリ、4：ウバガイ、5：トリガイ、6：マガキ、7：エゾバイ、8：クロアワビ、9：サザエ。

```

1 MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLLEDAKKNKTEEDLSTLQKKYSNLENDFDNANEQLTAANTNLEASEKRVAE 80
2 MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLLEDAKKNKTEEDLSTLQKKYSNLENDFDNANEQLTAANTNLEASEKRVAE
3 MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLLEDAKKNKTEEDLSTLQKKYSNLENDFDNANEQLTAANTNLEASEKRVAE
4 MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLLEDAKKNKTEEDLSTLQKKYSNLENDFDNANEQLTAANTNLEASEKRVAE
5 MDAIKKKMLAMKMERELATDKAEQTDQKLRDTEEDNKNKLEEDLSTLQKKFSNLENDFDNAKQLAEANQKLETSEKRVGE
6 MDAIKKKMVMAMKMEKKNALDRAEQLEQKLRTEEAKAKIEDDYNSLQKKS IQTENLDNTOTQLQDVQAKYTTAEKQIAE
7 MDAIKKKMVMAMKMEKKNALDRAEQLEQKLRTEEAKAKIEDDYNSLQKKS IQTENLDNTOTQLQDVQAKYTTAEKQIAE
8 MDAIKKKMVMAMKMEKKNALDRAEQLEQKLRTEEAKAKIEDDYNSLQKKS IQTENLDNTOTQLQDVQAKYTTAEKQIAE
9 MDAIKKKMQAMKVDRENAQDLAEQMEQKLRDTEETAKAKLEEFNQLQKLLTTENNFDVANEQLQEAANTKLENSDKQITQ
10 MDAIKKKMQAMKVDRENAQDLAEQMEQKLRDTEETAKAKLEEFNQLQKLLTTENNFDVANEQLQEAANTKLENSDKQITQ
11 MDAIKKKMQAMKVDRENAQDLAEQMEQKLRDTEETAKAKLEEFNQLQKLLTTENNFDVANEQLQEAANTKLENSDKQITQ
12 MDAIKKKMQAMKVDRENAQDLAEQMEQKLRDTEETAKAKLEEFNQLQKLLTTENNFDVANEQLQEAANTKLENSDKQITQ
13 MDSIKKKMIAMKMEKENALDRSEQLEQKLRDTEEQAKAKIEEDLGGAYQKKS F ILENDFDVTNKWEDASVVKLEAEKLLTE
14 MDAIKKKMLAMKMEKENALDRSEQLEQKLRDTEEQAKAKIEEDLGGAYQKKS F ILENDFDVTNKWEDASVVKLEAEKLLTE
15
16
17 MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDTEEQAKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQEAAMKLETSEKRVTE
18 MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDTEEQAKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQEAAMKLETSEKRVTE
19 MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDTEEQAKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQEAAMKLETSEKRVAE
20 MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDTEEQAKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQEAAMKLETSEKRVTE
21 MDAIKKKMLAMKMEKENALDRAEQLEQKLRDTEEQAKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQEAAMKLETSEKRVTE

1 CESEIQGLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADR 160
2 CESEIQGLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADR
3 CESEIQGLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADR
4 CESEIQGLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADR
5 CESEIAGLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOTKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADR
6 HEQEIQSLTRKISMLLEEDIMKSEERYTTAASKLEEASKAADESERNRKVLNENLNCGNDERIDQLEKQLEAKWIAEEDAK
7 HEQEIQSLTRKISMLLEEDIMKSEERYTTAASKLEEASKAADESERNRKVLNENLNCGNDERIDQLEKQLEAKWIAEEDAK
8 HEQEIQSLTRKISMLLEEDIMKSEERYTTAASKLEEASKAADESERNRKVLNENLNCGNDERIDQLEKQLEAKWIAEEDAK
9 LESDVGSLORRILQLEEDFERSEEKLNSTTEKLEEASKAADESERNRKVLNENLNCGNDERIDQLEKQLEAKWIAEEDAK
10 LESDVGSLORRILQLEEDFERSEEKLNSTTEKLEEASKAADESERNRKVLNENLNCGNDERIDQLEKQLEAKWIAEEDAK
11 LESDVGSLORRILQLEEDFERSEEKLNSTTEKLEEASKAADESERNRKVLNENLNCGNDERIDQLEKQLEAKWIAEEDAK
12 AEQEIQSLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEEDAK
13 AEQEIQSLNRRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEEDAK
14 ADEDEIKY GTRRIQLLEEDLERSEERLTS AOSKLE DASKAADESERGRKVLNRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEEDAK
15
16
17 MEQEVSGTTRKITLLEEDLERNEERLQ TATERLEEASKAADESERGARVLESRS LADDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAER 240
18 MEQEVSGTTRKITLLEEDLERNEERLQ TATERLEEASKAADESERGARVLESRS LADDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAER
19 MEQEVSGTTRKITLLEEDLERNEERLQ TATERLEEASKAADESERGARVLESRS LADDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAER
20 MEQEVSGTTRKITLLEEDLERNEERLQ TATERLEEASKAADESERGARVLESRS LADDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAER
21 MEQEVSGTTRKITLLEEDLERNEERLQ TATERLEEASKAADESERGARVLESRS LADDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAER

1 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVELEEEELKVVGNMKSLEISEQEASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
2 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVELEEEELKVVGNMKSLEISEQEASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
3 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVELEEEELKVVGNMKSLEISEQEASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
4 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVELEEEELKVVGNMKSLEISEQEASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
5 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVELEEEELKVVGNMKSLEISEQEASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
6 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
7 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
8 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
9 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
10 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
11 KFDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
12 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
13 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
14 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
15 AEAKIVELTEELSVVGNLKLQNAVDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
16 EAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
17 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
18 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
19 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
20 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA
21 KYDEAARKLAITEVDLERAERLEAAEAKIVDLEEQITVVGANIKTLOVQNDQASQREDSYEETIRD LTHRLKKAENRRAA

1 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY 284
2 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
3 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
4 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
5 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
6 EAERTVSKLRKEVDRLEDELLTEKKEKYKKS ISDEL DQTF AELAGY
7 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLTEKKEKYKKS ISDEL DQTF AELAGY
8 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLTEKKEKYKKS ISDEL DQTF AELAGY
9 EAERQVVKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
10 EAERQVVKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
11 EAERQVVKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
12 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
13 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
14 EAERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGM
15 EAERVVVKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGM
16 EAERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGM
17 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
18 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
19 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
20 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY
21 EAERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKKS ISDEL DQTF AELAGY

```

図4 軟体動物トロポミオシンのアミノ酸配列。1: コウイカ、2: アオリイカ、3: スルメイカ、4: アカイカ、5: マダコ、6: ヨーロッパイガイ、7: ムラサキイガイ、8: イガイ類、9: ヒオウギ、10: アズマニシキ、11: ホタテガイ、12: マガキ、13: アカガイ、14: アサリ、15: トリガイ、16: ウバガイ、17: トコブシ、18: アカネアワビ、19: ミミガイ、20: クロアワビ、21: サザエ。コンセンサスと考えられる残基に影をつけて示す。

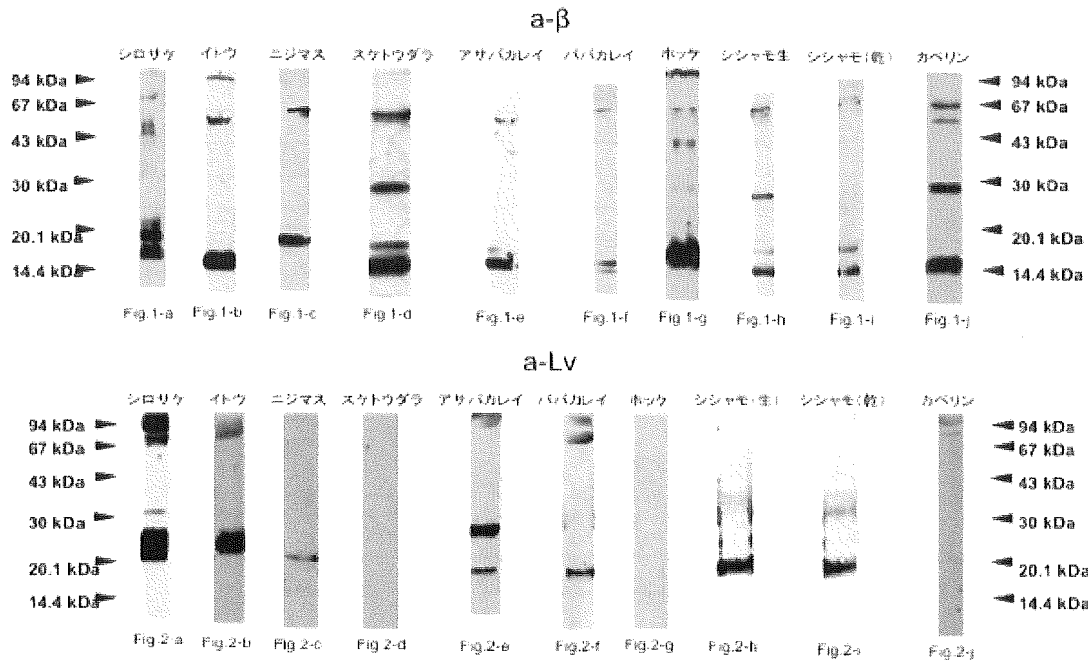


図5 シロザケ a-β と a-Lv の各種魚卵抽出物に対する反応性（ウエスタンブロッティング）。

表2 患者血清の各魚種卵抽出物に対する反応性

患者血清	魚種									
	シロサケ	イトウ	ニジマス	スケトウダラ	アサバカレイ	ババカレイ	ホッケ	シシヤモ(生)	シシヤモ(乾)	カベリン
113	○	○	○	×	○		○			○
141	○	○	○	×	×	×		×	×	○
161	○	○	○	○	○		○			○
162	○	○	○	○						
164	○	○	○	×	○	○				
166	○	○	○	○						
168	○	○	○	○						
183	○	○	○	○	○		○			○
187	○	○	○	○	○	○				
188	○	○	○	○						
191	○	○	○	×	○	○		○	○	×
192	○	○	○	×	○	○		○	○	×
195	○	○	○	○						
197	○	○	○	○						
198	○	○	○	○	○	○		○	○	○
200	○	○	○	×	○	○	○	○	×	×
201	○	○	○	○	○	○	○			

表3 甲殻類エキスのサンドイッチ ELISA による測定結果および患者血清との反応性

原料	製法	ELISA 測定結果		患者血清との反応性
		日本水産 日水製薬	マルハグループ	
エビ	熱水抽出	++	++	+
	熱水抽出	++	++	++
カニ	解凍ドリップ	++	++	++
	熱水抽出	++	++	++
	パンパイン分解	±	-	-
	アルカラーゼ分解	++	++	++
	プロテアーゼ分解	+	+	+
オキアミ	プロテアーゼ分解	-	-	-

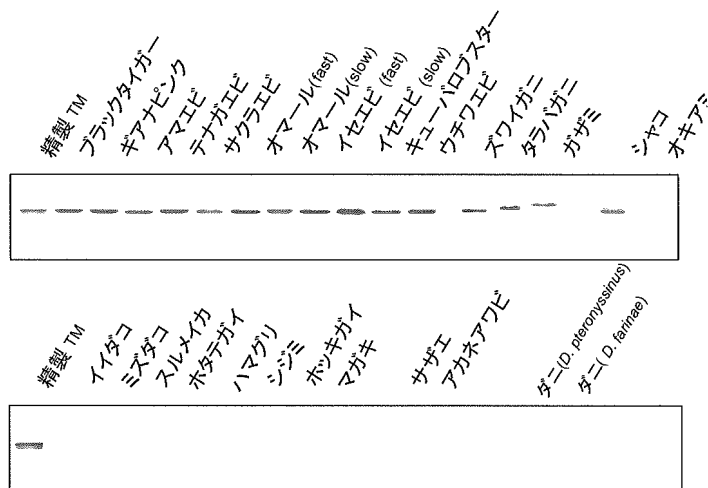


図6 各種動物筋組織抽出液を用いたウエスタンブロット分析 (モノクローナル抗体の例を示す)

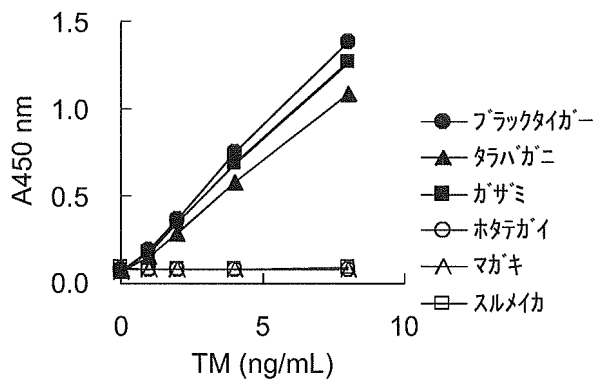


図7 サンドイッチ ELISA 測定系の特異性

表4 各モデル加工食品での回収率および希釈直線性

モデル加工食品	抗原添加量	回収率(%)	回帰係数(r^2)
魚肉ソーセージ	50 ppm	76.1	0.988
	10 ppm	82.3	0.995
フリーズドライ卵スープ	50 ppm	91.7	0.999
	10 ppm	60.2	0.998
クリームコロッケ	50 ppm	211.5	0.996
	10 ppm	77.3	0.999
シュウマイ	50 ppm	114.8	0.989
	10 ppm	125.4	0.998
トマトソース	50 ppm	70.5	0.998
	10 ppm	35.4	0.998

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

果実類の検出法開発に関する研究

分担研究者 松田 りえ子 (国立医薬品食品衛生研究所食品部)
協力研究者 秋元政信 (プリマハム株式会社基礎研究所)
平尾宜司、渡辺聡、正野仁慈、田口大夢(ハウス食品株式会社)
森山達哉 (近畿大学農学部)
穂山浩, 吉岡靖雄 (国立医薬品食品衛生研究所食品部)

研究要旨 特定原材料に順ずる 20 品目の一つであるキウイの確定試験法として、[1] キウイアクチニジンに対する ELISA 系の構築、[2]PCR によるキウイの検知法、を検討した。[1] キウイ検知のための指標たんぱく質として主要アレルゲンであるアクチニジンを選択した。市販キウイよりアクチニジンを精製し BALB/c マウスに免疫し、8 種類のモノクローナル抗体を得た。それらの組み合わせを検討することで、サンドイッチ ELISA によりアクチニジンを感度良く検出可能となった。さらに、簡易測定法としてイムノクロマトキットを構築し、キウイ総たんぱく質で 1ppb まで検出できることを確認した。しかし、各種食品に対する交差性を調べたところ、コーヒー豆、ブラックペッパーに交差性を示した。[2] マタタビ属の植物ならびにその近縁植物、各種果物の遺伝子配列を解析して、2 組の検知用プライマーを設計した。PCR を行ない、特異性と感度を検討した結果、各々それぞれで検知範囲として設定したキウイ類を検知する特異性を有しているものと判断された。また、キウイ等の DNA 濃度として 10~1 ppm 相当量の DNA を検出可能であり、PCR で期待できるほぼ最高レベルの感度が得られたものと考えられた。

A. 研究目的

表示が推奨されている 20 品目に含まれる果実類の中から、キウイの検出方法の開発を目的とする。

B. 研究方法

[1] キウイアクチニジンに対する ELISA 系の構築

(a) モノクローナル抗体の作製:キウイ検知のための指標蛋白質として主要アレルゲンであるアクチニジンを選択した。キウイ粉碎後、リン酸緩衝液で抽出し、陰イオンカラムで分画後、ゲルろ過カラムにより精製した。供試動物として、6週齢の BALB/c マウス 5 尾を用いた。初回免疫の後、2 週間の間隔で 3 回追加免疫を行った。最もアクチニジンに対する抗体価が上がった個体に対して、尾部静脈よりアクチニジンの追加免疫を行なった。静脈注射より 4 日後にモノクローナル抗体の

作製を行なった。無菌的に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製後、ミエローマ細胞 (P3X63Ag8.653) と融合し、限界希釈法によりクローニングを行ない抗アクチニジン抗体産生ハイブリドーマを作製した。

(b) サンドイッチ ELISA によるモノクローナル抗体の組合わせの検討:マウス腹水法により抗アクチニジンモノクローナル抗体を得た後、Protein G カラムで精製し、ビオチン標識を行なった。ビオチン標識抗体を二次抗体としたサンドイッチ ELISA によりモノクローナル抗体の組み合わせを選択した。

(c) 各食品への交差性の確認:選択したモノクローナル抗体の組み合わせについて市販食品 24 種類を用いて交差性を評価した。

(d) 抽出後のアクチニジンの安定性評価:抽出

後の保管温度・時間によるアクチニジンの検出率の変化を調べるため、キウイよりPBSで粗たんぱく質画分を抽出し、4、25、37°Cにそれぞれ6、12、24、48時間保管し、抽出直後のアクチニジンを100%とした時の検出率の変化を検証した。

(e) イムノクロマト法の検討: 選択したモノクローナル抗体の組み合わせについて、一方を金コロイド標識、もう一方をメンブレン固定化抗体としてイムノクロマトキットを作製し、検出感度を検討した。

[2] キウイのPCR検知法の開発

マタタビ属の植物(キウイ、サルナシ、キウイとサルナシとの交配種、マタタビ)ならびにその近縁植物、各種果物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、検知用プライマーを設計した。プライマーは二組設計し、一組目は「キウイ、サルナシ、交配種、マタタビ」(食用として流通しているマタタビ属植物全て)を検知するもの、二組目はそこからマタタビを除いた「キウイ、サルナシ、交配種」を検知するものとした。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、植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。

C. 研究結果

[1] キウイアクチニジンに対するELISA系の構築

(a) モノクローナル抗体の作製: 8株の抗アクチニジンモノクローナル抗体を得た。

(b) サンドイッチELISAによるモノクローナル抗体の組み合わせの検討: 8株すべてについて腹水が採取できていないため、腹水が採取できたものの組み合わせについて検討したところ、アクチニジンを検出できる3通りの組み合わせを得た。その中から最も感度の高いモノクローナル抗体の

組み合わせを選択した。

(c) 各食品への交差性の確認: 選択した組み合わせでは、市販食品24種類のうち、コーヒー豆(4.0 µg/g)、ブラックペッパー(2.3 µg/g)に対して交差性を示した。

(d) 抽出後のアクチニジンの安定性評価: 抽出48時間後までのアクチニジンの安定性を検討した結果、4°C保管では95%、25°C保管で90%、37°C保管で72%の検出率になった。

(e) イムノクロマト法の検討: 今回作製したイムノクロマトキットでは、キウイ総たんぱく質で1ppbまで検出できることを確認した。また、ELISAの結果と同様、コーヒー豆、ブラックペッパーでわずかに陽性判定となった。

[2] キウイのPCR検知法の開発

一組目のプライマーでは、「キウイ、サルナシ、交配種、マタタビ」から標的とした74bpのPCR産物が得られた。一方、これら以外の22種の果物、4種の穀物からは、標的サイズのPCR産物は得られなかった。検知限界は、キウイ等のDNA量として50fg(鋳型DNA 50ngで検査した場合に1ppm(w/w)相当量)であった。また、シークエンス解析により、同プライマーはキウイの標的配列を増幅していることを確認した。

二組目のプライマーでは、「キウイ、サルナシ、交配種」から標的とした92bpのPCR産物が得られた。一方、マタタビ、他の果物、穀物からは、標的サイズのPCR産物は得られなかった。検知限界は、キウイ等のDNA量として500fg(鋳型DNA 50ngで検査した場合に10ppm(w/w)相当量)であった。

なお、PCR増幅予測ソフトウェアでの解析結果から、マタタビ属以外の近縁種や、その他植物からは、何れのプライマーともに、標的サイズの増幅産物は得られないと予測された。

D. 考察

[1] キウイアクチニジンに対するELISA系の構築
今回得られたモノクローナル抗体の組み合わせにより、未変性アクチニジンの検出はELISAでもイムノクロマトキットでも可能となった。しかし、コーヒー豆、ブラックペッパーにわずかに交差性を示したことから、さらに、組み合わせを詳細に検討し、より交差性の低い組み合わせを選択していく必要がある。

キウイから抽出後のアクチニジンの免疫学的な安定性について調べたところ、4℃保管であれば48時間後でも95%の検出率を保っていることが明らかとなった。今後、新たなモノクローナル抗体の組み合わせを検討する場合にも、アクチニジンの検出率の変化を確認しながら選択していく必要性が考えられる。

また、今回得られたモノクローナル抗体は未変性アクチニジンに対する反応性は高いが、尿素で変性処理したアクチニジンに対する反応性は低いものであった。このことから、加工工程中の未加熱アクチニジン検出には有効な抗体であると考えられ、イムノクロマトキットでも、ELISAと同等の検出感度を示した。しかし、加工食品から蛋白質変性剤により抽出されたアクチニジンの検出は困難と考えられることから、現在、加工食品中からの検出のために、変性アクチニジンを認識可能なモノクローナル抗体を作製中である。

[2] キウイのPCR検知法の開発

今回作製した二組のプライマーは、それぞれで検知範囲として設定したキウイ類を検知する特異性を有しているものと判断された。また、キウイ等のDNA濃度として10~1 ppm相当量のDNAを検知可能であり、PCRで期待できるほぼ最高レベルの感度が得られたものと考えられた。

E. 結論

[1] キウイアクチニジンに対するELISA系の構築

未変性アクチニジンを検出するためのモノクローナル抗体8株を作製し、アクチニジンを検出可能な組み合わせが得られ、サンドイッチELISA系を構築することができた。さらに、サンドイッチELISAだけでなく、加工工程中で簡易にアクチニジンを検出可能なイムノクロマトキットも構築することができた。しかし、得られた組み合わせでは、コーヒー豆、ブラックペッパーに交差性を示した。また、キウイから抽出後のアクチニジンは4℃保管であれば、48時間後でも5%程度の検出率の低下を示しただけであった。

今後は加工過程で変性したアクチニジンを認識できる抗体を作成すると共に、標準品を作成することも課題である。

[2] キウイのPCR検知法の開発

特定原材料に順ずる20品目の一つであるキウイ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、市販食品の分析や、実際の食品を想定した既知濃度のキウイ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、併せて、果物果肉や加工品からのDNA抽出法の検討も必要となる。

F. 研究発表

論文発表

1. Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Aburatani K, Watanabe Y, Matsumoto T, Morishita N, H.Sato, Mishima T, Gamo R, Kihira Y, Maitani T, Interlaboratory evaluation of two kinds of ELISA kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods, JAOAC, in press

学会発表

1. 油谷賢一, 渡邊由美子, 渡邊恵理子, 本庄

勉, 橋爪秀一, 渡邊敬浩, 穂山浩, 松田りえ子, 米谷民雄, 佐藤秀隆, 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, 第 89 回日本食品衛生学会学術講演会

2. R.Matsuda, Y.Yoshioka, H.Akiyama, T.Maitani, R.Gamo, Y.Kihira, T.Honjoh, Y.Takahata, Y.Sato, Preparation and specification of the calibration standards for the test kits for 5 aller-genic foods, 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA)

3. H.Akiyama, R.Matsuda, T.Maitani, Issues and challenges of Japan NIHS validation protocols. 119th AOAC Annual meeting and exposition (USA)

4. 吉岡靖雄、穂山浩、庄司俊彦、滝田聖親、神田智正、松田りえ子、米谷民雄; プロシアニジンによる大腸炎発症予防効果とその作用メカニズムに関する検討; 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005 年 10 月

5. 中野真孝、吉岡靖雄、穂山浩、庄司俊彦、神田智正、松田りえ子、滝田聖親、米谷民雄; リンゴ由来プロシアニジンによる大腸炎発症予防効果に関する検討; 第 49 回日本薬学会関東支部、東京、2005 年 10 月

G. 知的財産権の登録

特になし

H. 参考文献

特になし

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

食肉中に含まれるアレルギー物質の検査法開発研究

分担研究者 田辺創一 (広島大学大学院生物圏科学研究科)
協力研究者 成田宏史 (京都女子大学家政学部)
本庄勉 (株式会社森永生科学研究所)
松本貴之、藤村達也 (日本ハム株式会社中央研究所)
佐藤雅彦 (伊藤ハム株式会社中央研究所)
琴浦聡 (丸大食品株式会社中央研究所)

研究要旨: 食品に含まれる食肉蛋白質を検出するために必要な特異的抗体を得るために、免疫原(ターゲット蛋白質)を選択することとした。加熱耐性などの条件検討を行った結果、鶏肉では32kDa蛋白質(おそらくトロポニンT)を、豚肉ではアルブミン(あるいは豚肉混合蛋白質)を、牛肉ではミオグロビンを選択し、抗体作製を行った。今後得られるポリクローナル・モノクローナル抗体や抗ペプチド抗体を適宜組み合わせることによって、特異的な測定系を構築できるものと考えられた。なお、鶏肉・豚肉・牛肉エキスに残存する蛋白質の検討を行ったが、かなり分解を受けていることが明らかとなり、エキス中からの検出は困難であると予想された。ゼラチンの場合には、部分配列ペプチドあるいはウシゼラチンを免疫して得られた抗体について性質解明を行った。抗ペプチド抗体は、ブタおよびウシゼラチンに対してはよく反応したが、サカナに対する反応は極めて低かった。抗ウシゼラチン抗体を用いて、ゼラチン含有食品の検出が可能であることが確認されたが、加熱肉とも反応したことが課題として挙げられた。また、鶏肉および豚肉に含まれるDNAを検出するためのプライマー対を設計し、PCR産物が良好に得られることを確認した。特に鶏肉用プライマーの特異性は高く、鶉、鴨、七面鳥との識別が可能であった。

A. 研究目的

食品中に含まれるアレルギー物質について、特定の蛋白質や核酸成分をターゲットとし、ELISA法などにより定性、定量的に検証できる科学的検知法を開発することを

目的とする。本研究では、食肉類、即ち、鶏肉、豚肉、牛肉、ゼラチンに関して検知法を確立するためのターゲット蛋白質の選択と抗体作製および遺伝子増幅法(PCR法)についての基礎的検討を行った。

B. 研究方法

以下に、免疫学的手法についてPCR法の順、また、それぞれの方法について鶏肉、豚肉、牛肉(免疫学的手法のみ)、ゼラチン(免疫学的手法のみ)の順にて記載した。

鶏肉加熱サンプルの電気泳動

鶏肉をミルサーで細かく刻み、60, 80, 100, 105,

110, 115, あるいは120℃で30分間、および100℃で5, 10, 20, 30および60分間加熱処理した。それぞれのサンプルから上清を採取し、SDS-PAGEを行った。

特異的バンドの回収

120℃で30分間加熱処理した鶏肉抽出物を凍結乾燥した。SDS-PAGEを行い、サイズごとの分画を回収した。各分画をSDS-PAGEし、約32kDaに相当する部分を回収した。

加熱による豚肉蛋白質の抽出

豚肉の赤身部分を細切し、ポリ袋に真空パックし、40-120℃で30分加熱した。これに9倍量のPBSまたは、0.5%SDS・2%メルカプトエタノール(ME)を含むPBS(以後、SDS-ME-PBSと記す)の2種類の抽出液を加えて蛋白質を抽出し、SDS-PAGEとWestern Blotによって蛋白質の抽出性を調べた。

ポークエキスに含まれる蛋白質の検討

ポークエキス製造メーカー2社に依頼し、豚肉や豚骨から抽出・濃縮したエキスと、豚肉をプロテアーゼで分解したエキスを入手して、SDS-PAGE と Western Blot によって含まれる蛋白質を調べた。

豚肉蛋白質に対するポリクローナル抗体の作製と ELISA

ブタの精製蛋白質の市販品から IgG・血清アルブミン・トロポミオシンの3種類を購入し、未変性の状態でアジュバントとともに、ウサギに繰り返し免疫した。血清を採取し、イムブロット法で抗体力価を検定した。また、抗原結合ゲルで特異抗体を精製して ELISA 用の1次抗体を調製し、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ（以後 HRP と記す）と結合して2次抗体を調製した。これらの抗体を用いて、ELISA の基礎検討を行った。また、豚肉から1%SDS・0.1%メルカプトエタノールを含む PBS で抽出した混合蛋白質についてもウサギに免疫した。

ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体の作製

市販ウシミオグロビン (Life Diagnostics, Inc 製 0.49mg/ml) を抗原としてマウスに免疫した。また、ミオグロビンのアミノ酸配列の中で、ウシ特異的な配列を選択し、そのアミノ酸配列を基に合成したペプチドを抗原としてマウスに免疫した。

ウシミオグロビンの精製

ウシ心臓からミオグロビンの精製を行った。ウシ心臓から脂肪を取り除き、ミンチにして十分に混合した。10g を量りとり、等量の蒸留水を加えてよく混合し、30分間室温で振とうした。4500×g、15分間遠心した後、上清をろ過し、ろ液を肉抽出液とした。肉抽出液にエタノールを濃度が70%となるように加え、30分間室温で攪拌した。2500×g、15分間遠心した後、上清をろ過し、ろ液にエタノールを濃度が90%となるように加え、30分間室温で攪拌した。2500×g、15分間遠心した後、上清を取り除き、沈殿に蒸留水を添加して溶解し、これを粗ミオグロビン画分とした。

ゼラチンおよび部分ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製と ELISA

ゼラチンの部分配列を基にした合成ペプチドおよびブタあるいはウシゼラチンを、定法に従いウサギ

に免疫した。得られたポリクローナル抗体を用いて ELISA 系を開発した。

鶏肉検出用プライマーの設計

鶏ミトコンドリア 16S リボゾーム RNA 領域から 100, 200 および 300bp の DNA 断片を増幅することが出来るプライマーをそれぞれ設計した

鶏肉サンプルの処理・DNA 抽出

鶏肉（市販ブロイラー、名古屋コーチン、東京軍鶏および比内地鶏）、鶉肉、鴨肉、七面鳥肉、牛肉、羊肉、豚肉からそれぞれ DNA を抽出した。即ち、鶏肉を 100°C で 30 分、4 時間、および 8 時間加熱処理し、脂肪分を極力除去した後に、ミルサーにかけてミンチ状にした。サンプルをそれぞれ 100mg ずつ採取し、ホモジナイザーで破碎した。Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) を用いて DNA 抽出を行った。

鶏肉 DNA 検出のための PCR 反応

PCR 反応は Ex Taq HS kit (Takara) を用いて行った。反応液として、添付バッファーに dNTP 溶液 (0.2mM each)、センスプライマー (0.4 μM)、アンチセンスプライマー (0.4 μM)、Ex Taq HS (0.75U) に適量の鋳型 DNA を加えたものを使用した。反応条件は、98°C で 3 分熱処理した後、98°C で 30 秒、69°C (場合によっては 71°C) で 30 秒、72°C で 30 秒を 38 サイクル繰り返し、72°C で 7 分間処理したものを使用した。

豚肉 DNA 検出のための PCR 反応

豚のシトクロム b の DNA に着目し、22-23mer のプライマーを Forward、Reverse 各 3 本ずつ選択した。シトクロム b が含まれている豚ミトコンドリア DNA を Template としてプライマーの 9 種類の組合せで PCR を行った。

C. 研究結果

以下に、免疫学的手法について PCR 法の順、また、それぞれの方法について鶏肉、豚肉、牛肉（免疫学的手法のみ）、ゼラチン（免疫学的手法のみ）の順にて記載した。

鶏肉加熱サンプルからの免疫原の調製

加熱温度を変えた処理では、温度を高くするに伴いバンドが消失する頻度が高くなった。120°C、30 分処理が最も分解が進行した条件であったが、この条件においてもほとんど分解しないバンドがいくつか

見られた(図1)。これらを分子量と含有量から推測すると、アクチン、トロポミオシン、トロポニンT、トロポニンI等が相当した。これらの蛋白質のアミノ酸配列を牛、豚等と相同性検索したところ、トロポニンTが比較的相同性が低かった。そこで、加熱鶏肉抽出物から約32kDaのSDS-PAGE分画を回収した。

加熱による豚肉蛋白質の抽出

PBSで抽出すると豚肉を40-60°Cで加熱したときは、SDS-PAGEで蛋白質の明瞭なバンドが検出できたが、70°C以上では蛋白質の抽出性が低下した。SDS-ME-PBSの抽出では、100°C以下の加熱では蛋白質のバンドが検出できた。PBS抽出のWestern Blotでは抗豚全血清で免疫染色したところ、70°Cまではアルブミンと見られるバンドが検出できたが、それ以上では検出できなくなった。SDS-ME-PBS抽出のWestern Blotでは、100°Cまではアルブミンと見られるバンドが検出できた。

ポークエキスに含まれる蛋白質の検出

豚肉と豚骨から抽出して濃縮したポークエキス(製造条件の異なる5種類)のSDS-PAGEの結果は、特定の蛋白質のバンドが出現せず、高分子量から低分子量までブロードにつながったパターンとなった。また、Western Blot(抗豚全血清で染色)の結果はエキスの種類によっては、100kD付近にバンドが出現するものもあるが、ほとんどバンドの出ないものもあった(図2)。

豚肉を分解して製造したポークエキス(同じ製法の3ロット)のSDS-PAGEについては分解によって低分子化しており、ブロードなバンドになった。またWestern Blot(抗豚全血清で染色)では、まったくバンドが出現しなかった。

豚肉蛋白質に対するポリクローナル抗体の作製

ブタIgGとアルブミンについてはウサギに免疫して、高い力価の抗体が産生された。この抗血清から特異抗体を精製し、HRPと結合してSandwich ELISA用の抗体ができた。マイクロプレートに200-400ng/mLの特異抗体を入れて固相化し、IgGあるいはアルブミンの0-50ng/mLの未変性の蛋白質標準液を入れて結合し、これに酵素標識抗体を加えてELISAを行うと、感度良く測定できた。しかし、豚肉からSDS-ME-PBSで抽出した蛋白質は、この測定系では反応が微弱であった。

トロポミオシンを免疫したウサギの抗体価はほとんど上昇が認められなかった。豚肉混合蛋白質については、途中経過であるが抗体価の上昇が確認された。

ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体の作製

アクチンなどの筋原線維蛋白質のアミノ酸配列は他種との相同性が高いので、これらを基にして抗体を作製すると、他種にわたり交差性が生じると考えられた。そこで、ウシの蛋白質の中で他種とのアミノ酸配列相同性の低いものについて調査・検討した結果、ミオグロビンを選択した(表1)。さらに特異性を高めるために、ミオグロビンの中でウシに特異的な配列を選択し、この部分について合成ペプチドを作製して免疫することにした。ミオグロビン全体と合成ペプチドを常法に従い免疫した。

ウシミオグロビンの精製

抗体スクリーニングに用いるための高純度ミオグロビンを得る目的でウシ心筋から精製を行った。得られたミオグロビンをSDS-PAGE像に供した結果、一連の抽出・精製操作によって、かなりの純度まで精製されたことが明らかとなった。

ゼラチンおよび部分ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製とELISA

合成ペプチドを免疫して得られた抗体を用いて0.78ng/mlから50ng/mlの間で測定可能なELISA系を開発した。しかし、ゼラチンの種類により大きく反応性が異なり、サカナゼラチンを殆ど認識しなかった(表2)。

ブタゼラチンを免疫して得られた抗体を用いた場合にも0.78ng/mlから50ng/mlの間で測定可能なELISA系が開発された。しかし、合成ペプチドの系と同様にゼラチンの種類により大きく反応性が異なり、酸処理したブタゼラチンに対する反応は高かったものの、アルカリ処理したブタゼラチンおよびウシあるいはサカナゼラチンへの反応性は低かった。

ウシゼラチンを免疫して得られた抗体を用いた場合、0.78ng/mlから50ng/mlの間で測定が可能であったのみならず、合成ペプチドの系、ブタゼラチンの系とは異なり、ほぼ一様にどのゼラチンとも高い反応性を示した。この系を用いてゼラチン含有の食品類を測定したところ、程度の差はあるが、すべて

検出できた (図 3)。一方、本抗体は肉類とも反応性を示した。とくに加熱した食品では、常温で抽出したものより明らかに高い反応性を示した (表 3)。

PCR 法による鶏肉 DNA の検出

4 種類の鶏、鶉、鴨、七面鳥、羊、牛、豚の鋳型 DNA をそれぞれ 50ng 用いて、交差性の確認を行った。その結果、使用した 3 種類のプライマーすべてにおいて 4 種類の鶏 DNA には反応したが、それ以外の検体には反応しなかった (図 4)。また、3 種類のプライマーとも 5pg の鶏 DNA まで検出が可能であった。次に、鶏肉を 100°C で 30 分、4 時間、8 時間処理ものを鋳型 DNA として用い、それぞれを 500pg および 50pg 分使用して検出を試みた。その結果、増幅サイズが 300bp のプライマーを用いた場合は、100°C、30 分処理の検体は検出が可能であったが、4hr 処理、8hr 処理した検体からは検出が出来なかった。一方、増幅サイズが 100bp のプライマーを用いた場合はすべての加熱処理した検体において検出が可能であった。

PCR 法による豚肉 DNA の検出

Forward プライマーを 3 本 (F1、F2、F3) と Reverse プライマーを 3 本 (R1、R2、R3) 作成し、これらの組合せで、豚のミトコンドリア DNA を Template にして PCR を実施した。増幅された DNA 断片のアガロースゲル電気泳動の結果を図 5 に示した。その結果、プライマー対 9 通り全てにおいて、それぞれの産物のバンドが出現していた。この中で 100-150bp のサイズの増幅産物が得られるのは F1-R1、F2-R1、F3-R2 の組合せであった。

D. 考察

免疫学的手法を用いて食肉類の存在を検出するためには、特異的検出が可能なモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体が必要であり、そのためには第一段階として、ターゲットとなる蛋白質を選択することが必須である。ターゲット蛋白質の条件としては、加熱などの食品加工を経ても安定度の高いもの、および、構造の違いが畜種間でより大きいものの 2 つが主として挙げられる。また、検出感度を考慮すると、食肉中の含量が多い方が好ましい。なお、本検出系は当該食品および蛋白質の検出を試みるものであり、必ずしもアレルゲンを検出することが目的ではないことから、ターゲット蛋白質の条

件としてアレルゲンである必要はないと判断した。このような考えのもと、今年度は加熱処理を施した食肉における蛋白質の存在状態を解析するとともに、主要な食肉蛋白質の各畜種のアミノ酸配列を比較した。

鶏肉を加熱変性しても残存している比較的含量的多い成分として、約 32kDa の蛋白質 (おそらくトロポニン T) に着目した (図 1)。トロポニン T は牛や豚との相同性が比較的低い蛋白質であるため、鶏特異的な抗原として利用可能であると判断した。32kDa の画分の精製を行い、これに対する抗体を作製中である。

豚肉蛋白質の場合、動物種が異なってもアミノ酸配列が近いものが多いが、IgG とアルブミンをウサギに免疫すると抗体が得られた。しかし、トロポミオシンは抗体が非常にできにくかった。これは豚とウサギでトロポミオシンのアミノ酸配列が非常に似ていて、ウサギの免疫系が反応しないためであろうと推察された。また、未変性の蛋白質を免疫原として作製した抗体は未変性蛋白質を ELISA で検知したが、SDS と ME で処理した蛋白質は検知できなかった。未変性の IgG やアルブミンで作成した抗体は、変性した蛋白質とは結合しにくいことが判明した。今後、変性処理した蛋白質で免疫する必要があると考えられた。なお、豚肉から抽出した混合蛋白質を免疫したところ、抗体ができそうな見通しである。今後十分な抗体価になったら、ELISA 系を組んで検討する予定である。

牛肉では、検出するためのターゲット蛋白質として、ミオグロビンを選択した。ミオグロビンは多くの筋原線維蛋白質と異なり、畜種によってアミノ酸配列がやや異なる (表 1)。また、ウシの場合、肉 1g あたり 4~10mg で存在するので、量的な問題もないと考えられる。ハムやソーセージなどの食肉製品の独特の色調は、ミオグロビンが大きく関係している。そのため、食肉製品には変性状態ではあるがミオグロビンが必ず存在している。動物に免疫する段階で変性状態のミオグロビンを抗原として免疫するか、スクリーニングの段階で、変性ミオグロビンに反応するかを確認しながら作業を進めて行く必要がある。また、現在は 2 つの性格のモノクローナル抗体を作製中だが、ポリクローナル抗体も作製すれば、

いくつかのサンドイッチ ELISA を構築できると考えられる。現在、ポリクローナル抗体の作製も検討している。また、現在合成ペプチドは1種類だが、食品加工後のミオグロビンの状態が未知であるため、さらにもう1種類の合成ペプチドでの免疫化も検討している。

なお、抗体をスクリーニングする段階では、純度の高いウシミオグロビンが多量に必要である。しかし、市販試薬は純度が高いが濃度が薄く、また高価であるので、多量に用いるには不適である。そこで、ウシ心臓から調製した肉抽出液からエタノールを用いて精製した。その結果、ある程度選択的にミオグロビンを精製することができた。さらに各種クロマトグラフィーを組み合わせて、今後、純度の高いミオグロビンを多量に得る予定である。

ブタおよびウシゼラチンをウサギに免疫して得られた抗体の反応性を比較したところ、ウシゼラチンの方が優れていると判断された。そこで、この系を用いてゼラチン含有の食品類を測定したところ、良好な結果を得た(図3)。一方、本抗体は肉類とも反応性を示した(表3)。生の肉とはほとんど反応性を示さないが、加熱すると反応性が増大した。これは、加熱することにより、コラーゲン繊維が壊れ一部ゼラチンとなるためではないかと思われる。今後、肉類との交差反応性がどこまで許容されるのかにより、開発の方向性が異なってくると思われる。

ゼラチンの部分配列をもとに合成したペプチドを免疫して得られた抗体は、サカナゼラチンと殆ど反応しないことが明らかとなった(図3)。この性質は、サカナゼラチンとブタおよびウシゼラチンとを分けて測定するような目的には有用であると考えられた。

PCR 法による食肉類の特異的検出を試みるために、今年度は鶏肉および豚肉検出用プライマーを設計し、それぞれの DNA を検出することが可能であるか等の基礎的検討を行った。

鶏肉の場合、増幅サイズが約 100bp で、鶏を特異的に識別するプライマーを得た。今のところ検出感度が 5pg/50ng (100ppm) とあまり良くないが、反応条件や DNA 抽出条件を改良することで向上させることは可能と考えられる。今後は、簡単なモデル加工を行って検出を試みることにする。豚肉の場合も、シトクロム b の DNA に含まれる塩基配列から豚肉を

検出できそうなプライマーの組合せを設計できた。ミトコンドリア DNA は細胞中のコピー数が核の DNA より多いので、検出しやすいと考えられる。動物種間で識別できるかどうか、あるいは他の食品に含まれる DNA を検出する可能性がないか、今後検討していくことが必要である。牛肉については次年度検討することとした。なお、ゼラチンの場合は原料が高度に加工されており、DNA の検出が極めて困難であることが一般的に知られているので、本研究では今のところ対象外とし、免疫学的手法にしばって検討する予定である。

E. 結論

食品に含まれる食肉蛋白質を検出するためのターゲット蛋白質として、鶏肉では 32kDa 蛋白質(おそらくトロポニン T)を、豚肉ではアルブミン(あるいは豚肉混合蛋白質)を、牛肉ではミオグロビンを選択し、抗体作製を行った。今後、得られた抗体の感度や特異性について検討する必要がある。ゼラチンの場合には、部分配列ペプチドあるいはウシゼラチンを免疫して得られた抗体について性質解明を行った。ゼラチン含有食品の検出が可能であったが、加熱肉とも反応したことが課題として挙げられた。なお、鶏肉・豚肉・牛肉エキスに残存する蛋白質の検討を行ったが、かなり分解を受けていることが明らかとなり、エキス中からの検出は困難であると予想された。

平行して、鶏肉および豚肉に含まれる DNA を検出するためのプライマーを設計し、PCR 産物が良好に得られることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 書籍

1) **Tanabe S.** and Nishimura T., Meat allergy, in "Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease", Eds. Shahidi F. and Mine Y., Marcel Dekker (New York), p.p. 481-491 (2005).

2. 学会発表

1) **Tanabe S.**, Nakaguma Y. Takahata Y., Morimatsu F., and Nishimura T., Phosphoglucomutase as a novel major meat allergen, **51st International Congress of Meat Science and Technology** (Baltimore), Abstract p. 92.,

August 7-12, 2005.

H. 知的財産権の登録

番号：特願2006-45187

発明の名称：試料中の鶏由来成分の検出方法