

- 3) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Toyoda M, Urisu A. Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; ;71(10):2561-2564.
- 4) Yano T, Sakai Y, Uchida K, Nakao Y, Ishihata K, Nakano S, Yamada T, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Maitani T. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71:1793-1796.
- 5) Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. *Allergol Int.* 2007 ;56:149-155.
- 6) Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T. Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem.* 2007;55:1649-1655.
- 7) 宇理須厚雄；食物アレルギーの治療アレルギー，2007；56：541-548.
- 8) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Moriyama T, Urisu A, Maitani TA Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007; 71,269-272.
- 9) 山田一恵、宇理須厚雄、低アレルギー化食品の選び方と使い方、小児内科、2007;39,613-617.
- 10) 柘植郁哉、宇理須厚雄、食物アレルギー、総合臨床、56,1915-1920,2007.

2. 学会発表

- 1) 川田康介、小松原亮、平田典子、各務美智子、宇理須厚雄、中島陽一、湯川牧子、近藤康人、柘植郁哉、食物経口負荷試験における負荷開始量の設定と意義、第8回、食物アレルギー研究会、東京、平成20年、2月2日、

近藤康人、小松原亮、中島陽一、平田典子、加藤牧子、各務美智子、川田康介、柘植郁哉、宇理須厚雄、アレルギー分析と臨床応用、第44回、日本小児アレルギー学会、名古屋、平成19年、平成19年12月8日、9日、

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図1-1 ELISA-inhibition

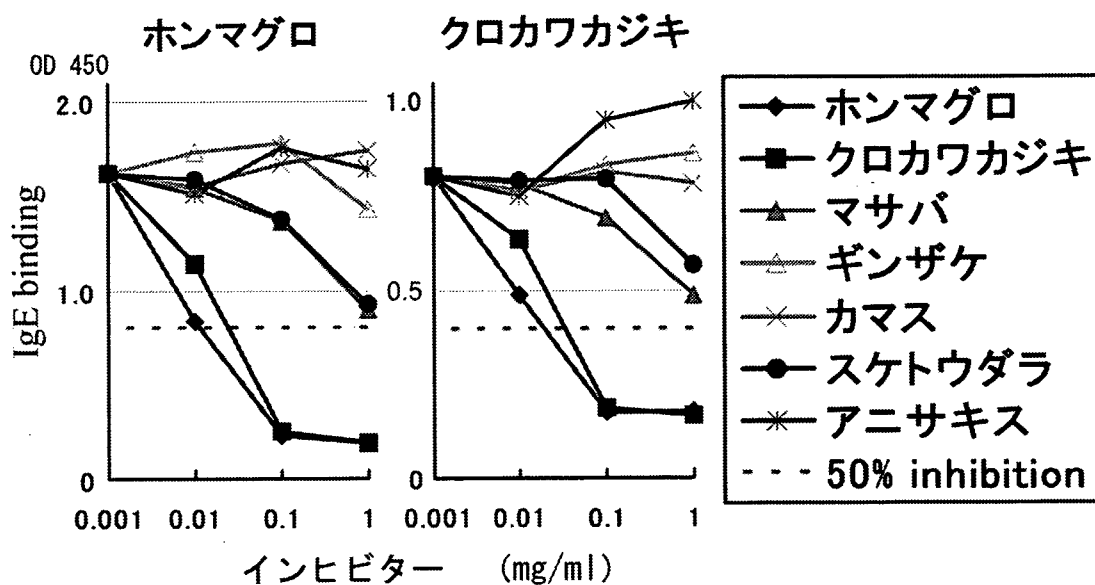
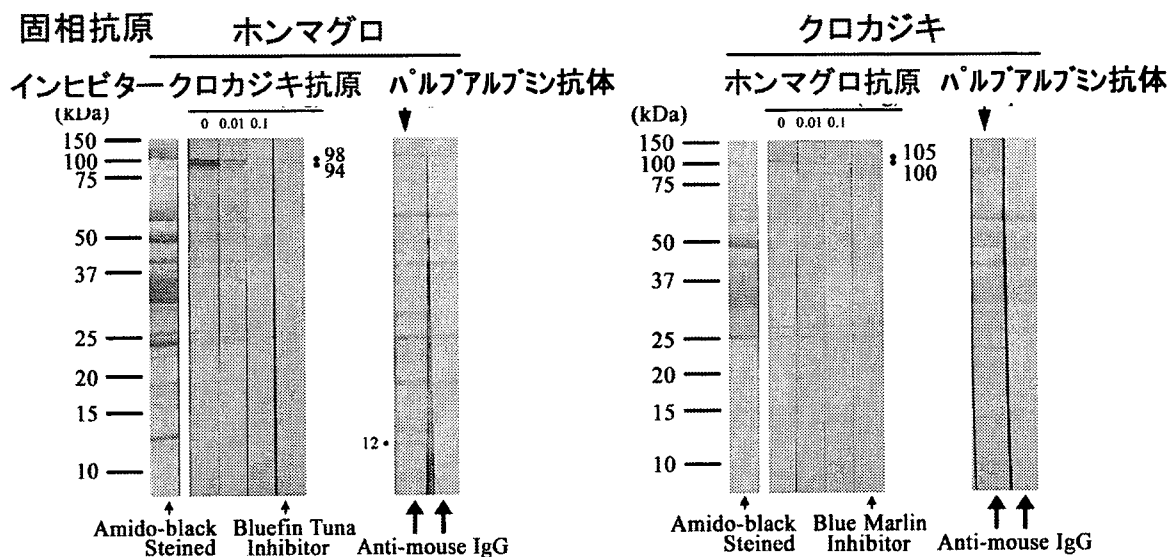


図1 ホンマグロとクロカワカジキとの ELISA inhibition
ホンマグロとクロカワカジキは互いに IgE 結合を 50%以上抑制した

図1-2 Immunoblot inhibition



J Allergy Clin Immunol (2006) 改変

ホンマグロの94kDaの蛋白を切り出して、アミノ酸N末端のシーケンスを調べたところ
APAEKVRXXVKSDQELであり、これはトランスフェリンのアミノ酸と87.5%一致していた

表2-1: アレルギー物質食品表示に関するアンケート

アンケートご協力のお願ひ 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
責任者: 宇理須厚雄、平田典子
医局電話: 052-323-5649
〒454-5649 名古屋市中川区尾頭橋3-6-10

記入日: H 年 月 日
性別・年齢: 男・女 (才)

職業: 複数選択可
医師(内科、小児科、外科、皮膚科、形成外科、耳鼻科、眼科、整形外科、泌尿器科、脳外科、放射線:
産婦人科、精神科、麻酔科、リハビリ科、その他)
看護師、薬剤師、保健師、栄養士、保育士、教師(小学校、中学校、高校、大学、その他)、調理師、
会社員、学生、無職、その他()
母親、父親、祖父、祖母、その他()

あなたは食物アレルギーがありますか?
1、食物アレルギーがある(原因食品は何ですか?)
2、食物アレルギーはない

親、祖父母、子供、孫もしくは、同居家族内に食物アレルギーをもつかがいらっしゃいますか?
1、いる 2、いない

アレルギー物質食品表示についての質問

1、加工食品にアレルギー物質が表示されていることは御存知ですか?

1、知っている 2、知らない

2、食物アレルギーのある患者さんの日常生活にとって、アレルギー物質の食品の原材料表示は役に立っていますか?

1、役に立っている 2、役に立っていない 3、役に立つ場合と立たない場合がある
4、わからない

3、アレルギー物質の食品表示が役に立つのはどんな点ですか?

1、安心して食品を購入できるようになった
2、スーパーなど普通の店でも食品の購入ができるようになった
3、食品表示を見て買うようになってから食物アレルギーの症状がでなくなった
その他ご意見をお聞かせ下さい

[]

4、アレルギー物質の食品表示が役に立っていないのはどんな点ですか?

1、アレルギー物質の食品表示がなされるようになったために、今まで食べられた食品が食べられなくなった
2、現行の25品目では表示される食物アレルゲン数が少ないのもっと増やすべきである
3、食べてよいのかいけないのか判りづらい表示がある。
それはどの表示ですか○をつけて下さい
乳酸カルシウム、卵殻カルシウム、乳糖、乳酸菌、加水分解タンパク質、デユラムセモリナ、
カカオバター、乳化剤、魚介類、その他()
4、卵、乳など枠外にまとめて表示(一括表示)がされていないので、アレルギー物質が含まれているかわかりにくい
その他ご意見をお聞かせ下さい

[]

5、表示義務アレルギー物質(卵、乳、そば、落花生、小麦)と表示奨励アレルギー物質(20品目)があることを知っていますか?

1、知っている 2、知らない

6、表示奨励アレルギー物質はメーカーにとって必ずしも表示の義務はないことを知っていますか?

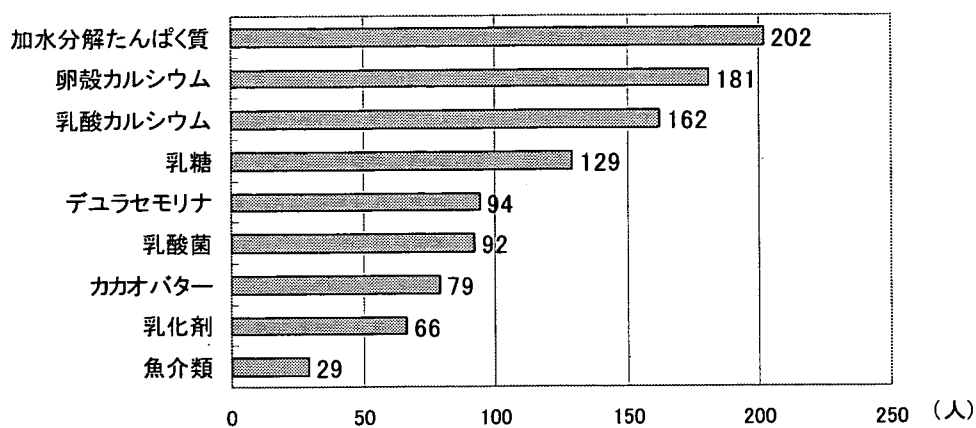
1、知っている 2、知らない

7、表示奨励アレルギー物質の中で表示義務アレルギー物質に変更したほうがよいと思う食品原材料はどれですか? 3つ選んでください。

あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、バナナ、ゼラチン

ご協力ありがとうございました。

図2-1; 判りづらい食品表示



他に 貝殻カルシウム、カゼイン、でんぷん、酵母エキス、ホエイ、アミノ酸、イーストフード、乳タンパク粉、水あめ、植物性タンパク、ポークエキス、チキンエキス 等

図2-2: 表示推奨アレルギー物質の中で表示義務に変更したほうがよいと思う食品原材料はどれですか？

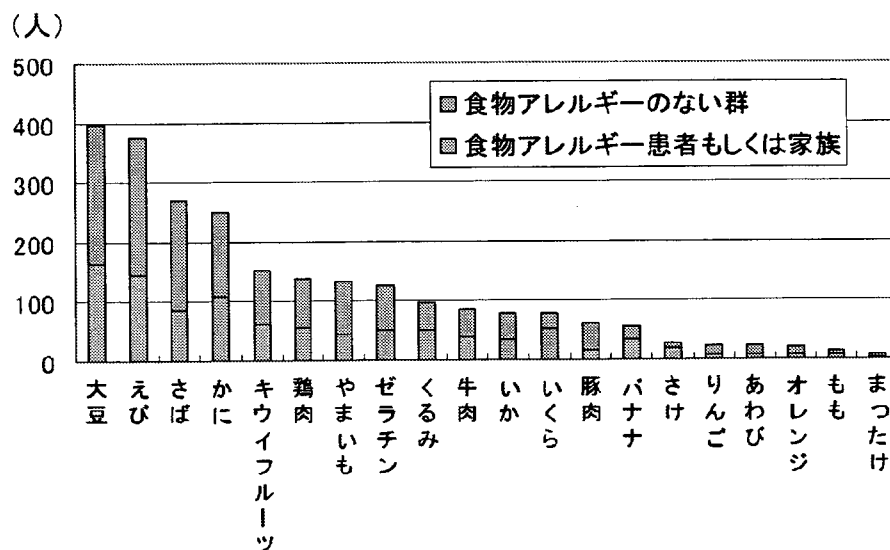
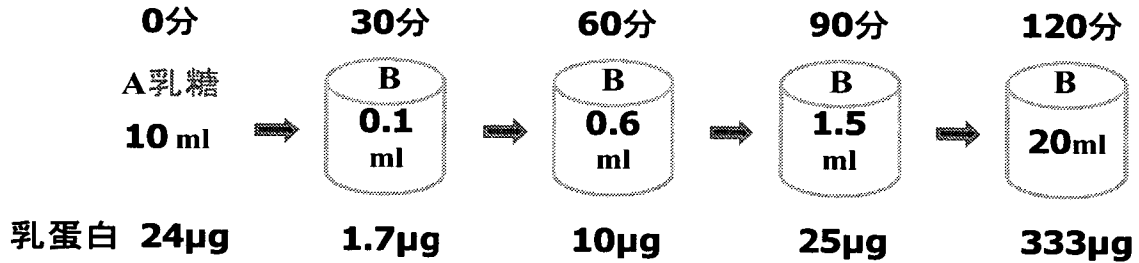


図3-1;乳糖・微量牛乳負荷試験

A: 食品用乳糖3 gを10 mlのジュースに溶解

B: 牛乳0.1 ml (乳蛋白 3.3mg)を200 mlのジュースに溶解



普通量牛乳負荷試験

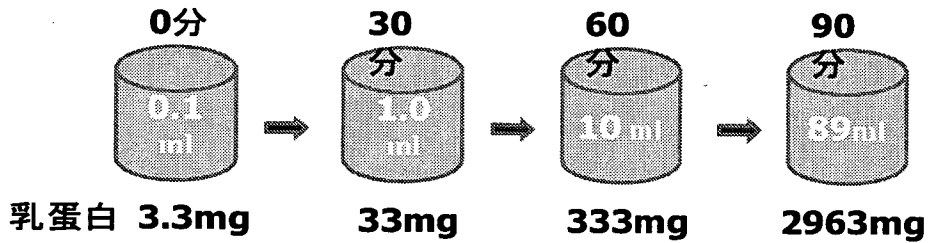


図3-2;乳糖・牛乳負荷試験陽性患者と陽性抗原量

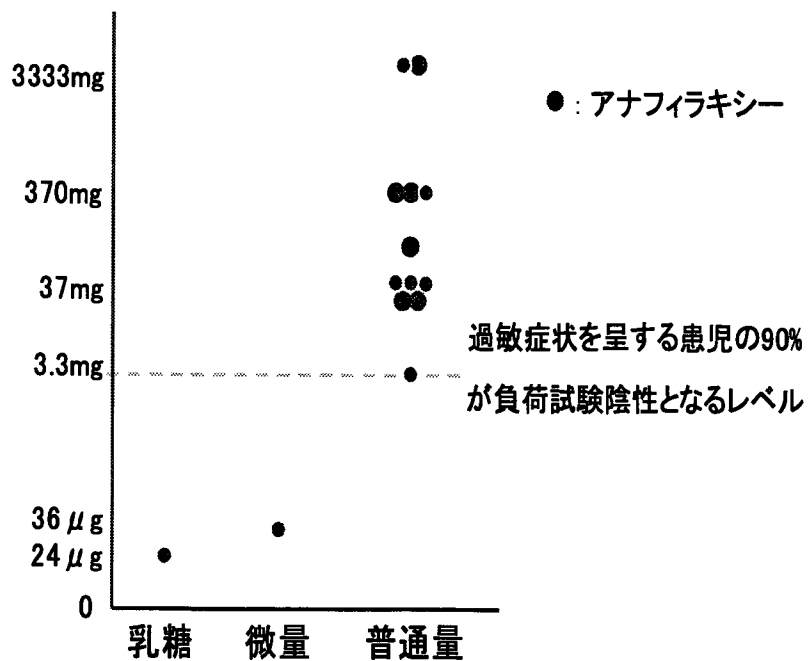


表4-1; アレルギー物質含有食品交換表(クッキーの乳での例)

32食品の卵と牛乳の含有量をFASTKITエライザVer. IIで測定

	品名	原材料(乳)	牛乳含有濃度(mg)
L-3	ビスケットA	バター、チーズパウダー、ホエイパウダー	3.4
	ビスケットB	バター乳糖、全粉乳、カゼインナトリウム	1.4
	ビスケットC	乳糖、加糖練乳、クリームパウダー、脱脂粉乳	1.4
L-2	クッキーA	クリームパウダー、乳タンパク、脱脂粉乳	0.80
	クッキーB	バター、加糖練乳	0.78
	ビスケットD	加糖脱脂練乳	0.62
	ビスケットE	加糖練乳	0.47
L-1	ビスケットF	バター	0.04
	クッキーC	バターオイル、	0.01

表 5-1: エビ・カニアレルギー患者における、エビ・カニ抗原混入食材摂取時の症状に関するアンケート

ID:

名前:

生年月日: M・T・S・H 年 月 日

性別: 男・女 年齢: 歳

職業: 水産業・水産加工品業・飲食店 その他 ()

該当するものに○印を付けるか、あるいはご記入下さい。

1. 基礎疾患 (エビアレルギー・エビ、カニ両方のアレルギー・カニアレルギー)

気管支喘息・アトピー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎・アレルギー性結膜炎・蕁麻疹

食物アレルギー (エビ・カニ以外) (原因食物:)

その他 ()

Total IgE (RIST) (IU/ml)、好酸球数 (/ μ l: %)

2. エビ・カニアレルギー発症年齢

乳児期・幼児期・学童期・成人期 () 歳頃

3. 症状発現までの時間

30分以内・2時間以内・2時間以上

4. エビ・カニアレルギーの症状 (当てはまるものに○印を付けて下さい。複数回答可)

また摂取したエビ・カニの状態について○を付けて下さい

エビ: 生・加熱品 (蒸しエビ、エビフライ、エビ天ぷら含む)・加工品

カニ: 生・加熱品 (茹でカニ・焼きカニ、鍋含む)・加工品

皮膚症状: 蕁麻疹・痒疹・発赤・湿疹・灼熱感

循環器症状: 心悸亢進・胸内苦悶・血圧低下・チアノーゼ

消化器症状: 腹痛・悪心・嘔吐・下痢・血便

呼吸器症状: 鼻汁・くしゃみ・鼻閉・咽頭違和感・咳嗽・喘鳴・呼吸困難

胸部圧迫感

眼症状: 結膜充血・眼瞼浮腫・流涙

口腔アレルギー候群症状: 口唇の浮腫・口腔内違和感

神経症状: 頭痛・耳鳴・めまい・意識消失・けいれん

アナフィラキシーショック

その他 ()

5. エビアレルギーの診断

CAP-RAST：エビ（ UA/ml：class ） ・カニ（ UA/ml：class ）
RAST法以外（MSAT・AlaSTAT・その他： ）
皮膚テスト・負荷テスト

6. その他のアレルゲン特異的IgE（CAP-RASTのみ測定値：classを記入下さい）

イカ（ UA/ml：class ） ・タコ（ UA/ml：class ）
タラ（ UA/ml：class ） ・マグロ（ UA/ml：class ）
ゴキブリ（ UA/ml：class ） ・ダニ（ UA/ml：class ）
その他魚類（ ）（ UA/ml：class ）

7. エビ・カニ抗原混入食材摂取時の反応

エビやカニにアレルギーがあることが判明しており、
今までに原因不明のアレルギー症状が出たことが
ありますか？ （あり ・ なし）

その際以下の食材を食べていましたか？

（かまぼこ・ちくわ・つみれ・魚肉ソーセージ・焼きのり・味付けのり・
しらす・ちりめんじゃこ・佃煮・その他（ ））

8. 今までに以下の食材を摂取して、明らかに症状が出現したことはありますか？

また、その症状はどのような症状ですか？

かまぼこ	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
ちくわ	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
つみれ	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
しらす	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
ちりめんじゃこ	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
焼きのり	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
味付けのり	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
魚肉ソーセージ	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
佃煮	：未摂取・摂取したが問題なし・症状あり（	）
その他（	）	：未摂食・摂食したが問題なし・症状あり（

図5-1; 患者背景1

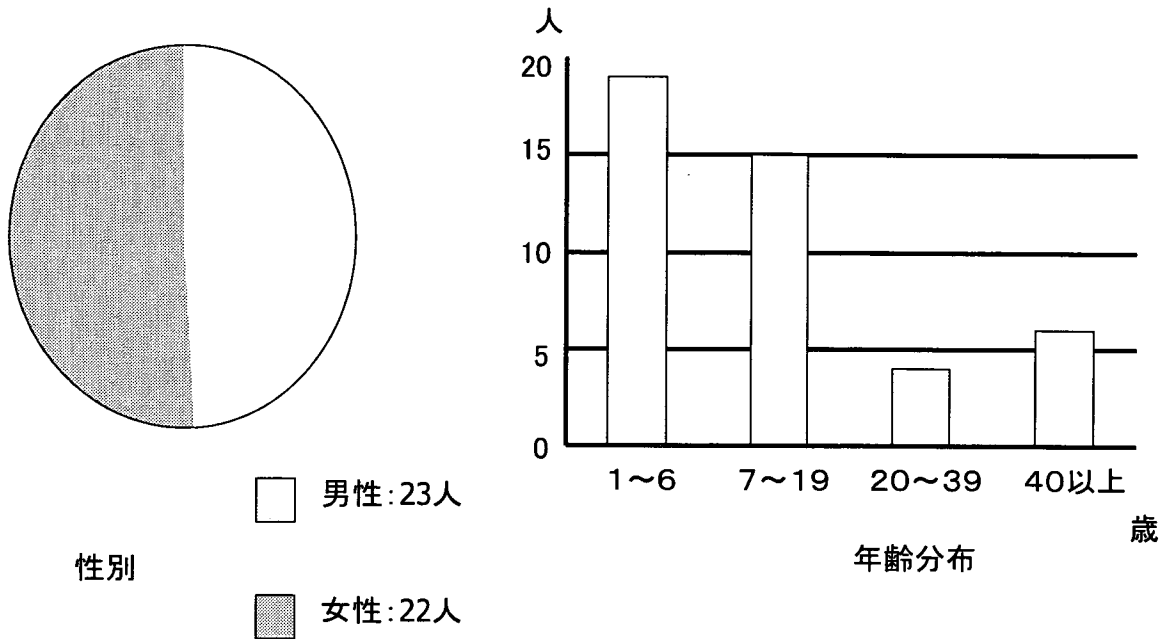
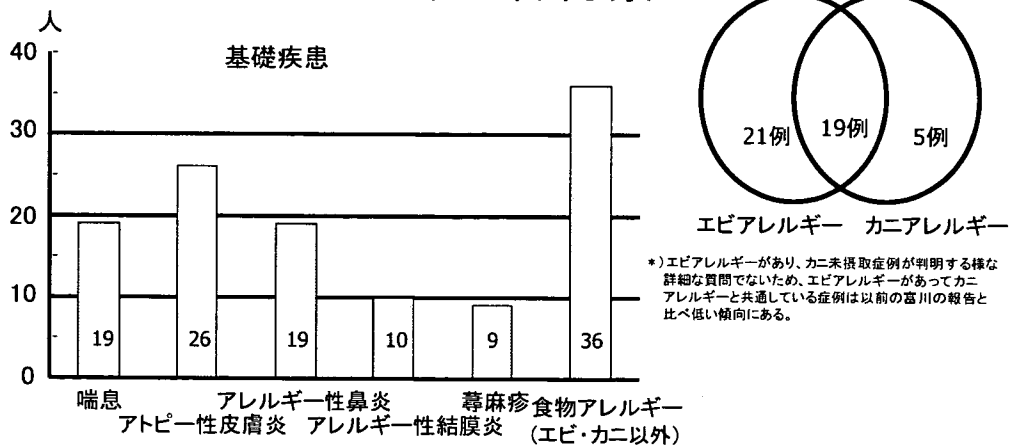


図5-2; 患者背景2



Total IgE : 1109 +/- 206 IU/ml (n=40)	エビ特異的IgE (CAP-RAST法) 9.5 +/- 2.5 Ua/ml (n=38)
好酸球数 : 942 +/- 199 / μ l (n=35) 7.7 +/- 0.7 % (n=37) (mean +/- SEM)	カニ特異的IgE (CAP-RAST法) 6.3 +/- 1.3 Ua/ml (n=32)

図5-3;エビ・カニ抗原混入各種食材を摂取して反応の出た割合

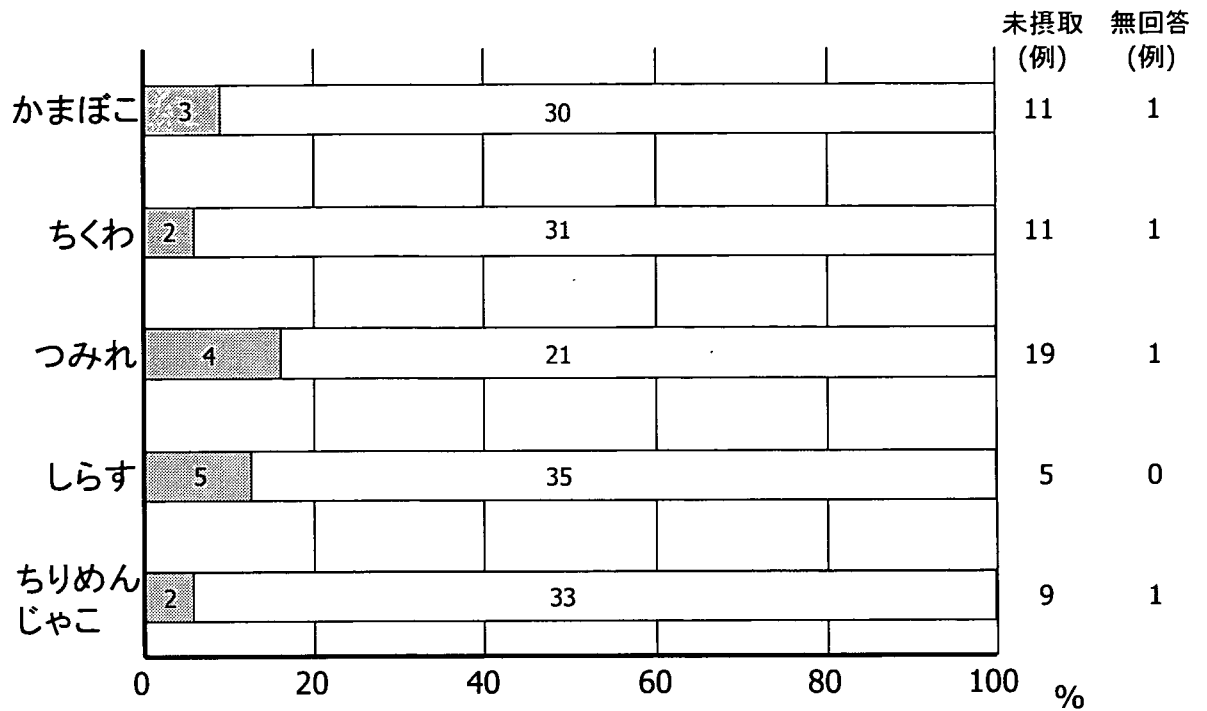


図5-4;エビ・カニ抗原混入各種食材を摂取して反応の出た割合

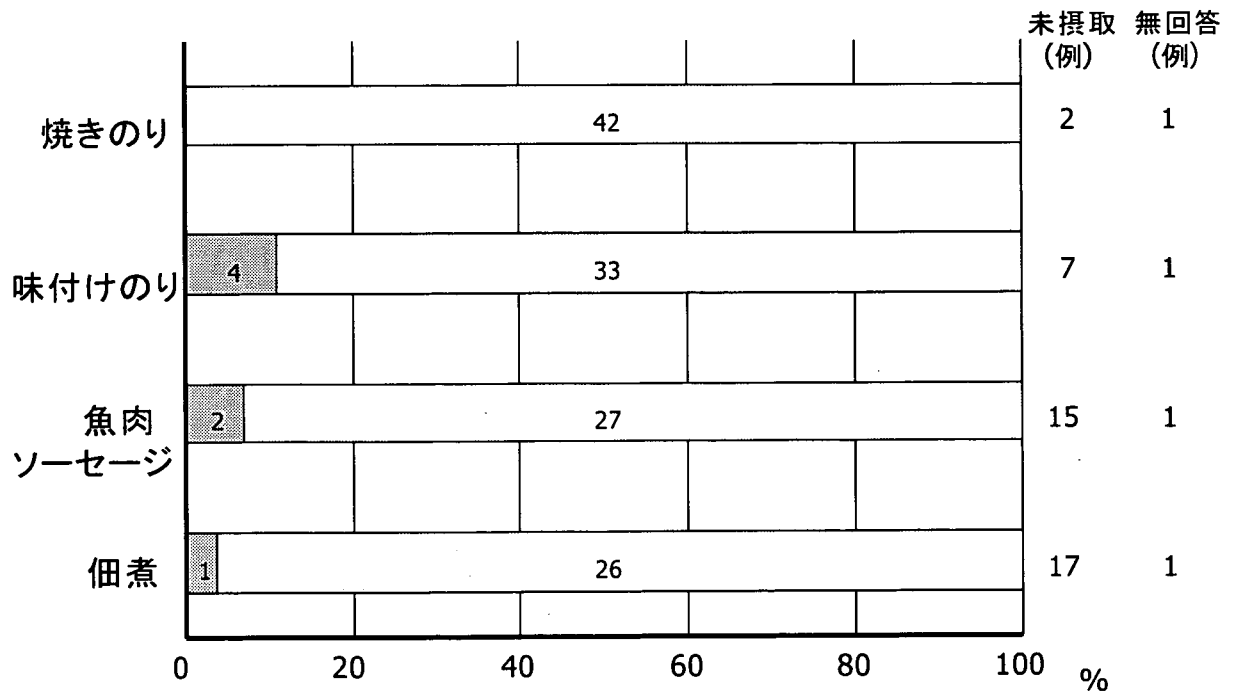
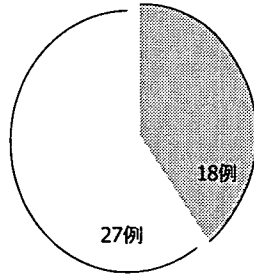


図5-5:エビ・カニ抗原混入食材摂取時の反応について

Q1. エビ・カニアレルギーが既に判明しており、
今までに原因不明のアレルギー反応を
起こしたことがありますか？

Q2. その際の原因食材は何ですか？



はい
 いいえ n=45

原因食材	食物品目	例数
エビ・カニ関連食材	かまぼこ	4
	ちくわ	2
	つみれ	3
	しらす	3
	ちりめんじゃこ	1
	焼きのり	0
	味付けのり	1
	魚肉ソーセージ	0
	佃煮	1
	キトサン含有栄養剤	1
	エビ・カニ関連総例数	8
エビ・カニ無関連食材		5
原因不明		5

表5-2: エビ・カニ抗原混入各種食材を摂取して反応の出た症状と例数

原因食材	陽性例数	皮膚症状				呼吸器症状	その他	不明
		蕁麻疹	掻痒	発疹	皮膚の乾燥	咽喉のイガイガ感	口から出す	症状記載なし
かまぼこ	3	1					1	1
ちくわ	2						1	1
つみれ	4		1				1	2
しらす	5	2	1	1				1
しゃこ	2		1	1				
焼のり	0							
味のり	4	1		1		1		1
魚肉ソーセージ	2				1		1	
佃煮	1							1

表5-3: エビ・カニ抗原混入各種食材を摂取して反応の出た症例について①

症例	年齢	性別	基礎疾患/甲殻類摂取時のエピソード	総IgE	好酸球	エビカニRAST	その他RAST	エビ・カニ抗原混入各種食材摂取時の症状
1	1	F	AD FA(卵・牛乳・ゴマ・ビーナツ) 味付けのりで蕁麻疹のみ	655	560/ μ l (7.7%)	エビ 40.90(4)	卵白 41.90(4) OVM67.10(5) 卵黄 3.40(2) ミルク 1.62(2) ゴマ 18.50(4) ビーナツ 0.50(1)	味付けのり:10分後に蕁麻疹(エビ、唐辛子含む。 卵白混入の可能性否定できない)
2	12	M	AR AC FA(卵) エビ摂取で数分で咽喉のイガイガ感と眼瞼浮腫、不安感	478	250/ μ l (4.4%)	エビ <0.35(0)	卵白 <0.35(0) OVM<0.35(0) 卵黄 <0.35(0)	魚肉ソーセージ:皮膚の乾燥(卵入りの時に強く出る)

*) 症例1, 2は共に卵アレルギーの可能性否定できない。
可能なら甲殻類微量負荷試験による再現性の確認が必要。

表5-4: エビ・カニ抗原混入各種食材を摂取して反応の出た症例について②

症例	年齢	性別	基礎疾患(FAは甲殻類以外表示) /甲殻類摂取時のエピソード	総IgE	好酸球	エビカニRAST	その他RAST	エビ・カニ抗原混入各種食材摂取時の症状
3	8	M	BA エビフライで蕁麻疹のみ	88	357/ μ l (12.3%)	エビ <0.35(0)	ダニ<0.35(0) ゴキブリ <0.35(0)	しらす:蕁麻疹(小エビ、エビの殻様のも混入)
4	37	F	AR FA(アロウエー) 生のエビ・エビフライ摂取 皮膚のそう痒・灼熱感 胸内苦悶、悪心・嘔吐、流涙 喉頭違和感、胸部圧迫感				ダニ<0.35(0) ゴキブリ <0.35(0)	つみれ
5	5	F	FA(卵・牛乳) エビ加工品摂取 蕁麻疹、鼻汁、呼吸困難、 眼瞼浮腫、結膜充血、 口唇浮腫			エビ3.81(3) カニ3.26(2)	ダニ60.20(5) ゴキブリ 1.29(2) ロブスター3.5(3)	かまぼこ:全身蕁麻疹 しらす:口唇周りの発疹 ちりめんじゃこ:口唇周りの発疹 味付けのり:口唇周りの発疹
6	7	F	UR エビ生・加熱品・加工品 (えびせんべい)摂取 蕁麻疹、嘔吐・下痢、皮膚の ケロイド化	264		エビ5.33(3) カニ1.28(2)	ダニ<0.35(0) マダラ <0.35(0)	しらす:蕁麻疹
7	36	F	AD、AR、AC、 FA(イカ・モモ・アサガド・バナナ) エビ生・加工品・加熱品摂取 皮膚のそう痒・灼熱感、鼻汁、 咽喉違和感、口腔内違和感	1300	450/ μ l (4.6%)	エビ0.61(1) カニ <0.35(0)	ダニ31.5(4)	つみれ:嫌な感じがする、いわしのつみれでかゆみ
8	40	F	FA(アワビ・アフリカキシー) エビ生摂取 咳嗽・喘鳴、口唇浮腫・痒み 口腔内違和感	444	180/ μ l (6.4%)	エビ0.37(1) カニ <0.35(0)	ダニ100<(6) ホタテ1.27(2)	しらす:少し乾いた感じ ちりめんじゃこ:少し口唇周りのかゆみ

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
魚貝類検知法の開発および魚貝類アレルギーの特定・性状解析

分担研究者	塩見一雄	東京海洋大学食品生産科学科
研究協力者	佐伯宏樹	北海道大学大学院水産科学研究院
	石崎松一郎	東京海洋大学食品生産科学科
	穉山 浩	国立医薬品食品衛生研究所
	安達玲子	国立医薬品食品衛生研究所
	酒井信夫	国立医薬品食品衛生研究所
	大橋英治	日本水産株式会社食品分析センター
	阿部晃久	日本水産株式会社食品分析センター
	畷尾規子	日本水産株式会社食品分析センター
	上坂良彦	日水製薬株式会社診断薬研究部
	岡 道弘	日水製薬株式会社診断薬研究部
	柴原裕亮	日水製薬株式会社診断薬研究部
	織田浩司	株式会社マルハニチロホールディングス中央研究所
	清木興介	株式会社マルハニチロホールディングス中央研究所
	石原好博	株式会社マルハニチロホールディングス品質保証グループ
	矢野竹男	オリエンタル酵母工業株式会社長浜事業所
	中尾義喜	オリエンタル酵母工業株式会社長浜事業所

研究要旨

各種水産加工食品中の甲殻類タンパク質の定量：甲殻類の混入が予想される各種水産加工食品について甲殻類検知キットを用いて分析した結果、305 検体中 137 検体(海苔 85 検体中 27 検体、いわし稚魚 52 検体中 48 検体、すり身 132 検体中 59 検体、二枚貝 36 検体中 3 検体)より「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された。特にいわし稚魚製品とすり身においては、検出濃度および検出頻度が高く、アレルギー患者の健康危害防止の観点から表示等の注意喚起が必要と考えられた。イカ(軟体動物)検知法(ELISA法)：スルメイカトロポミオシンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を取得し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。このサンドイッチ ELISA 系は 0.78 ng/mL の検出が可能であり、交差反応性は頭足類に特異的で、貝類(13 種類)、甲殻類(6 種類)、魚類(8 種類)、鳥類(1 種類)、哺乳類(2 種類)とは反応しないことから、頭足類検知法として有用であると考えられた。サバ(魚類)検知法(ELISA法)：マサバパルプアルブミンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を取得し、サバ検知法、魚類検知法サンドイッチ ELISA 系を構築した。サバ検知法は、交差の少ないと思われたモノクローナル抗体の組み合わせを用いたが、18 種類の魚類中 9 種類で交差反応が確認され検知法の確立は困難と考えられた。一方、魚類検知法は魚種によって反応性に差が認められたもののマサバ、サケ類には強い反応性であることから、サケ・サバを検知する測定系として有用であることが示唆された。サケ・サバ検知法(PCR法)：サケ PCR 法を開発し、幅広い食品に適用できることを確認した。今後、擬似混入試料での検証、ならびに擬似混入試料の分析を数機関で行い、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。サバ PCR 法に関しては、マサバ・ゴマサバ用プライマーと大西洋サバ用プライマーをミックスして用いることにより、サバ類をおおむね特異的に検出できることを明らかにした。交差が認められたナメタガレイについては遺伝子配列の同定などの実験的検証が必要と思われる。イクラ(魚卵)検知法(ELISA法)：シロザケ卵黄タンパク質のポリクローナル抗体を用いた ELISA 検知系を構築し、イクラに対する選択性が高いことを確認した。本検知系は、特定原材料抽出用試薬の使用が可能であり、かつシロザケに対する特異性を高く維持できた。魚貝類のアレルゲン解析：パルプアルブミンの IgE 反応性は Ca^{2+} 除去により著しく低下することが多くの魚種で確認され、パルプアルブミンの IgE エピトープとしては高次構造エピトープが重要であると考えられた。ブラックタイガーの新しいアレルゲンとして 20 kDa の SCP を同定することができた。SCP はエビ類特有のアレルゲンと推定され、エビのみを認識するアレルギー患者の存在を説明できる可能性がある。クロアワビの新しいアレルゲンとして 100 kDa のパラミオシンを同定した。パラミオシンは無脊椎動物に普遍的な筋肉タンパク質で、クロアワビ以外の動物のパラミオシンの IgE 反応性や抗原交差性は今後の課題である。

A. 研究目的

ELISA 法に基づくイカ(軟体動物)検知法、サバ(魚類)検知法およびイクラ(魚卵)検知法を開発するとともに、ELISA による特異的検知が難しいと予想された魚類については PCR 法による検知法もあわせて開発することを目的とした。さらに、甲殻類の混入が考えられる各種水産加工食品について甲殻類タンパク質の含有実態を明らかにすること、魚貝類アレルギーの基礎情報となるアレルゲンの特定・性状解析を行うことも目指した。

B. 研究方法

甲殻類の混入が予想される各種水産加工食品中の甲殻類タンパク質の定量

試料：網で分別せずに捕獲した、あるいは甲殻類を捕食している魚介類を原材料とした加工食品として、海苔製品 85 検体、いわし稚魚製品(しらす、ちりめんじゃこ等)52 検体、すり身 132 検体、二枚貝 36 検体、以上の 305 検体を財団法人食品産業センターおよび厚生

労働省を通じて入手した。試料は食品一包装単位に含まれる可食部全体を粉碎機で十分に破碎し、均質混和して調製試料とした。

すり身の製造：スケトウダラ、タチウオ、グチ、ホッケおよびエソについて、自家製すり身を次のように製造した。まず、原魚の体側部より内臓を傷つけないように注意深く筋肉を採取した。採取した筋肉は十分ホモジナイズした後、10 倍量の水を加え、氷冷下で十分攪拌した。3,000 x g で遠心し、沈殿を回収し、砂糖、ソルビット、リン酸塩を添加し十分に攪拌した。プラスチックトレイに入れ成形し、使用するまで -30℃ で凍結した。

測定方法：甲殻類タンパク質の定量には、日水製薬社製の FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」およびマルハニチロホールディングス社製の甲殻類キット「マルハ」を用い、操作はすべてキットの説明書にしたがって行ったデータの解析は 4 係数ロジスティック解析で行った。

イカ(軟体動物)検知法(ELISA法)の開発

各種トロポミオシンの精製：スルメイカ、マダコ、クロアワビ、ホタテガイ、アサリ、マガキ、エゾバイ、クルマエビ、ブラックタイガー、タラバガニ、ズワイガニ、ナンキョクオキアミを材料として、トロポミオシンの精製を行った。

検知法の作製：スルメイカ精製トロポミオシンを抗原としてウサギおよびマウスに免疫し、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た。得られた抗体を各種トロポミオシンを用いて評価を行い、サンドイッチ ELISA 系を作製した。

標準品の調製：スルメイカの可食部より調製したスルメイカ抽出タンパク質を標準液として用いた。

検出系の検討：抗体を固相化したマイクロプレートに抗原となる試料液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、常温で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄した。次いで酵素（ペルオキシダーゼ）で標識したポリクローナル抗体を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、常温で 20 分間反応させた後、 H_2SO_4 で反応を停止させることによって行った。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450nm、副波長 650nm で測定した。

食品抽出液の調製：交差反応性の検討用に頭足類、貝類、甲殻類、魚類、鳥類、哺乳類を含む 39 種類をスーパーマーケットならびに市場より購入した。ホモジナイザーで均一化した食品にラウリル硫酸ナトリウムおよび 2-メルカプトエタノールを含む抽出用緩衝液を混合して一晩振とう抽出を行った。次いで遠心分離を行って上清を回収し、食品抽出液を得た。食品抽出液を更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。

サバ（魚類）検知法（ELISA 法）の開発

各種パルブアルブミンの精製：マサバ、マアジ、チダイ、ヒラメ、マイワシ、ウナギ、ブリ、カツオ、メバチ、ウシガエルを材料として、パルブアルブミンの精製を行った。

検知法の作製：マサバ精製パルブアルブミンを抗原としてウサギおよびマウスに免疫し、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た。得られた抗体の反応性を各種パルブアルブミンを用いて評価を行い、サバ検知法および魚類検知法のサンドイッチ ELISA 系を作製した。

検出系の検討：測定操作はイカ（軟体動物）検知法の検討と同様の方法で行った。

食品抽出液の調製：交差反応性の検討用に魚類 18 種類をスーパーマーケットならびに市場より購入した。抽出操作及び希釈操作はいか（軟体動物）検知法の検討と同様の方法で行った。

サケ・サバ検知法（PCR 法）の開発

PCR 用プライマーは既知の魚介類遺伝子の塩基配列を解析して目的配列を選択した後、PCR 増幅予測ソフトウェア（Amplify 1.0）で特異性を予測した。上記方法で、サケ検知用プライマー SKE-F/SKE-R およびサバ検知用プライマー SBA-F/SBA-R を設計した。設計したプライマーは原材料（サケ、サバ、イカ、エビ、カニ）から精製したゲノム DNA を用いて特異性を検証した。検出感度はそれぞれの PCR 増幅産物をプラスミドベクターに挿入したプラスミド DNA を用いて確認した。また、11 種類の市販加工食品を購入し PCR 法によるサケおよびサバ DNA の検知を行い、この方法の実用性を確認した。さらに、サバ検知用プライマー SBA-F/SBA-R ではマサバおよびゴマサバは検知できるが、大西洋サバを検知することが困難であることが PCR 増幅予測ソフトウェアによる解析で予想されていたため、新たに、サバ検知用 SBA プライマーペアと同一 PCR 条件で使用できる大西洋サバ検知用プライマー TSBA-F/TSBA-R を設計し、その検証も行った。

イクラ（魚卵）検知法（ELISA 法）の開発

シロザケ卵黄タンパク質に対する抗体を作製して ELISA 系を構築し、6 魚種（シロザケ、スケトウダラ、ニシン、アサバカレイ、ババカレイ、カペリン）の魚卵タンパク質抽出物を供試した。魚卵タンパク質抽出物は 0.5 M NaCl-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いて調製した。

魚貝類のアレルゲン解析

魚類パルブアルブミンの IgE 反応性に及ぼす Ca^{2+} の影響：パルブアルブミンの IgE 反応性に及ぼす Ca^{2+} の影響を、患者血清を用いた蛍光 ELISA により検討した。8 魚種（マイワシ、ウナギ、マアジ、チダイ、マサバ、カツオ、メバチ、ヒラメ）から精製したパルブアルブミン溶液（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）50 μL を用いて 96 ウェル平底プレート（ELISA 用プレート H タイプ、住友ベークライト、東京）に固相化後、5 mM EGTA 添加または無添加の患者血清（1:250 または 1:500 希釈）50 μL 、 β -galactosidase 標識ヤギ抗ヒト IgE 溶液

(1:1000 希釈) 50 μ L と順次反応させた。次いで、0.01% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-1 mM MgCl₂-10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 50 μ L を添加して酵素反応を行い、励起波長 367 nm、蛍光波長 453 nm で蛍光強度を測定した。

ブラックタイガーの新規アレルゲン：甲殻類のアレルゲンとして、最近、アルギニンキナーゼが同定されている。アルギニンキナーゼの精製方法に従ってブラックタイガーの抽出液を硫酸塩析 (70-90%飽和) 後、陰イオン交換 HPLC (Mono Q) に供したところ、アルギニンキナーゼよりはるかに強い IgE 反応性を示す 20 kDa のアレルゲンが存在することを見いだした。陰イオン交換 HPLC の 20 kDa アレルゲン画分を最後に逆相 HPLC (TSKgel ODS-12T) に供し、精製アレルゲンを得た。精製 20 kDa アレルゲンをリシルエンドペプチダーゼで分解後、逆相 HPLC (TSKgel ODS-12T) で単離したペプチドのうち 2 成分のアミノ酸配列をプロテインシークエンサーで分析した。さらに、ブラックタイガーから精製した 20 kDa アレルゲン、トロポミオシンおよびアルギニンキナーゼの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA 法により調べた。また、クルマエビ、アメリカンロブスター、ホッコクアカエビ、タラバガニおよびズワイガニから調製した抽出液を患者血清を用いたイムノブロットングで分析し、甲殻類における 20 kDa アレルゲンの分布を調べた。

クロアワビの新規アレルゲン：数種軟体動物の抽出液について、患者血清を用いたイムノブロットングによるアレルゲンのスクリーニングの過程で、クロアワビに 100 kDa の新規アレルゲンを検出した。クロアワビ筋肉を低イオン強度のリン酸緩衝液で洗浄し、その残渣を高イオン強度のリン酸緩衝液で抽出して得た塩溶性タンパク質画分に 100 kDa アレルゲンが認められた。塩溶性タンパク質画分を硫酸塩析 (10-20%飽和)、ハイドロキシアパタイト HPLC (Bio-scale CHT2-I) に順次供して 100 kDa アレルゲンを精製した。精製アレルゲンをリシルエンドペプチダーゼで分解後、逆相 HPLC (TSKgel ODS-12T) で単離したペプチドのうち 4 成分のアミノ酸配列をプロテインシークエンサーで分析した。

C. 研究結果

甲殻類の混入が予想される各種水産加工食品中の甲殻類タンパク質の定量

海苔製品では、85 検体中 27 検体 (陽性率 31.8%) より「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された (表 1)。これらの中で、えび等級海苔は 3 検体中 2 検体で 20 μ g/g 以上の「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された。一方、えび等級海苔以外で陽性となった 24 検体では平均 3.1 μ g/g と比較的低い濃度であることが明らかとなり、「まれにエビの一種付着あり」、「エビエキス」と表示された検体からも、「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出限界以下であったことから注意喚起の誤った記載が懸念された。他方、海苔の産地と「えび」、「かに」等の甲殻類の混入との関連性は認められなかった。

しらす、ちりめんじゃこ等のいわし稚魚製品では、52 検体中 48 検体 (陽性率 92.3%) と高頻度で「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された (表 2)。さらに、それらの半数以上である 26 検体は 10 μ g/g を超える「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が含まれることが明らかとなった。また、海苔同様にいわし稚魚の産地と「えび」、「かに」等の甲殻類の混入との関連性は認められなかった。

すり身では、132 検体中 59 検体 (陽性率 44.7%) より「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出され、これらの中で 10 μ g/g 以上の「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された検体は 11 検体であった (表 3)。魚種と「えび」、「かに」等の甲殻類の混入との関連性に関しては、スケトウダラは 74 検体中 14 検体 (陽性率 18.9%、陽性検体の平均濃度 1.8 μ g/g)、ミナミダラは 6 検体中 1 検体 (陽性率 16.7%、陽性検体の平均濃度 0.7 μ g/g) と頻度および濃度が低かったのに対し、イトヨリダイは 16 検体中 14 検体 (陽性率 87.5%、陽性検体の平均濃度 5.8 μ g/g)、グチおよびタチウオでは 12 検体中 5 検体より 20 μ g/g 以上と、高頻度および高濃度の「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された。甲殻類検知キットが原魚の筋肉部分に交差反応性がないことを確認するために、スケソウダラ、パシフィックホワイティング、イトヨリ、タチウオ、シログチ、ホッケ、アジ、エソ、トビウオから採肉し、検体抽出液を調製して測定に供したところ、いずれも反応性を認めなかった。さらに、スケソウダラ、タチウオ、グチ、ホッケ、エソについて実験室内で自家製すり身を製造し、その検体抽出

液を測定に供した。その結果、いずれの自家製すり身においても反応性を認めなかった。

二枚貝では、36 検体中 3 検体(陽性率 8.3%)より「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された(表 4)。それらの 3 検体すべては、20 $\mu\text{g/g}$ 以上の「えび」、「かに」等の甲殻類由来のタンパク質が検出された。

イカ(軟体動物)検知法(ELISA法)の開発

抗体の選択：抗スルメイカトロポミオシンモノクローナル抗体を 6 クローン取得した。各種トロポミオシンを用いた評価を行い、スルメイカおよびマダコトロポミオシンに反応し、貝類および甲殻類のトロポミオシンに反応しないモノクローナル抗体を選択し、酵素標識抗体に用いた。一方、固相抗体にはポリクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を作製した。

検知法の評価：標準溶液濃度 0.78~50 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ、十分な吸光度が得られ 0.78 ng/mL の検出が可能であった。また、頭足類、貝類、甲殻類、魚類、鳥類、哺乳類の食品抽出液 39 種類を用いて交差反応性を検討したところ、頭足類 9 種類で測定上限(20 ppm)を超える強い反応性を示し、その他の食品 30 種類はすべて 1 ppm 以下であった。

サバ(魚類)検知法(ELISA法)の開発

抗体の選択：抗マサバパルブアルブミンモノクローナル抗体を 19 クローン取得した。各種パルブアルブミンを用いた評価の結果、マサバパルブアルブミンのみに反応するモノクローナル抗体は認められなかった。また、各種魚類パルブアルブミンすべてに反応するモノクローナル抗体も得られなかった。そこで、サバ検知法は交差が少なく、交差のパターンが異なるモノクローナル抗体の組み合わせを選択してサンドイッチ ELISA 系を作製した。一方、魚類検知法は反応性に強弱は認められたが、各種魚類パルブアルブミンすべてに反応したポリクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を作製した。

検知法の評価：両検知法を 10 種類の精製パルブアルブミンを用いて評価を行ったところ、サバ検知法はスクリーニング段階で認められた各抗体の交差反応数より減少したものの、マアジ、メバチ、ウナギで交差が認められた。一方、魚類検知法は魚種全体で反応が認められたものの、ヒラメに対する反応が弱く魚種における差が確認された。次にマサバおよびサケ類を含む 18 種類の魚類の食品抽出液で

評価を行ったところ、サバ検知法はマサバ以外の 9 種類で交差が認められた。また、サケ類とは反応しなかった。魚類検知法は 18 種類すべてで反応が認められたが、魚種における差が確認された。その傾向はマサバおよびサケ類を含む 16 種類は強い反応性であったが、ヒラメ、カツオの 2 種類は弱い反応性であった。

サケ・サバの検知法(PCR法)の開発

遺伝子配列の明らかなミトコンドリアチトクローム C 遺伝子に着目し、サケおよびサバの特異的検出のための PCR 用プライマーをデザインした。遺伝子解析ソフトウェアでの増幅予測結果から、サケ属は SKE プライマーペアで標的部分の遺伝子の増幅が可能であるが、サバについては、同一のプライマーではマサバ、ゴマサバ、大西洋サバを同等に増幅させることが困難であることが示唆された。よって、サバについては、まずマサバとゴマサバの検出を目的として SBA プライマーペアを設計し、そのプライマーペアの基本性能を検証した後、SBA プライマーペアと同一 PCR 条件で使用できる大西洋サバの検出を目的とした TSBA プライマーペアを設計した。今回の検討に使用したサケ検知用プライマー、サバ検知用プライマーならびに動物性食品由来 DNA および植物性食品由来 DNA 確認用プライマーのまとめを表 5 に示した。まず、SKE プライマーペアおよび SBA プライマーペアの特異性を確認した。その結果を図 1 に示す。シロザケ、マサバ、ヤリイカ、ブラックタイガー、ズワイガニから抽出したゲノム DNA を用いた PCR で、SKE プライマーペアはシロザケ、SBA プライマーペアはマサバ DNA のみが特異的に増幅された。さらに、それぞれの PCR 増幅産物を挿入したプラスミド DNA を使用して、これらの 2 種類のプライマーペアでの PCR の検出限界を確認し、両プライマーペアとも 0.02 $\text{fg}/\mu\text{l}$ (10 copies 相当)までのプラスミド DNA の検出が可能であることが確認できた(図 2)。また、実用性については、サケおよびサバの表示記載のある市販加工食品を含む 11 種類の市販加工食品から抽出した DNA を用いて検討した(図 3)。市販加工食品から抽出した DNA の PCR への使用可否は植物由来 DNA および動物由来 DNA を増幅できるそれぞれのプライマーペアを用いて検証し、PCR 反応に使用できる DNA であることも確認した。実用性については、SKE プライマーペアはサケの記載のある加工食品のみで PCR 増幅産物が確認され、

検討に使用した加工食品に含まれているサバ、アジ、イワシ、カツオでは PCR 増幅産物が認められなかった。また、増幅産物の塩基配列を確認した結果、検討に使用した市販加工食品に含まれるサケはシロザケおよびカラフトマスであることが証明できた。さらに、ふりかけ（さけ）には魚類としてはタラとサケの DNA が混在していることが予想されるが、塩基配列を確認した結果、SKE プライマーペアはサケ DNA のみを増幅していることも確認できた。同様に、SBA プライマーペアはサバの記載のある加工食品のみで PCR 増幅産物が確認され、検討に使用した加工食品に含まれているカツオ、サケ、タラでは PCR 増幅産物が認められなかった。また、増幅産物の塩基配列を確認した結果、検討に使用した加工食品である粉末削りぶしに含まれるサバはゴマサバであることが証明できた。さらに、粉末削りぶしには魚類としてはサバ、アジ、イワシの DNA が混在していることが予想されるが、塩基配列を確認した結果、SAB プライマーペアはサバ DNA のみを増幅していることも確認できた。

以上の結果から、サケ検知用 SKE プライマーペアは加工食品中からのサケの検知法として適用可能であることが示唆された。サバ検知用 SBA プライマーペアは加工食品中からのマサバ、ゴマサバの検知法として適用可能であることが示唆されたが、大西洋サバの検知は困難であることがソフトウェア解析で予想されている。そこで、SBA プライマーペアと同一 PCR 条件で使用できる大西洋サバ検知用プライマーペアとして TSBA プライマーペアを設計し、マサバ、ゴマサバ、大西洋サバのゲノム DNA を用いて検証した（図 4）。ソフトウェア解析での予想通り、SBA プライマーペアはマサバ、ゴマサバ DNA で、TSBA プライマーペアは大西洋サバ DNA で増幅産物が確認できた。マサバ、ゴマサバ、大西洋サバのゲノム DNA を検知するには、これらの 2 種類のプライマーペアを用いれば検知できるが、2 度の PCR を実施しなければならない。そこで、この 2 種類のプライマーペアを混合し、1 度の PCR でサバの検知ができるかの検討も行い、それぞれの F プライマー、R プライマーを等量混合したプライマーペアを用いることで、同時に 3 種類のサバの検知が可能であることも確認した（図 4）。

サケ検知用プライマーペア、サバ検知用プライマーペアの実用性を、魚介類：60 種類、

魚介類加工品：16 種類から抽出した DNA で検証を行った（表 6）。サケ検知用プライマーペアでは妥当な結果であった。サバ DNA 検知用プライマーでも概ね妥当な結果であったが、マサバ・ゴマサバ DNA 検知用 SBA プライマーでは、ナメタガレイ DNA およびノルウェー産サバを原材料として製造されたサバフィレーで、整合性の取れない結果が認められた。それらの結果について追試を行い、結果が再現されたことから、PCR 産物の塩基配列の確認を行った（図 5）。その結果、ノルウェー産サバを原材料として製造されたサバフィレー中には僅かにゴマサバが混入しており、SBA プライマーペアではその僅かに混入していたゴマサバ DNA を増幅していた可能性があることが判明し、プライマーの特異性の問題ではないことが証明された。一方、ナメタガレイ DNA で増幅された産物の塩基配列はゴマサバと非常に近い配列ではあったが、数塩基の相違が認められた。サバプライマーで検知されたナメタガレイ DNA での増幅産物量は、サバ DNA で認められる増幅量と比較すると非常に少ない。このことはナメタガレイ遺伝子上のサバプライマーの標的部分の塩基配列がサバプライマーの塩基配列と幾らかの相違があることを推測させる結果である。しかしナメタガレイの標的部分の遺伝子配列は現在まだ同定されていない。よって、対象遺伝子の同定も含め、さらに検証が必要と考えられる。

イクラ（魚卵）検知法（ELISA 法）の開発

開発した ELISA 系に魚卵タンパク質抽出物を供したところ、シロザケ卵に対する選択性の高い検知系が確立できた。この ELISA 系は特定原材料抽出用試薬の使用が可能であり、かつシロザケに対する特異性を高く維持できた。

魚卵中にはビオチンが存在していることが報告されており、またビオチンは、しばしばタンパク質に結合した状態で存在することが知られている。ELISA 系構築においてこの点を検討したところ、魚卵中には魚卵タンパク質抽出物と結合したビオチンが存在することが明らかとなった

魚貝類のアレルゲン解析

魚類パルプアルブミンの IgE 反応性に及ぼす Ca^{2+} の影響：タラのパルプアルブミン (Gad c 1) では Ca^{2+} を除去しても IgE 反応性の低下は約 25% で、一次構造上の IgE エピトープが重要であると考えられている。実際、4 つの領域が IgE エピトープとして提唱されている。

しかし近年、コイおよびマサバのバルブアルブミンでは、Ca²⁺を除去すると IgE 反応性が著しく低下することが報告されている。Ca²⁺を除去すると高次構造が変化することが知られているので、コイおよびマサバのバルブアルブミンの IgE 反応性には高次構造エpiteープの関与の方が大きいことを示唆している。Gad c 1 と矛盾した結果は魚種の違いということも考えられたので、8 種魚類のバルブアルブミンについて、患者血清中 IgE との反応性に対する Ca²⁺の影響を EGTA 添加と EGTA 無添加の条件で ELISA で調べた。図 6 に示すように、EGTA 無添加に比べて EGTA 添加での IgE 反応性は、いずれの患者血清および魚種においても約 30~100%減少した。バルブアルブミンから Ca²⁺を除いても著しい影響を受けなかった患者 9 や多くの患者での減少率が低い魚種（メバチ）も存在したが、今回用いた 8 魚種バルブアルブミンの主要な IgE エpiteープは立体構造上に存在することが示唆された。

ブラックタイガーの新規アレルゲン：ブラックタイガーの筋肉から硫酸塩析、陰イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により SDS-PAGE 的に純度の高い 20 kDa アレルゲンを精製することができた（図 7）。20 kDa アレルゲンのリシルエンドペプチダーゼ分解で得られたペプチド断片の中から 2 成分のアミノ酸配列を分析したところ、VGLDEYRLDCITRSFAFEVK、IMRNLAWEIAELADFNK であった。これらの配列をデータベースで検索し、数種甲殻類から得られている sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) であることが判明した。ブラックタイガーから精製した SCP、トロポミオシンおよびアルギニンキナーゼの IgE 反応性を患者 16 人の血清を用いた ELISA で調べた結果、トロポミオシンは 13 人で陽性反応がみられ主要アレルゲンであることが再確認された（図 8）。SCP も 8 人と陽性反応を示し（陽性率 50%）、主要アレルゲンの可能性が示唆された。アルギニンキナーゼは 10 人と陽性反応を示したが、蛍光強度から判断した IgE 反応性はトロポミオシンおよび SCP と比べると著しく弱いと判断された。SCP と強い反応性を示す 4 人の患者（患者 1-4）血清を用いてイムノブロッティングで分析したところ、4 人ともブラックタイガーだけでなくクルマエビの 20 kDa タンパク質（SCP）とも強く反応した（図 9）。アメリカンロブスターの 20 kDa タンパク質とは患者 1-3 が、ホッコクアカエビの 20 kDa タンパク質とは患者 3、4 が弱く

反応した。これら 20 kDa タンパク質との反応性は、患者血清をブラックタイガーの SCP と予めインキュベートするとすべて消失した（データ示さず）。一方、SDS-PAGE の結果から 2 種類のカニ（タラバガニ、ズワイガニ）における SCP 含量は低いと判断され、患者血清との反応性も認められなかった。

クロアワビの新規アレルゲン：クロアワビの筋肉から塩溶性タンパク質画分を調製し、硫酸塩析、ハイドロキシアパタイト HPLC により 100 kDa の新規アレルゲンを精製することができた。リシルエンドペプチダーゼ分解で得られたペプチド断片（ペプチド 1-4）のアミノ酸配列は、ペプチド 1 は NQETINDLTDQLEYM、ペプチド 2 は HQLIIEIDTLQG、ペプチド 3 は ARLTQENFDLQH、ペプチド 4 は AQILIEADHRA であった。これらアミノ酸配列をもとにデータベースで検索したところ、ペプチド 1-4 はムラサキイガイパラミオシンの 121-135、147-158、203-214、825-836 とそれぞれ高い相同性を示すことがわかり、100 kDa アレルゲンはパラミオシンであると判断した。

D. 考察

甲殻類の混入が予想される各種水産加工食品中の甲殻類タンパク質の定量

海苔製品、イワシ稚魚製品、魚肉すり身および二枚貝は甲殻類の混入が予想される水産加工食品であり、本研究によりいずれの製品においても一定の割合で甲殻類タンパク質が検出された。特にいわし稚魚製品とすり身においては、検出された濃度および検出率頻度が高く、アレルギー患者の健康危害防止の観点から表示等の注意喚起が必要と考えられた。

海苔の場合、養殖場付近に甲殻類の仲間である端脚目のヨコエビ類、ワレカラ類（図 10A）が生息しており、海苔水揚げの際に混入することが避けられない。極端な場合にはえび等級海苔という肉眼的に明らかな甲殻類の存在を認める製品があり、今回これら製品においては高濃度の甲殻類タンパク質が検出された。従って、海苔製品に認められた反応性はこれら共生している微少甲殻類由来のものと考えられた。いわし稚魚の場合も、図 10B に示すようなワレカラ亜目 (Caprellidea) に属する甲殻類あるいは「えび」、「かに」の幼生、またはコツブムシ亜目 (Flabellifera) に属する海洋生物と生息領域が近いことから、それらが網で混獲されて製品に混入したのと考えられる。

内臓を傷つけないように採取した筋肉から試作したすり身では甲殻類タンパク質は陰性であったので、市販すり身に検出された甲殻類タンパク質は外来性と考えられる。一般的にすり身の原魚として用いられる魚類は、オキアミをはじめとする甲殻類（図 10C）を捕食していることから、加工工程で消化管内容物が流出し、それらがすり身に混入した結果として甲殻類タンパク質が検出された可能性が高い。従って、すり身における甲殻類由来のタンパク質の混入は、原魚の餌生物に由来すると思われる、加工食品の原材料として利用するすり身の精製度に依存しているものと考えられる。なお、検出頻度および検出濃度が低かったスケトウダラおよびミナミダラは、比較的大きな魚体をすり身の原材料として用いることが多い。一方、高頻度かつ高濃度に検出されたイトヨリダイ、グチ、タチウオについては、商品価値の低い小さな魚体をすり身の原材料として用いることが多い。大型の魚と比較して、小型の魚の方が消化管内容物が混入する可能性が高いことから、すり身原材料の魚種と「えび」、「かに」等の甲殻類の混入との関連性は、原魚の大きさに大きく依存することが示唆された。

一部二枚貝に甲殻類タンパク質が高濃度に検出されたのは、カクレガニが共生していることに起因していると考えられる（図 10D）。原材料の段階で二枚貝に「えび」、「かに」等の甲殻類が共生しているかどうかの判別は難しい。しかしながら、生態環境等を考慮すれば二枚貝の種類による共生の予測が可能であると考えられる。

イカ（軟体動物）検知法（ELISA 法）の開発

構築したイカ（軟体動物）検知法は頭足類に特異性の高い検知法であった。頭足類におけるトロポミオシンのアミノ酸配列の相同性は非常に高いことが知られており、今回用いたモノクローナル抗体も頭足類間のみで共通な領域を認識している可能性が示唆された。

サバ（魚類）検知法（ELISA 法）の開発

サバ検知法で認められた交差反応性は魚類の間でパルブアルブミンのアミノ酸配列の相同性が高いため、得られたモノクローナル抗体が一部の魚類で共通な領域を認識していることが示唆された。一方、魚類検知法における魚種による反応性の差は、カツオでは精製パルブアルブミンで十分反応していることから、食品中のパルブアルブミンの含有量が低いことが考えられた。しかし、ヒラメにおい

ては精製パルブアルブミン、食品抽出液ともに他の魚種と反応性に差があることから、用いた抗体がヒラメパルブアルブミン自体に反応性が低いと考えられた。これはパルブアルブミンのアミノ酸配列の相同性が一部の魚類で共通な領域が数多くあるものの、魚類全体で共通な領域が少ないことが影響していると考えられた。

サケ・サバ検知法（PCR 法）の開発

多くの魚介類で遺伝子配列の明らかとなっているミトコンドリアチトクローム C に着目し、PCR でサケおよびサバの検出方法の開発を行った。サケ PCR はプラスミド DNA を用いた検討で、10 コピー相当までの DNA が検出できることが確認できた。また、さまざまな市販加工食品においてもこの方法が十分適用可能であることを実証できた。一方、サバ PCR もサケ PCR 同様、プラスミド DNA を用いた検討で、10 コピー相当までの DNA が検出できることが確認できた。また、さまざまな市販加工食品においてもこの方法が概ね適用可能であることが実証できた。しかし、僅かな交差が認められたナメタガレイやその他非特異的増幅が確認された種については、遺伝子配列の同定等の検討が必要と思われる。

イクラ（魚卵）検知法（ELISA 法）の開発

本研究では、検知対象物としてシロザケ卵（イクラ）の卵黄タンパク質を選定し、このポリクローナル抗体を用いることで、シロザケに対する選択性の極めて高いイクラ検知系を構築することが可能であると判断した。開発した ELISA は、魚卵中に含まれるジオチンによる偽陽性を排除しており、また特定原材料抽出用試薬も利用可能である。それゆえ、感度の向上とブランク値のさらなる低減化を目標とした詳細な条件設定をおこなうことで、実用レベルの検知系を完成できると思われる。

魚貝類のアレルゲン解析

パルブアルブミンの IgE 反応性は Ca^{2+} 除去により著しく低下することが多くの魚種で確認され、パルブアルブミンの IgE エピトープとしては高次構造エピトープが重要であると考えられた。コイおよびマサバパルブアルブミンの場合、 Ca^{2+} 結合に必須のアミノ酸残基を変異させた改変パルブアルブミンでは IgE 反応性が著しく弱いことが報告されている。患者の血中 IgE が主としてパルブアルブミンの高次構造を認識するということから、サバ（魚類）検知法（ELISA 法）開発の項で天然パルブアルブミン（ Ca^{2+} を保持している）を用いて