

200734010B

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

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 宇理須 厚雄

平成20(2008)年4月

目 次

I. 総合研究報告書

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

宇理須 厚雄 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 99

III. 研究成果の刊行物・別冊 103

I . 総合研究報告

総合研究報告書

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

主任研究者 宇理須厚雄 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科 教授

研究要旨

1、食品中のアレルギー物質検査法開発

①ELISA法の開発；甲殻類（エビ、カニ、十脚目以外の甲殻類）、イカ、サバ、イクラ、ダイズ、キウイフルーツ、クルミ、バナナ、豚肉、牛肉、ゼラチンのELISA法を開発した。エビ、ダイズ、クルミはバリデーションでも良好な結果を得た。

②PCR法の開発；エビ（カニと区別可能）、カニ、サケ、サバ、ダイズ、キウイフルーツ、クルミ、バナナ、牛肉、豚肉、鶏肉に対するPCR法を確立した。

③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った。

2、科学的根拠に基づいた表示とするための研究

①甲殻類の交差抗原性の検討

IgE結合能でみると、エビ類同士の交叉反応性は十脚目以外の甲殻類と比べると強かった。

②魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラ、タラコの間でIgE結合能に交叉反応性あり。魚肉とも弱いながら交叉反応性あり。イクラと鶏卵黄の間には交叉反応性はない。

③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。

④エビ摂取による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

原材料に甲殻類を使わない食品（つみれ、しらす、味付のり、かまぼこ、魚肉ソーセージ、ちくわ、ちりめんじゃこ、佃煮）でも、甲殻類測定ELISAキットによってエビ抗原が検出される食品がある。これらを摂取することによって症状を呈するエビ・カニアレルギー症例があることが判明した。症状はナフィラキシー等の重篤な症状は認めず軽微であった。6例に関しては含有する甲殻類抗原で症状が出現している可能性があった。しかし、真に甲殻類抗原によって惹起された症状であるか今後の検討が必要である。エビ・カニの表示義務化に向け新たな課題となる。

⑤アレルギー分析（交叉反応性）

1) ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交叉反応性の検討

ピーナッツなどナッツ類の交差抗原性の検討；いずれのナッツ間にも交叉反応性が存在するが、ピーナッツアレルギー症状を呈する患者のIgEはピーナッツ・ナッツ類抗原の比較的固有のアレルゲン成分を認識した。

2) 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Ca²⁺除去により著しく低下した。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を同定した。また、クロアワビの100 kDaのパラミオシンもアレルゲンであると同定した。

3) 魚卵のアレルゲン：イクラ（シロザケの卵）の主要アレルゲンはβ'-コンポーネントであることを究明した。イクラアレルギー患者の血清はその他の魚卵、特にサケ科魚類の卵のβ'-コンポーネントとも強く反応し、β'-コンポーネントはサケ科魚類間で交差性を示す主要アレルゲンであると考えられた。

4) イクラ、タラコなど魚卵間にはIgE結合能で交叉反応性が存在するが、鶏卵黄とは交叉反応しない。魚卵β'-コンポーネントが交叉反応性に関与している。

5) 魚類；魚類相互の交叉反応性にはパルプアルブミンが関与しているが、高次構造エピトープが重要である。症例によってはパルプアルブミン以外にトランスフェリンが魚類間の交叉反応性に関与することが示された。

⑥乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖には 1g 当たり約 8 μ g の乳タンパク質が含まれる。牛乳アレルギー患者 31 人中 1 人が乳糖負荷試験陽性となった。今回の経口負荷試験では陽性となる最低量は 36 μ g 乳タンパク質量であった。また、90%の患者が陰性となる閾値は 3.3mg であった。信頼性を増すためには、牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

⑤アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

32 種類の食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量を FAST KIT エライザ Ver. 11 で測定した。その中で、クッキー・ビスケットの牛乳タンパク質含量をみると、0.01mg から 3.4mg と約 300 倍の幅があった。経口負荷試験で陽性となった牛乳タンパク質量に基づき、どの含量の食品ならば摂取可能であると指導できるためには、さらなる検証が必要である。アレルギー物質含有食品交換表が完成されれば、食物アレルギー患者は表示に自身のアレルギー物質が含まれていても、食べることができる加工食品を見つけることができる。日本の食品表示では表示義務食品は定量的検知法 (ELISA 法) が確立している。この検知法の応用範囲を拡げることになる。

3、消費者に分かりやすい表示に関する検討

①食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

Web サイトを利用して、食物アレルギーと自覚する主として成人の実態について、その生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向などに関する調査を行った。その結果、日常生活において何らかの支障があることがわかった。アレルギー表示の施行により、ある程度健康危機回避ができていたことが伺えた。正確な知識は未だ十分とはいえない状況であった。アレルゲンは、多岐にわたる食品があがっており、食生活のバリエーションが広いことがわかった。表示方法では、欄外に一括表記する方法が最も多く望まれていた。

②アレルギー物質食品表示に関するアンケート調査

アレルギー物質食品表示の認知度は 91.7%と高く、その多く (86.2%) が有用性を認めていた。今後、表示義務へ変更することを望まれる食品は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツの順位であり、エビとカニは上位を占めていた。しかし、40.9%の人が判りづらい表示 (加水分解タンパク質、卵殻カルシウム、乳酸カルシウム、乳糖、デユラムセモリナ、乳酸菌、カカオバター、乳化剤、魚介類) があると回答していた。今後は、より判りやすいアレルギー物質食品表示の方法を検討する必要がある。

分担研究者

亀山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部室長
塩見 一雄	東京海洋大学海洋食品科学科教授
松田りえ子	国立医薬品食品衛生研究所 食品 部室長
安達 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部室長
田辺 創一	広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授

A. 研究目的

厚生労働省は食品衛生法等の改正を行い、平成13年4月から食物アレルギーを起こしやすい物質を加工食品に表示することとした。現在、5品目（小麦、そば、卵、乳及び落花生（以下、特定原材料という。））については、表示が義務づけられているが、20品目（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、バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン（以下、特定原材料に準ずるものという。））については表示が奨励されている。現在、表示が義務づけられている特定原材料5品目については、検査法が確立され、含有の有無を検証することが可能となっている。しかし、表示が奨励されている特定原材料に準ずる20品目は、食品への表示が義務ではなく、検査法も確立していないため、表示に対する信頼性が十分に確保されているとはいえない。本研究では、特定原材料に準ずる20品目の中で、症例数の多い品目やアナフィラキシーなど重篤な症状の報告がある品目を優先的に、加工食品中に含まれるアレルギー物質の検査法を開発することを目的とした。さらに、検査法開発に伴って得られる知見、特に交叉反応性に関する研究成果、消費者や企業からの意見等を参考にして、適切かつ患者にとって分かりやすい表示方法を検討する。

本研究は3つの柱からなる。

- I. 食品中のアレルギー物質検査法開発
- II. 科学的根拠に基づいた表示とするための研究
- III. 消費者に分かりやすい表示に関する検討

B. 研究方法

I. 食品中のアレルギー物質検査法開発

甲殻類 ELISA 法

検知キットの構築

2 研究グループ（研究グループ 1: 日本水産+ 日水製薬、研究グループ 2: マルハニチロホールディングス）でそれぞれ別個に、ブラックタ

イガーから精製した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た。特異性評価から適切なモノクローナル抗体を選択し、ポリクローナル抗体と組み合わせてサンドイッチ ELISA に基づく検知キット（FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」）を構築した。

検知キットによる測定

検知キットの性能を、各種市販加工食品などへの分析に適用して検証した。各試料 1 g をホモジナイザーで均一化後、特定原材料抽出用試薬（森永生科学研究所）より調製した抽出液 19 mL と混合して一晩振とう抽出を行った。次いで 3,000 x g で 20 分間遠心分離して上清を回収し、試料抽出液を得た。試料抽出液を検体希釈液で 20 倍に希釈して試料溶液とした。測定操作は次のように行った。モノクローナル抗体を固相化したマイクロプレートに試料溶液を 100 μ L/well 添加した。常温で 1 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄した。

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溶液を 100 μ L/well 添加し、常温で 1 時間反応させた後、5 回洗浄した。酵素反応のために酵素基質液を 100 μ L/well 添加し、常温で 20 分間放置後、反応停止液を 100 μ L/well 添加した。吸光度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。検量線はブラックタイガーの筋肉から調製した標準溶液を用いて作成した。

甲殻類検知キットのバリデーション

10 箇所の試験室にエビ標準品を添加した共通試料（モデル加工食品）5 種類を配布し、2 種類のキット（FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」）で分析した結果から、それぞれのキットの真度、併行精度、室間精度を求めた。

試料

エビ一次標準粉末を添加した試料として、魚肉ソーセージ、FD 卵スープ、トマトソース、クリームコロッケ、鶏肉団子を作製した（表 1）。エビ一次標準粉末の調製はエビ（ブラックタイガー）を解凍後、腹部第 1 節と第 2 節の間を切断し、殻を除去した後、腹部中心にある腸を除去したエビ尾肉をフードプロセッサにて均一化した。均一化されたエビ尾肉は凍結乾燥後、ミルサーを用いて細砕し、一次標準粉末とした。一次標準粉末のタンパク質量をアマシャムバイオサイエンス社製 2-D Quant kit で定量したところ、0.684 g/g であった。タンパク質濃度お

よび加工による試料の重量変化を考慮して、一次標準粉末添加量を決定した。

試料の均一性評価

試料の均一性が試験室間バリデーションに適用可能かどうかの評価を行った。評価手順を以下に示す。

1. 均一化し小分けした試料から6個を採り、それぞれから1gを2回採取した。
2. 採取した試料を抽出手順に従って抽出した。
3. 各抽出液につき、2ウェル併行でFAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」を用いて定量した。
4. 2ウェルから得られた結果の平均値を用い、2×6の分散分析を行い、試料内の分散および試料間の分散を求めた。

試験室

以下の10機関により試験室間バリデーションを実施した。

- 1) 株式会社日清製粉グループ本社 R&D・品質管理本部QEセンター
- 2) 株式会社ファスマック遺伝子検査事業部
- 3) 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科中毒化学研究室
- 4) 財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター微生物試験課
- 5) 株式会社ニッポンジーン研究試薬部開発課製品開発グループ
- 6) 昭和産業株式会社総合研究所分析センター
- 7) 財団法人食品環境検査協会東京事業所
- 8) 財団法人日本食品分析センター千歳研究所生物科学課
- 9) ロート製薬株式会社製品開発部技術研究グループ
- 10) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社品質保証部検査課

バリデーション手順

参加機関にバリデーション手順に関する文書、試料5種類、キット2種類、各キットの測定マニュアルを送付した。参加機関は試料毎に2回の抽出・測定を行った。測定は3ウェルを用い、同一プレート上で8濃度（ブランクを含む）の検量線の測定も行った。得られた結果（吸光度）を国立医薬品食品衛生研究所食品部に返送した。国立医薬品食品衛生研究所では、参加機関から送付された吸光度データに基づいて検量線（4係数ロジスティック曲線）を作成し、この検量線を使って各試料中の抗原の濃度を計算した。検量線の作成はsimplex法により行った。3ウェルの定量値の平均値を用い、1回目と2回目の抽出による結果を併行試験として扱った。AOAC INTERNATIONALの手順に従い、外れ値を除

外するためにCochran検定およびGrubbsの検定（両者とも有意水準2.5%）を行った後、平均値、併行再現性および室間再現性を求めた。また、JIS Z8402-5の方法による頑健な統計量に基づいた平均値、併行再現性および室間再現性も計算した。

イカ（軟体動物）ELISA法

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。得られた抗体の反応性を各種動物（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）から精製した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。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。試料抽出液の調製およびELISA測定は、「甲殻類検知法（ELISA法）の開発」の項で述べた方法と同様に行った。

サバ（魚類）ELISA法

マサバ精製パルプ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魚類（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）およびウシガエルから精製したパルプ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。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。試料抽出液の調製およびELISA測定は、「甲殻類検知法（ELISA法）の開発」の項で述べた方法と同様に行った。

サケ・サバPCR法

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)ELISA法

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。

ダイズELISA法

ダイズ特異的タンパク質を抗原としたポリクローナル抗体を用い、サンドイッチELISAの系を構築した。また抽出液の改良を行った。新抽出液を用いた系で検量線、各種食品原材料への交差反応性、市販の加工食品に対する反応性を検討した。一定量の大豆粉末を含むモデル加工食品を6種類作製し、回収率を検討した。

クルミELISA法

クルミの2Sアルブミンを抗原としたポリクローナル抗体を用い、サンドイッチELISAの系を確立した。その系を用いて、特定原材料5品目を含めた種々の食品原材料を抽出し、交差反応性を検討した。次に、クルミの入っていない食品に、クルミタンパクが10 ppmとなるように添加してモデル加工食品を作製し、回収率の検討を行った。また、抽出条件が回収率にどの様に影響を及ぼすかの検討も合わせて行った。

ダイズPCR法

ダイズ特異的検知プライマー;Gym81/82を用いたPCR法を確立した。ダイズ由来原料を含む食品素材、調味料および加工食品からのPCR法による大豆の検知実験を行い、市販のELISAキット(Veratox Quantitative Soy Flour Allergen Testkit, Neogen, USA)による測定値と比較した。また、一定量の大豆粉末を添加したモデル加工食品についてPCR法による大豆の検知を行い、この方法の実用性を確認した。

クルミPCR法

既知の植物遺伝子の塩基配列を解析して、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、クルミ検知用プライマーを設計した。設計したプライマーは植物(キウイ、クルミ、リンゴ、ヤマモモ、バナナ、ダイズ)および他のナッツ類(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)から精製したDNAを用いて特異性・検出感度を調べた。また、本プライマーの標的遺伝子の未知であったピーカンナッツの標的遺伝子をクローニングし、その塩基配列を基に分別方法を確立した。実用性は、一定量のくるみ粉末を添加したモデル加工食品についてPCR法によるくるみの検知を行い、この方法の実用性を確認した。

エビPCR法

エビPCR検知法の開発を行った。エビPCR検知用プライマーの感度と特異性について、エビとカニなどの種類を増やして検討するとともに、擬似混入試料中のエビDNAを検知可能か検討した。エビは、アカエビ、アマエビ、アメリカザリガニ、イセエビ、ウチワエビ、オマールエビ、キューバロブスター、クルマエビ、サクラエビ、シマエビ、スキャンピー、テナガエビの12種類、カニは、アサヒガニ、アブラガニ、ケガニ、上海ガニ、ズワイガニ、タラバガニ、ダンジネスクラブ、花咲ガニ、ワタリガニ(ガザミ)の9種類、他の甲殻類としては、アミ、オキアミ、シャコの3種類を試験した。

また、擬似混入試料には、クルマエビ蛋白質10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する鶏団子、クリームコロッケ、魚肉ソーセージ、トマトソース、フリーズドライ卵スープの5種類を用いた。これらからQIAGEN Genomic-tip 20/GによりDNAを抽出し、エビ検知用プライマーを用いてPCRを行なった。PCR反応液組成は、1x PCR緩衝液、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.3 μ M 5' 及び3' プライマー、及び0.625 units TaqDNAポリメラーゼを含む液に、20 ng/ μ Lに調製したDNA試料液2.5 μ L(エビDNAは2.5 pg, 5 pg, 他のカニや擬似混入試料DNAは50 ng)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 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増幅を行ない、終了反応として72°Cで7分間保った。

カニPCR法

カニPCR検知法の開発を行った。カニのPCR検知用プライマーは、カニ、エビを含む甲殻類の配列を収集・比較して、PCRシミュレーションソフトウェア(Amplify 1.0)で特異性を予測した上で設計した。設計したプライマーの特異

性と感度について、カニ 13 種、エビ 14 種、他の甲殻類 3 種、ならびに、タラバガニ凍結乾燥粉末、あるいはベニズワイガニ生肉をカニ蛋白質として 10 ppm (w/w) 相当量添加した鶏肉団子モデル加工食品を用いて検証した。また、市販 27 製品について、エビ PCR 検知法とカニ PCR 検知法で分析を行い、その結果を製品表示や甲殻類 ELISA キットの測定値と比較して妥当性を評価した。

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気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的に算出することができる。

キウイフルーツ ELISA 法

未変性アクチニジン(N-ACT)認識モノクローナル抗体(MAb)の作製

キウイフルーツ検知のための指標タンパク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。アクチニジンは、粉碎したキウイフルーツからリン酸緩衝液で抽出し、精製した。これを BALB/c マウスに投与し、抗体を作製した。初回免疫の後、2 週間の間隔で 3 回追加免疫を行い、最も抗体価の上がった個体に対して N-ACT の追加免疫を行った。4 日後に MAb の作製を行った。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い抗 N-ACT 抗体産生ハイブリドーマを作製した。

サンドイッチ ELISA による MAb の組み合わせの検討

マウス腹水法により抗 N-ACT-MAb を得た後、精製し、ビオチン標識を行った。このビオチン標識抗体を二次抗体としたサンドイッチ ELISA 系を作成し、MAb の組み合わせを検討した。

各食品への交差性の確認

選択した MAb の組み合わせについて、19 種類の食品、18 種類の果物を用いて交差性を評価した。

加熱による影響の評価

63℃・30分、80℃・30分、100℃・30分でキウイフルーツ粗タンパク質溶液を加熱し、検出率への影響を調べた。

イムノクロマト法の検討

選択した抗 N-ACT MAb 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。

変性アクチニジン(D-ACT)認識 MAb の作製

キウイフルーツ粗タンパク質より Model 491 Prep Cell(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株))を用いて各画分を分取し、蒸留水で透析後、凍結乾燥により D-ACT を得た。これを BALB/c マウスに投与し、N-ACT の場合と同様に MAb を作製し、サンドイッチ ELISA により抗体の組み合わせを検討した。

キウイフルーツ標準品作製方法の検討

キウイフルーツ(ヘイワード種)に 2 倍量の冷水を加えホモジナイズ後、凍結乾燥粉末を得た。凍結乾燥粉末 1 g に、0.5% SDS、2%メルカプトエタノールおよび 0.5 M NaCl を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6)を 19 mL 加え、抽出を行った。抽出条件は、16 時間室温にて振とう抽出する際、①そのまま、②Pastorello et al. 2)に従いプロテアーゼインヒビターの E-64 を 2 · g/mL 添加、③E-64 を 10 · g/mL 添加、④沸騰水中で 1 時間加熱抽出の計 4 条件とし、抽出後のタンパク質組成を SDS-PAGE で比較した。また、③と④で抽出したキウイフルーツタンパク質に対する抗 D-ACT 抗体の反応性を検討した。

D-ACT 認識 MAb の利用

免疫抗原原料として使用したヘイワード種のキウイフルーツ(Actinidia deliciosa)の近縁種の Actinidia chinensis 種よりゴールドキウイ(商品名ゼスプリゴールド)とさぬきゴールドの 2 種類、Actinidia arguta 種(サルナン)より香粹、信山および一才の 3 種類、Actinidia

polygama(マタタビ)の熟度の違う未熟、完熟、虫えいの3種類、計8種類との交差性を検証した。さらに、キウイフルーツの表示がある缶チューハイ、ドライキウイ、グミ、ヨーグルト、乳酸菌飲料の5種類の市販食品についてキウイフルーツタンパク質の検出を試みた。

キウイフルーツ PCR 法

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、2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。これら2つの方法により、擬似混入ヨーグルトならびに市販製品の分析を行なった。擬似混入ヨーグルトは、市販ヨーグルトにキウイフルーツタンパク質10 µg/g (w/w)相当のキウイフルーツ果肉のフリーズドライ粉末を添加して調製した。市販製品は、キウイフルーツまたはサルナシの表示のある試料として、ドライフルーツミックス入りシリアル、キウイフルーツ入りクッキー、ドライキウイフルーツ、果物香料入りグミキャンディー、キウイフルーツジャム、サルナシジャム、100%キウイフルーツジュース、ミックスフルーツジュース、10%サルナシジュース、ミックスフルーツ果肉入りヨーグルト、キウイフルーツ果肉入りヨーグルトの11種類、表示のない試料として、ドライフルーツ入りシリアル、グレープフルーツジャム入りクッキー、果物・野菜ジュースの3種類を購入した。これらの試料からDNAを抽出し、2組のキウイフルーツPCR検知用プライマーを用いてPCRを行なった。なお使用したDNA試料は、別途、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かを確認した。

バナナ抗原精製

バナナからタンパク質を抽出し、電気泳動にて分離し主要なバンドに相当するタンパク質をN末端アミノ酸分析により同定した。このうち、33-35 kDaに相当するタンパク質がバナナアレルゲンとしてすでに知られているキチナーゼで

あり、そのIgE結合性をイムノブロットング法で解析した。これをバナナ検知ターゲット分子とすることを目的に、キチンを用いたアフィニティー精製を試みた。また、20kDa付近のバンドであるバナナソーマチンライクプロテインについても精製、抗体作成を試みた。また、新しいアレルゲンの検知法の開発の一環として、近赤外蛍光検出を用いたアレルゲンの検出に関しても検討した。

バナナ PCR 法

既知の植物遺伝子の塩基配列を解析して、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、バナナ検知用プライマーを設計した。設計したプライマーは植物(キウイ、クルミ、リンゴ、ヤマイモ、バナナ、大豆)から精製したゲノムDNAを用いて特異性・検出感度を調べた。また、9種類の市販加工食品を購入しPCR法によるバナナDNAの検知を行い、この方法の実用性を確認した。

大豆及びくるみ検知キットの性能評価

大豆検知ELISAキット及びくるみ検知ELISAキットのバリデーションを行った。

大豆検知キットの場合は11箇所、くるみ検知キットの場合は12箇所の試験室に、大豆及びくるみそれぞれの一次標準粉末を添加した共通試料(モデル加工食品)を配布し、それぞれのキット(FASTKIT エライザ Ver. II 大豆, モリナガ FASPEK くるみ測定キット)で分析した結果から、キットの真度、併行精度、室間精度を求めた。

試料

1) 大豆検知キットの場合

スイートポテト、トマトソース、おしるこ、ソーセージ、白粥を作成した(表;安達1A)。大豆一次標準粉末の調製は以下のようにして行った。国内流通の4品種(エンレイ、ハルユタカ、納豆小粒、トヨムスメ)を等量混合し、フードプロセッサーで均一化を行った。均一化された大豆粉末は、アセトン、ヘキサンにより脱脂を行い、篩(0.3 mm)を通して回収し、一次標準粉末とした。

2) くるみ検知キットの場合

ビスケット、食パン、ケーキ、ジュース、ゼリー、鶏肉団子、白粥を作成した(表;安達1B)。くるみ一次標準粉末の調製はくるみ(チャンドラー種 殻なし)をミルサーを用いて均質化した。均質化されたくるみに10倍量のアセトンを加えて2時間スターラーで攪拌後、ろ紙でろ過し

た。この操作を3回繰り返し、一晚、常温で乾燥させ、くるみ一次標準粉末とした。

試料の均一性評価

試料の均一性が試験室間バリデーションに適用可能かどうかの評価を行った。評価手順を以下に示す。

均一化し小分けした試料から6個を採り、それぞれから1gを2回採取した。採取した試料を抽出手順に従って抽出した。各抽出液につき2ウェル併行で、大豆・くるみそれぞれの検知キットを用いて定量した。2ウェルから得られた結果の平均値を用い、2×6の分散分析を行い、試料内の分散及び試料間の分散を求めた。

試験室

以下の機関により試験室間バリデーションを実施した。

株式会社日清製粉グループ本社 R&D・品質保証本部 QE センター

株式会社ファスマック遺伝子検査事業部

東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科中毒化学研究室

財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター微生物試験課

株式会社ニッポンジーン研究試薬部開発課製品開発グループ

昭和産業株式会社総合研究所分析センター

財団法人食品環境検査協会東京事業所

財団法人日本食品分析センター千歳研究所生物科学課

ロート製薬株式会社製剤開発部基盤技術研究グループ

三栄源エフ・エフ・アイ株式会社品質保証部検査課

オリエンタル酵母工業株式会社社長浜事業所長浜ライフサイエンスラボトリー

和光堂株式会社研究・技術本部開発支援部（くるみ検知キットのバリデーションのみ参加）

バリデーション手順

参加機関にバリデーション手順に関する文書、試料、キット、測定マニュアルを送付した。

参加機関は試料毎に2回の抽出・測定を行った。測定は3ウェルを用い、同一プレート上で8濃度(ブランクを含む)の検量線の測定も行った。得られた結果(吸光度)を国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部に返送した。

国立医薬品食品衛生研究所では、参加機関から送付された吸光度データに基づいて検量線(4係数ロジスティック曲線)を作成し、この検量線を使って各試料中の抗原の濃度を計算した。

検量線の作成は simplex 法により行った。3ウェルの定量値の平均値を用い、1回目と2回目の抽出による結果を併行試験として扱った。AOAC INTERNATIONAL の手順に従い、外れ値を除外するために Cochran 検定及び Grubbs 検定(両者とも有意水準 2.5%)を行った後、平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。

鶏肉 ELISA 法

抗体作製

抗体作製用抗原には、以下のものを使用した。

1) トリ血清アルブミン

2) トリトロポニン T 合成ペプチド

3) トリトロポニン T 精製タンパク質

4) 鶏肉可溶性画分

2) については、アミノ酸配列をデータベース上で検索し、ウシ、ブタおよびヒツジと交差性の少ない領域 2 箇所をターゲットとしてペプチド合成を行った。

3) については、鶏肉熱抽出物より、約 32kDa の画分を精製し、抗原とした。

4) については、鶏肉可溶性画分を未加熱、加熱およびオートクレーブ処理したものをそれぞれ抗原として使用した。

抗原はそれぞれウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。また、それぞれのポリクローナル抗体は、必要に応じて交差吸収操作を行った。

抗体性能評価

抗体性能評価は、FASTKIT ELISA ver. II の方法に従って行った。鶏肉標準(加熱・未加熱)物質をそれぞれ用いて検量線の作成を行った。また、その他畜肉および特定原材料からそれぞれ ELISA 用抽出液を用いて抽出した抽出液を交差性評価用として使用した。

牛肉 ELISA 法

ウシミオグロビン部分ペプチドの選択と合成ウシミオグロビンから他の畜種とアミノ酸残基の異なる配列を2部位選択し、2種類(ペプチド A、ペプチド B) のペプチドを合成した。

ウシミオグロビンの精製

ウシモモ肉を材料としてウシミオグロビンの精製を行った。ミンチにした肉に2倍量の蒸留水を加えて氷冷しながら30分間攪拌した。遠心後、ろ過した上清に硫酸濃度が90%となるように加え、氷冷しながら1時間攪拌した。遠心後、ろ過した上清を pH6.85 に調整し、硫酸濃度が95%となるように加え氷冷しながら1時間攪拌した。遠心後、沈殿を少量の蒸留水で溶解したものを硫酸沈殿画分とした。硫酸沈殿画分を

50mM Tris-HCl (pH8.3) (A 液) に置換した後、同じバッファーで平衡化したアニオン交換カラムにインジェクトし、A 液から B 液 (50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl (pH8.3)) のグラジエントをかけ、イオン強度により分離した。純度は電気泳動で検定し、N 末端アミノ酸解析により確認を行った。

抗ペプチド A ポリクローナル抗体の作製

市販キットを用いてペプチド A を KLH にコンジュゲートした複合体をアジュバンドとともにウサギに免疫し、抗血清を調製した。抗血清より特異的アフィニティーカラムを用いて抗ペプチド A ポリクローナル抗体 (抗ペプチド A pAb) を精製した。

抗ペプチド B モノクローナル抗体の作製

市販キットを用いてペプチド B を KLH にコンジュゲートした複合体をアジュバンドとともにマウスに免疫した。その後の方法は常法に従い、最終的に腹水からアフィニティーカラムを用いて抗ペプチド B モノクローナル抗体 (抗ペプチド B mAb) を精製した。

抗変性ミオグロビンに反応する抗体の作製

ウシミオグロビン溶液に SDS が 1% となるように添加し、95℃・10 分間加熱処理したものを変性ウシミオグロビンとした。モノクローナル抗体の作製は、変性ウシミオグロビンを免疫原としマウスに免疫した。その後の方法は常法に従い、最終的に抗変性ウシミオグロビンに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体を作製するために、変性ウシミオグロビンを外部機関に送付して抗血清作製を委託した。得られた抗血清から、特異的アフィニティーカラムを用いて変性ウシミオグロビンに反応するポリクローナル抗体を精製した。

標準タンパク質の作製

ミンチにした牛肉に等量の蒸留水を加えホモジナイズしたものを凍結乾燥処理した。凍結乾燥品 200mg に対し、0.5% SDS と 2% 2-メルカプトエタノールを含む PBS (pH7.2) を 20ml 加え、一晚振盪抽出した。遠心後、ろ過したろ液をウシ標準タンパク質とした。なお、豚肉と鶏肉についても同様の処理を行った。

モデル食品と測定サンプルの作製

ミンチにした豚肉もしくは鶏肉に、牛肉を 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001% となるように混

合し、調味料を添加してモデル食品用の練肉を作製した。対照として、牛肉、豚肉および鶏肉 100% の練肉も作製した。加熱区として 80℃・30 分と 120℃・30 分の 2 区を設け、また、対照として未加熱区を設けた。

均一化したモデル食品 2g に対し、0.5% SDS と 2% 2-メルカプトエタノールを含む PBS (pH7.2) を添加して一晚室温にて振盪抽出した。遠心後、ろ過したろ液をそれぞれのモデル食品の測定サンプルとした。

モデル食品からの牛肉タンパク質検出・定量

サンドイッチ ELISA は、固相抗体に抗ペプチド A pAb、標識抗体に抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体を用いた系 (ポリポリサンドイッチ、検出限界: 約 15ng/ml) と、固相抗体に抗ペプチド B モノクローナル抗体、標識抗体に抗変性ウシミオグロビンモノクローナル抗体を用いた系 (モノモノサンドイッチ、検出限界: 30ng/ml) の 2 種類を構築した。これらのサンドイッチ ELISA を用いてモデル食品の測定サンプルに含まれる牛肉タンパク質を検出・定量した。

特定原材料と牛肉エキスからの検出

特定原材料である卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目と牛肉エキス 5 種類から、前述の測定サンプルの作製方法と同様の処理により、タンパク質を抽出して測定サンプルを作製した。さらに、それぞれのサンドイッチ ELISA により測定サンプルに含まれる牛肉タンパク質の検出を行った。

豚肉 ELISA 法

検出ターゲット質の選定

豚肉のタンパク質の中から検出ターゲットとして、ミオグロビン、血清アルブミン、トロポミオシン、豚肉タンパク質抽出物などを選択し、タンパク質変性してウサギに免疫し、ポリクローナル抗体の作成を行った。

なお、豚肉だけでなく調味料として使用されているポークエキスについても検討したが、タンパク質が分解していてターゲットには適さないことがわかった。

豚肉タンパク質に対する抗体の作成

選定した豚肉のタンパク質を PBS 中で、1% の SDS および 0.1% の 2-メルカプトエタノールで変性し、アジュバンドとともにウサギに繰り返し免疫し、抗血清を採取した。

特異抗体のアフィニティー精製

Actigel ALD に変性した抗原をカップリングしたものをカラムに充填し、抗血清を流して特異抗体を結合後、洗浄し、グリシン塩酸緩衝液 pH2.5 で溶出し、直ちにトリスで中和した。この抗体を固相化抗体として使用した。

抗体の酵素標識

抗血清から HiTrap Protein G カラムで IgG を精製し、pH4.5 の酢酸緩衝液中でペプシンで分解した。これをメルカプトエチルアミンで還元し、抗体分子を Fab' の形にした後、抗原カラムでアフィニティー精製した。マレイミド基を導入したペルオキシダーゼを加えて結合し、Superdex 200HR カラムで精製し酵素標識抗体とした。

ELISA 系の構築

特異抗体を炭酸重炭酸緩衝液 pH9.6 で希釈し、ELISA プレートに 0.1mL 加えて、4℃で一晩固相化した。ブロッキング剤は動物由来のタンパク質を含有していない日本油脂製のブロッキング試薬 N101 を使用した。

次いで、豚肉タンパク質標準品と検体抽出液を加えて 37℃2 時間反応させ、洗浄後、酵素標識抗体を加え、室温で 2 時間反応させた。発色は TMB 基質を用い、硫酸で反応停止した後、吸光度を測定した。

抗体の吸収処理

抗ブタアルブミン血清の交差を低減するため、吸収処理を行った。ウシ・ヒツジ・ウマの血清タンパク質を Actigel ALD にカップリングして、カラムに充填し、抗血清を通過させ、交差する抗体成分を吸収除去した。吸収前後の抗体の交差性を、各種の肉タンパク質の Western Blot で判定した。

加熱した豚赤肉の検出

ミンチした豚赤肉を 60-121℃の温度で 20 分間加熱した。SDS・2-メルカプトエタノール入りの抽出液でタンパク質を抽出してアルブミン検出用 ELISA を行い、豚肉タンパク質を測定した。

各種食肉との交差性

ミンチした豚・牛・鶏・羊・馬生肉からタンパク質を抽出してアルブミン検出用 ELISA を行い、交差性を調べた。

各種食品との交差性

肉以外の魚介類や野菜、果物、香辛料など様々な食品からタンパク質を抽出し、アルブミン検出用 ELISA を行い、交差性を調べた。

ゼラチン ELISA 法

種々ゼラチンおよびゼラチンの部分配列を基にした合成ペプチドを抗原としていろいろな動物に免疫し、得られたポリクローナル抗体を用いて ELISA の系を開発し、特異性の高い測定系の構築を試みた。非特異反応、交差反応等で反応してしまう食材に関しては、抗体の吸収操作で反応性の低減を試みた。

鶏肉・牛肉 PCR 法

プライマーの設計

トリ、ウシともに、16S リボゾーム RNA のうち約 100bp を増幅する領域を標的とした。

試料

畜肉、家禽肉、魚介類および穀類を交差性確認用試料として使用した。鶏肉に関しては、鶏肉を含む市販食品を、牛肉に関しては乳製品も試料として使用した。

モデル食品の作製

鶏肉を含むモデル食品を作製した。鶏肉モデル食品は、アセトンで脱脂後凍結乾燥させた鶏肉粉末を、同様の処理をした豚肉粉末に、タンパク質含量レベルで 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% および 0.0001% の比率で混合させて作製した。混合粉末は蒸留水に溶解し、煮沸(100℃, 20分)およびオートクレーブ(120℃, 20分)処理した。

DNA 抽出

検体をミルサーで粉碎後、2g ずつ採取した。ゲノム DNA は、Genomic-tip 20/G キット (QIAGEN) を用い、製品マニュアルに従って抽出を行った。

PCR 反応

トリ、ウシいずれのプライマーを用いた場合に置いても、PCR 反応は、Ex Taq HS (タカラバイオ) を酵素として使用し、反応液はサーマルサイクラーを用いて 95℃ 3 分間の処理後、95℃ 30 秒、69℃ (ウシの場合 71℃) 30 秒、72℃ 30 秒の反応を 40 サイクル繰り返して行った。PCR 反応産物は、2%アガロースゲルを用いた電気泳動により確認した。

豚肉 PCR 法

検出用 Primer の設計

ブタミトコンドリア DNA のチトクロム b 領域の塩基配列から、Forward・Reverse 各 3 本ずつ Primer を選択し、豚肉由来の DNA を PCR で増幅した。その中から、次の Primer Set が検出に最適であると判断した。

Forward Primer

5' -TCTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3'

Reverse Primer

5' -TTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3'

PCR 条件と検出

PCR は反応に必要な試薬を混合した後、94°C4 分の後、94°C30 秒・50°C30 秒・72°C1 分のサイクルを 37 回繰り返した。反応産物は電気泳動し、エチジウムブロマイドで検出した。

PCR による餃子中の豚肉の検出

餃子の具に豚肉を 10%の濃度から 10 倍ずつ段階的に量を減らして添加し、加熱して餃子を調製した。フードプロセッサで均一にした後、Genomic-Tip 20/G (Qiagen)により DNA を抽出した。DNA の濃度を 10ng/μl に調整し、PCR を行った。

PCR の各種の肉との交差性

豚・牛・鶏・羊・馬・猪肉から DNA を抽出し、豚肉用 PCR を行い、交差性を調べた。

各種食品との交差性

魚介類や野菜、果物、香辛料など様々な食品から DNA を抽出し、PCR の交差性を調べた。

豚肉 Real-Time PCR 法

リアルタイム PCR 法については鶏肉・豚肉・牛肉・羊肉・馬肉について検討を加えたが、ここでは豚肉についてのみ記述することとした。

Real-Time PCR 系の構築と豚肉の検出

豚肉推定含有量を定量するため、Real-Time PCR の TaqMan MGB Probe を作成した。配列は以下の通りである。

Forward Primer:

5' -CTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3'

Reverse Primer:

5' -CGTTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3'

TaqMan MGB Probe:

5' -(FAM)-ACAGCTTTCTCATCAGTTAC-(NFQ)(MGB)-3'

これを用いて豚 DNA を、1ng/μl の濃度から 10 倍ずつ段階的に希釈し、Real-Time PCR を 40 サイクルまで行った。

Real-Time PCR による餃子中の豚肉の検出

前記の方法で抽出した DNA を 10ng/μl に調整し、Real-Time PCR を行った。

II. 科学的根拠に基づいた表示とするための研究

甲殻類の IgE 結合能でみた交差抗原性の検討

血清は、甲殻類に対してアレルギーの既往をもつ患者と、甲殻類に対して IgE 抗体が陽性を示す血清を使用した。患者血清数は 87 検体で、男 59、女 29、男女の記載なし 1 のうち 3 検体が採血時期の異なる重複検体であった。

各抗原（ホッコクアカエビ（アマエビ）、大正エビ、ブラックタイガー、シバエビ、アカエビ（ムキエビ）、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）のミックス）、タラバガニ、ケガニ、以上は非加熱の食品から、ホッコクアカエビ、ヨーロッパイチョウガニ、シャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテは加熱後の食品から抽出した）抽出と CAP 支持体へ固相化はスエーデンダイアグノスティック社へ依頼した。

大腸菌で作製したブラウンシュリンプのリコンビナントトロポミオシンも同様に固相化した。

魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

1 歳—2 歳でイクラによりアナフィラキシーを生じた患者 A と B から血清を採取し ELISA inhibition を行った。コントロールにイクラ特異的 IgE 抗体の高い魚アレルギー患者 C の血清を用いた。患者 A と B はいずれも 1 歳半のとき、イクラを摂取によるアナフィラキシーで受診し、患者 C は魚アレルギーのためイクラ特異的 IgE を測定した結果、高値であったためイクラは摂取させていない。

また、魚、魚卵及び鶏卵アレルギーで受診した患者 (n=27) の血清を用いて、各抗原に対する特異的 IgE 抗体を RAST で測定し、その値を比較した。

魚類間の交叉反応性に関するパルプアルブミン以外の魚肉タンパク質

症例

マグロ（スズキ目サバ科マグロ属）とカジキ（クロカワカジキ：クロカジキ）（スズキ目マカジキ科クロカジキ属）に対してアレルギー（アナフィラキシー）を呈する。同じスズキ目サバ科に属するマサバを食べても無症状。採血時に研究内容を説明し患者あるいはその養育者から同意書をとって実施した。

魚抗原

ギンザケ（サケ目サケ科タイヘイヨウサケ属）、ヤマトカマス（スズキ目カマス科カマス属）、マサバ（スズキ目サバ科マサバ属）、ホンマグロ（スズキ目サバ科マグロ属）、クロカジキ（スズキ目マカジキ科クロカジキ属）、スケトウダラ（タラ目タラ科スケトウダラ属）の抽出はこれまでの

方法と同様に抽出した。

ELISA inhibition および Immunoblot inhibition

アレルギー性の共通抗原性の検討。

ナッツ類アレルギーの臨床的・血清学的交差反応性の検討

ピーナッツを含めてその他のナッツ類にアレルギー症状が疑われた患者を複数の施設から集積し、ナッツ類及び豆類に対する IgE 抗体価を、CAP-FEIA 法を用いて網羅的に測定した。

測定を行った項目は、次の通りである。

ピーナッツ、大豆、アーモンド、ハシバミ、ココナッツ、インゲン、カカオ、エンドウ、ブラジルナッツ、クルミ、ゴマ、カシューナッツ、ピスタチオ、マカダミアナッツ、クリ、松の実、ペカン、MUXF3(プロメライン由来のオリゴ糖で、Cross-reactive Carbohydrate Determinant を代表する)

ナッツアレルギーの診断は、詳細な摂取歴の問診と食物負荷試験を施行して確定診断に努めた。食物負荷試験は、ピーナッツではピーナッツバター又はローストしたピーナッツを、アーモンドや他のナッツではナッツそのものを用いて、ごく微量から 0.25g、0.5g、1g、2g まで(最大量 5g まで)を 20 分毎に摂取するオープンチャレンジで施行した。

全種類のナッツを測定できた 42 検体について、IgE 抗体価の相関係数を算出した。相関係数は、抗体価の高いデータの影響を少なくするために、抗体価(UA/ml)を Log 換算した上で計算した。

(倫理面への配慮)

経口負荷試験は文書による同意書を患者あるいはその養育者からとった後実施した。

乳糖・微量牛乳経口負荷試験

対象

最近の牛乳負荷試験陽性または牛乳摂取で過敏症状の既往を有する牛乳アレルギー患者 31 例(男児:17 例 女児:14 例)、平均年齢:4 歳 2 ヶ月、平均総 IgE 値: 670 IU/ml、平均牛乳特異的 IgE 値: 29.3 UA/ml、アナフィラキシー歴あり:13 例 (42%)。

経口負荷試験

乳糖経口負荷試験(乳糖 3g=乳タン白質 24 μ g)、牛乳微量負荷試験(乳タンパク質 1.7~333 μ g 漸増法)、牛乳普通量負荷試験(乳タンパク質 3.3~2963mg 漸増法、投与全量;牛乳 100mL)。

(倫理面への配慮)

経口負荷試験は患者あるいはその養育者から同意書をとって行った。

アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

32 食品の鶏卵と牛乳のタンパク質含有量を FASTKIT エライザ Ver. II で測定した。

エビ摂食による即時型アレルギー症状を呈した症例に関するアンケート調査

平成 19 年 9 月から平成 19 年 12 月に関係協力機関に依頼して、健康被害に関する調査を行った。

(倫理面への配慮)

アンケート用紙には氏名の記入は不要とし、個人の同定はできない配慮をした。

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砕機で十分に破碎し、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(「甲殻類検知法(ELISA 法)の開発」の項を参照)。データの解析は 4 係数ロジスティック解析で行った。

甲殻類のアレルゲン解析

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、イムノプロットティングによるアレルゲン検索、cDNA クローニングによる主要アレルゲン（トロポミオシン）の一次構造解析を行った。ブラックタイガーについては、新しく見いだした 20 kDa アレルゲンの精製・同定・性状解析を行った。

イムノプロットティング

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℃、10分間）後、冷却遠心分離（18,000 g、4℃、20分間）により得られた上清を加熱抽出液として用いた。加熱抽出液はPhastSystem装置（GE-Healthcare）を用いてSDS-PAGE（PhastGel Gradient 8-25ゲルを使用）で泳動後、PhastSystemの取扱説明書に従ってタンパク質を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℃、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℃、1時間反応させた。検出にはECL plus western blotting detection system（GE-Healthcare）を用いた。阻害イムノプロットティングの場合は、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℃、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プロット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。

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プロットティングで分析し、甲殻類における 20 kDa アレルゲンの分布を調べた。

貝類のアレルゲン解析

巻貝4種（古腹足目ミミガイ科のクロアワビ、サザエ科のサザエ、新腹足目エゾバイ科のエゾボラおよびエゾバイ）、二枚貝7種（フネガイ目フネガイ科のアカガイ、カキ目イタボガキ科のマガキ、マルスダレガイ目ザルガイ科のトリガイ、バカガイ科のウバガイおよびミルクイ、マテガイ科のマテガイ、マルスダレガイ科のアサリ）の合計11種貝類について、イムノプロットティングによるアレルゲン検索、cDNA クローニングによる主要アレルゲン（トロポミオシン）の一次構造解析を行った。クロアワビについては、新しく見いだした 100 kDa アレルゲンの精製・同定を行った。

イムノプロットティング

クロアワビは貝殻筋、マガキは閉殻筋、ミルクイは水管、アサリは可食部、その他は足筋から調製した加熱抽出液を用い、甲殻類の場合と同様にイムノプロットティングを行った。阻害イムノプロットティングには、サザエ、スルメイカまたはアメリカンロブスターの精製トロポミオシンを阻害剤として用いた。

cDNA クローニング

筋肉から 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、既知の貝類トロポミオンをコードする 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。

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。

魚卵のアレルゲン解析

魚卵抽出物の調製

シロザケ、イトウ、ニジマス、スケトウダラ、アサバカレイ、ホッケ、シシャモおよびカペリンから採取した卵黄形成途上の卵にそれぞれ 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 x 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 x g で 30 分間遠心分離した上清を魚卵抽出物とした。

SDS-PAGE: SDS-PAGE 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。

ウェスタンブロットング

SDS-PAGE 後のゲル中タンパク質成分を、セミドライブロットング装置によって 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 分間ブロッキングした後、膜に転写したタンパク質成分を患者 (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患者) の血清と 4℃ 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ヒト IgE (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 キット: Millipore Corporation) 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。

魚類パルブアルブミンの IgE 反応性に及ぼす Ca²⁺の影響

パルブアルブミンの IgE 反応性に及ぼす Ca²⁺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 μg/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 μL 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 μL 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。

III. 消費者に分かりやすい表示に関する検討 食物アレルギーと自覚する主として成人の実態 -生活状況、アレルゲン、アレルギー表示に関する知識・意向-

調査は、全て Web サイトを利用した。この Web サイトは、Yahoo リサーチ (登録モニター数約 53 万人) を利用した。

生活状況等調査

平成 18 年 10 月に、Yahoo リサーチモニター約 2 万人に対して「えび」「かに」によるアレルギー症状の有無を聞き、回答が得られた者のうち 20 歳台から 30 歳台の男女約 10 名を抽出し、オンラインによる 3 日間のディスカッションを実施した。

アレルゲンと表示に関する知識

平成 18 年 12 月に Yahoo モニターのうち 16 歳以上 50 歳台で食物アレルギーがあると自覚している約 3000 人を対象サンプルとして抽出し、そのうち回答のあった約 2256 名について分析を行った。

アレルゲンについては特定原材料等について、そして別途「その他」として自由項目にて複数

回答を求めた。

アレルギー表示では、代替表記や省略表記として特定加工食品などが認められている。どの程度、認知できるのか、○×形式で回答を求めた。

好ましいアレルギー表示方法について

アレルゲンと表示に関する知識に関する調査において食物アレルギーがあると自覚している者として抽出できた者に対して、平成19年1月再度調査を実施し、回答の得られた1848名を対象に分析を行った。

表記の方法は厚生労働省アレルギーパンフレットを参考に、ポテトサラダについて4種類を示した。また、表示についての理解がどの程度がわからないため、特定原材料等及び代替表記や省略表記について説明した上で、選択してもらった。

アレルギー物質食品表示に関するアンケート

消費者を対象にアレルギー物質食品表示に関するアンケート調査を行い、表示制度の有用性、問題点などを明らかにする。

(倫理面への配慮)

アンケート用紙には氏名の記入は不要とし、個人の同定はできない配慮をした。

C. 研究結果

I. 食品中のアレルギー物質検査法開発

甲殻類 ELISA 法

FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」の性能：標準液濃度として0.78-50 ng/mLの範囲で良好な反応性を確認した。検出限界は0.78 ng/mL以下であった。甲殻類総タンパク質濃度として標準溶液を用いて再現性を確認した。その結果、同時再現性はCV値が10%以下、日差再現性もCV値が10%以下であり、良好な精度を確認した。

精製トロポミオシンに対する反応性は、甲殻類はタンパク質濃度として1 ppm 溶液、軟体動物はタンパク質濃度として1,000 ppm 溶液を用いて検討した。その結果、開発した検知キットは、えび類(ブラックタイガー、クルマエビ、アメリカンロブスター)、かに類(ズワイガニ)、やどかり類(タラバガニ)、おきあみ類(ナンキョクオキアミ)の精製トロポミオシンに反応することを確認した。一方、いか類(スルメイカ)、たこ類(マダコ)、貝類(クロアワビ、エゾバイ、アサリ、ホタテガイ、マガキ)などの軟体動物では0.1%未満の交差率であった。また、食品サンプル(84検体)を用いた試験では、甲殻類に分類されるえび類、かに類、やどかり類、しゃこ類、おきあみ類、ふじつば類の19検体は測

定上限(甲殻類総タンパク質濃度として20 ppm)を超える反応であった。一方、甲殻類以外の検体はすべて1 ppm 未満であった(表;塩見2)。

加熱の影響を調べるために、標準溶液(10 ppm)を、1)60℃、30分、2)100℃、30分、3)121℃、10分にそれぞれ供し、甲殻類検知キットで測定した。その結果、未処理の標準液に対する回収率を100%とした場合、60℃、30分で処理した標準液に対する回収率は93.3%、100℃、30分で93.9%、121℃、10分で80.0%であった。

甲殻類キット「マルハ」の性能

各種甲殻類、軟体動物との反応曲線を図;塩見1に示す。本測定法は、程度に差はあるものの甲殻類全般に反応性を示し、特に十脚目で強い反応性を認めた。一方、軟体動物には反応性を示さなかったことから、本測定法は甲殻類に特異性の高い系であることが確認された。

特定原材料および特定原材料に準ずるもの(上述の甲殻類、軟体動物を除く)を含む各種原材料(肉・卵・乳製品9種類、穀類・豆7種類、果実・ナッツ9種類、スパイス2種類、野菜・きのこ・芋11種類、魚介類・藻類8種類)との交差反応性について検証を行ったが、交差反応性を示すものは認められなかった。

次に、各種市販加工食品(冷凍食品13種類、内甲殻類の表示のあるものが5種類;スプレードライ食品3種類、内表示あり2種類;レトルト食品5種類、内表示あり3種類;菓子3種類、内表示あり1種類;インスタント麺3種類、内表示あり1種類)を用いて本測定法における反応性を検討した。

その結果、原材料名に甲殻類の表示のある品目に関してはいずれも甲殻類タンパク質が検出された(61-143,000 ppm)。また、これら品目を対象に希釈試験を実施したところ、いずれの食品も良好な希釈直線性($r^2=0.991-1.000$)を示し、本測定法は市販食品においても食品マトリックスの影響を受けることなく、正確に甲殻類タンパク質を測定可能であることが示唆された。また、今回検証を行った範囲では、甲殻類の表示のない品目では甲殻類タンパク質は検出されなかった(<1.0 ppm)。

甲殻類検知キットのバリデーション

試料の均一性評価結果

各試料の抗原濃度の均一性評価結果を表;塩見3に示す。この結果、5試料すべてについて、試料間の分散は試料内の分散に比較して有意に大きくなかった。さらに、試料内と試料間を含めた全体の変動は6%以下であった。この結果

により、これらの試料は試験室間バリデーションのための試料として使用可能と考えられた。

試験室間バリデーション結果

5種類の試料について、添加量に対する回収率、併行精度 (RSDr)、室間精度 (RSDR) を評価した。それぞれのキットのバリデーション結果を表；塩見 4 および表；塩見 5 に示す。

甲殻類キット「マルハ」による回収率は、クリームコロッケで 82%、その他の試料では 90% 以上であり、極めて良好な真度であった。2 回抽出間の併行精度はいずれの試料においても RSD10% 以下であった。室間精度は併行精度よりもかなり大きく、15-25% の範囲であった。

FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」の回収率は 90% 以下であり、すべての試料において甲殻類キット「マルハ」の回収率よりも低い結果となった。しかし併行精度 RSD は 3-6% と良好で、室間精度もすべての試料で 10% 以下であり、高い精度が得られた。

イカ (軟体動物) ELISA 法

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) ELISA 法

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 PCR 法

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知を目的として 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知を目的とした 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；塩見 10 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；塩見 2 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 fg/μl (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; 塩見 3)。

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 4)。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; 塩見 5)。

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; 塩見 5)。

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; 塩見 10)。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; 塩見 6)。

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) ELISA 法

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。