

ダイズ ELISA 法

検量線の形状、バックグラウンドの値、トップの吸光値ともに良好であった(図; 穂山 1)。感度は、0.78 ng/mL であった。特定原材料 5 品目をはじめとし、調査したほとんどの食品原材料に対して反応はしなかった。また、ダイズとして測定すべき品目である黒豆、枝豆、もやしなども十分に反応した。

ダイズ以外の豆類との反応性も少なく、調べた 10 種類の豆類中では、ささげ豆のみが反応した。原材料に大豆と表記されている市販食品は、醤油を除いてすべて測定可能であった(表; 穂山 1)。モデル加工食品を作製し、回収率を検討した。6 種類のモデル加工食品に対して 67~102%の良好な回収率を示した(表; 穂山 2)。

クルミ ELISA 法

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

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

特定原材料 5 品目を含めた種々の食品原材料として、穀類・芋類・澱粉、豆類・種実類・魚介類・肉類・卵類・乳製品類・野菜類・きのこ類・果実類・コーヒー・ココア・茶類・海藻類・香辛料類・調味料類・増粘多糖類と約 160 品目の交差反応性を調べたが、ピーカンナッツ以外反応性を示す物はなかった。

白粥・鶏肉団子・パン・スポンジケーキ・オレンジジュース・ビスケットと 6 種の食品でクルミタンパクが 10 ppm 含まれるモデル加工食品を作製し、回収率を検討したところ、91.2~131.7%と良好な回収率が得られた(表; 穂山 3)。

抽出条件が回収率にどの様に影響を及ぼすかの検討を行ったところ、抽出時間(図 3)、抽出温度(図; 穂山 4)、抽出後の放置時間(図; 穂山 5)は測定値に大きな影響を及ぼさないことが判った。

ダイズ PCR 法

検出限界およびダイズ特異性の検証によって 1 対のダイズ検知プライマー

Gym81/82 が選抜された。この 7 プライマーは Glycine max repetitive sequence(Accession No.; L06326)を検知するもので、検出限界は小麦粉中のダイズ粉の混入量として 10ppm(ダイズタンパク質として 3.5 ppm)が確認された(図; 穂山 6)。

また特異性の点においては、穀類 7 種(コムギ、ライムギ、オオムギ、オーツムギ、トモロコシ、コメ、ソバ)、ナタネ、種実類 8 種(アーモンド、カシュー、マカダミア、ピスタチオ、ヘーゼル、ブラジル、ピーカン、クルミ)およびダイズ以外の豆類 10 種(虎豆、手亡、あずき、ささげ、そら豆、えんどう、レンズ豆、ルーピン、ガルバンゾー、落花生)では PCR による増幅は認められず、ダイズ 9 品種(とよこまち、とよむすめ、りゅほう、たちはがな、えんれい、ふくゆたか、むらゆたか、Vinton, Navy)でのみ増幅(増幅産物サイズ: 118bp)が確認された(図; 穂山 7)。

Gym81/82 を用いた PCR 法により、加工度の高いレトルト食品や大豆を発酵した醤油や味噌、大豆レンチンからも大豆が検知された。油揚げと風味調味料 A については、PCR 反応に適した DNA が得られず大豆の検知はできなかった。一方市販の ELISA キットでは、多くの加熱加工食品、調味料、食品素材において大豆は検出限界以下であった(表; 穂山 4)。

モデル加工食品については、イチゴジャムを除く 6 種類の食品から、PCR 法によって大豆を検知することができた(表; 穂山 5)。

クルミ PCR 法

遺伝子配列の明らかな、matK 遺伝子に着目し、クルミ科ナッツの特異的検出のための PCR 用プライマーをデザインした(表; 穂山 6)。このプライマーセットの特異性を確認した結果を図; 穂山 1 に示す。このプライマーセットを使用した PCR で、クルミ科ナッツを特異的に検出できることが証明できた(図; 穂山 8,9)。さらに、精製 DNA を使用して、この PCR の検出限界を確認し、クルミ、ピーカンナッツとも 0.1 pg(10 ppm 相当)まで検出できた(図; 穂山 10)。しかし、現在の日本商品標準分類では、ピーカンナッツはクルミには分類されておらず、ピーカンナッツとクルミの分別検出方法が必要である。

PCR の標的遺伝子とした matK 遺伝子の塩基配列はクルミでは多くの食用品種で公知化されているが、食用ピーカンナッツである「illinoiase」では遺伝子配列が未知である。そ

ここで、matK を標的として、クルミとピーカンナッツの分別ができるかどうかを確認するため、クルミプライマーで増幅される領域を含むピーカンナッツの matK の遺伝子配列を確認した(図; 穂山 11)。その結果、クルミとピーカンナッツでは増幅される遺伝子領域では 1 箇所の違いがあることが判明した。この置換によってピーカンナッツ遺伝子ではクルミ遺伝子配列に存在する制限酵素 Acc1 の認識部位が消失していることが判明した。

クルミとピーカンナッツの PCR で増幅される遺伝子領域には制限酵素 Baf1 の認識部位が共通して存在しており、Acc1 と Baf1 を利用することで、クルミとピーカンナッツの分別検出ができることが予想された。表; 穂山 7 にクルミおよびピーカンナッツの PCR 増幅産物の制限酵素での切断サイズを示した。我々はこのことを検証するため、クルミ DNA から増幅させた増幅産物とピーカンナッツから増幅させた増幅産物とを用いて制限酵素による切断を行った(図; 穂山 12)。

その結果、クルミおよびピーカンナッツには制限酵素 Baf1 の切断部位があるが、制限酵素部 Acc1 の切断部位はクルミにはあるが、ピーカンナッツでは消失していることが明らかとなり、これらの制限酵素を用いることで、クルミとピーカンナッツの簡便な分別方法を確立した。また、モデル加工食品については、検討した 6 種類全ての食品で、PCR 法によってくるみを検知することができた(図; 穂山 13)。

エビ PCR 法

試験したエビ 12 種全てにおいて、2.5 pg の DNA から標的とした約 200 bp の PCR 産物が得られた。また、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 5 種類すべての疑似混入試料からも、標的 PCR 産物が得られた(図; 穂山 14)。

一方、試験したカニ 9 種と他の甲殻類 3 種のうち、上海ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニの 3 種からも、エビと同様に標的 PCR 産物が得られた。得られた PCR 産物を、エビに特徴的な配列を認識して切断する制限酵素で消化した結果、ダンジネスクラブとワタリガニ由来の PCR 産物は切断されず、上海ガニ由来の PCR 産物だけが、エビ由来産物と同様に切断された(図; 穂山 15)。

カニ PCR 法

試験したカニ 13 種全てにおいて、5 pg の DNA から標的とした約 60 bp の PCR 産物が得られた。また、カニ蛋白質 10 ppm(w/w)相当量のタラバ

ガニ、あるいはベニズワイガニを含有するモデル加工食品の鶏肉団子より抽出した DNA から、標的 PCR 産物が得られた(図; 穂山 16)。

一方、特異性の試験に供したエビ 14 種、他の甲殻類 3 種のうち、オマールエビ、スキャンピー、シャコの DNA から、カニと同様に標的 PCR 産物が得られた(図; 穂山 17)。オマールエビとスキャンピーで得られた標的 PCR 産物は、鋳型 DNA 量 50 ng の時でも非常に薄く、5 ng では確認できないレベルであったが、シャコについては、鋳型 DNA 量 50 ng~5 pg の広い範囲で標的 PCR 産物が得られた。なお、PCR シミュレーションの結果から、食用甲殻類のうち、セミエビの一部からも標的 PCR 産物が得られると予想されたが、セミエビの近縁種であるウチワエビのサンプルを入手し試験した結果、標的 PCR 産物は得られなかった。

また、市販 27 製品についてのエビ PCR 検知法、カニ PCR 検知法による分析結果(エビ PCR 由来産物の塩基配列解析結果も含む)と、製品表示やニッスイ製 EIA-甲殻類キット測定値などを比較評価した結果、一部、検査不能や整合性の取れないものもあったが、25 製品で妥当な結果となった。

水晶発振子を用いたバイオセンサー法の検討

ビオチン化されたオボアルブミン抗体を水晶板に固定化し、オボアルブミンを添加したところ、オボアルブミンの濃度依存的に周波数の減少量が観測された(図; 穂山 18)。

キウイフルーツ ELISA 法

N-ACT に対する MAb の作製

8 株の抗アクチニジン MAb を得た。

N-ACT 認識 MAb の組み合わせの検討

56 通りの組み合わせの中から、キウイフルーツのみ検出する組み合わせと、キウイフルーツと同属のサルナシも検出する組み合わせの 2 種類を選択し、サンドイッチ ELISA を構築した。

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。しかし、ブロッキング剤の検討により擬陽性反応はなくなり、キウイフルーツ属以外の食品との交差性は認められなかった。

加熱による影響の評価

いずれの抗体の組み合わせでも 63°C・30 分で 60%、80°C・30 分で 20%、100°C・30 分で 5%の検

出率となり、加熱温度が高くなるに従い検出率が低下した(図; 安達 1)。このことから、N-ACT に対する抗体は、加工食品中のキウイフルーツの検出には適さないことが示された。

イムノクロマト法の検討

N-ACT に対する ELISA の場合と同じ抗体の組み合わせを用いて、イムノクロマトキットを作製した。このイムノクロマトキットでは、キウイ総タンパク質で 1 ppb まで検出できることを確認した。

D-ACT 認識 MAb の作製

抗 N-ACT 抗体が加工食品中のキウイフルーツの検出に適さないことが示されたので、D-ACT に対する抗体を作製し、D-ACT 認識 MAb を 18 種類確立した。18 × 17 = 342 通りの組み合わせの中から、サンドイッチ ELISA で 0.5% SDS および 2% メルカプトエタノールで変性させたアクチニジンを検出可能な 63 通りの組み合わせが得られた。一部の組み合わせについては、各種食品との交差性を調べ、キウイフルーツに特異的であることを確認した。

キウイフルーツ標準品作製方法の検討

各条件で抽出したタンパク質を SDS-PAGE で確認したところ、①そのまま 16 時間室温にて振とう抽出、及び②E-64 を 2 · g/mL 加えた場合では、アクチニジン以外のタンパク質は消失していた。③E-64 を 10 · g/mL 加えた場合、及び④沸騰水中で 1 時間加熱抽出を行った場合には、全てのタンパク質が残存していた(図; 安達 2)。そこで、抗 D-ACT 抗体を用いたサンドイッチ ELISA により予備実験的に反応性を調べたところ、③E-64 の 10 · g/g 添加に比べ、④沸騰水による加熱抽出したキウイフルーツタンパク質で 40 %程度まで反応性が低下した。

しかし、E-64 を標準品作成に使用することは、非常にコストが掛かることから、④沸騰水による加熱抽出方法を選択することとした。

D-ACT 認識 MAb の利用

D-ACT 認識 MAb 18 種類の 18 × 17 種類の組み合わせの中から、サンドイッチ ELISA で④沸騰水による加熱抽出したキウイフルーツタンパク質を検出可能な組み合わせを選択した。この組み合わせを用いることで、キウイフルーツの標準タンパク質を 50 ppb より 0.78 ppb まで良好に測定可能であった(図; 安達 3)。

本組み合わせでのマタタビ属の果実との交差性は、アクチニジンをほとんど含まないゴールドキウイと香粋 2) に反応せず、アクチニジンを

含むものに反応した(表; 安達 2)。

また、市販食品での検出例では、缶チューハイで 1 · g/g、ドライキウイ、グミ、ヨーグルト、乳酸菌飲料で 20 · g/g 以上としてキウイフルーツタンパク質を検出できた(表; 安達 3)。

キウイフルーツ PCR 法

1 組目のプライマーでは、「キウイフルーツ、サルナシ、交配種、マタタビ」から標的とした 74 bp 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、キウイフルーツ等の DNA 量として 50 fg(鋳型 DNA 50 ng で検査した場合に 1 ppm (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フルーツの標的配列を増幅していることを確認した。

2 組目のプライマーでは、「キウイフルーツ、サルナシ、交配種」から標的とした 92 bp 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、キウイフルーツ等の DNA 量として 500 fg(鋳型 DNA 50 ng で検査した場合に 10 ppm (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。

モデル加工食品として、キウイフルーツタンパク質 10 · g/g (w/w) 相当の未加熱キウイフルーツ果肉のフリーズドライ粉末を含有する擬似混入ヨーグルトを用いて検討したところ、2 組のプライマーいずれを用いた場合も、それぞれ標的サイズの増幅産物が得られた。

また、市販製品については、ヨーグルト、クッキー、シリアル以外の製品からの DNA 収量は低く、抽出法のスケールアップなどの改良を行っても 20 ng/μL 未満の濃度の DNA しか得られないものもあった。得られた抽出 DNA 溶液を PCR の鋳型として、2 組のキウイフルーツ PCR 検知用プライマーを用いて PCR を行なった結果、キウイフルーツまたはサルナシ表示のある 11 製品中 8 製品で標的サイズの増幅産物が得られた。増幅産物の得られなかった 3 製品のうち、ドライキウイフルーツについては、試料の表面を洗浄することで、標的サイズの増幅産物が得られるようになった。

また、キウイフルーツジャムは、スケールアップした抽出法で得た DNA 溶液を PCR の鋳型とすることで、標的サイズの増幅産物が得られるようになった。着色料[果汁(オレンジ、リンゴ、キウイフルーツ由来)]と表示されていたグミキ

ヤンディーについては、抽出法をスケールアップしても増幅産物は得られなかった。

キウイフルーツ表示のない3製品については、予想通り、キウイフルーツ PCR 検知法で標的サイズの増幅産物は得られなかった(表;安達4)。

バナナ抗原精製

バナナから酸性条件下で抽出された主要なタンパク質バンドとして、33-35 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 15 kDa などのバンドが得られた。これらのタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析し帰属を試みたところ、33-35 kDa はキチナーゼ、30 kDa はグルカナーゼ、20 kDa はソーマチンライクプロテイン、15 kDa はレクチンであった(図;安達4)。

バナナアレルギー患者の血清による IgE 結合性では、33-35 kDa のキチナーゼと 20 kDa のソーマチンライクプロテインが比較的強い結合性を示した(図;安達5)。キチナーゼに関してはキチンに特異的に結合することから、キチンアフィニティーカラムを用いて、強酸条件化で溶出させることにより、再現性良く精製できることが明らかとなった。得られた標品の純度は85%程度で、まだ一部 20 kDa の混入が認められたが、免疫源としては使用可能と思われた。得られた標品の熱安定性を評価したところ、80℃の湯煎条件下で約 120 分間は安定に存在した(図;安達6)。

現在、この標品を免疫源として抗体作成を試みている。また、ソーマチンライクプロテインに関しては、ゲルからの切り出しによって精製し、ウサギポリクローナル抗体を作製した。得られた抗体は比較的特異性に優れていた(図;安達7)、精製しサンドイッチ ELISA 系を構築した(図;安達8)。

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では、高感度に多重検出することが可能であった(図;安達9)。

バナナ PCR 法

遺伝子配列の明らかな、バナナ ribulose biphosphate carboxylase large subunit (rbcl) 遺伝子に着目し、バナナの特異的検出のための PCR 用プライマーをデザインした(表;安達5)。このプライマーセットの特異性を確認した結果を図;安達10に示す。このプライマーセットを使用した PCR で、バナナ DNA を特異的に検出できることが証明できた。さらに、精製バナナゲノム DNA を使用して、この PCR の検出限界を確認し、50 fg (1 ppm (wt/wt) 相当)まで検出できた(図;安達11)。また、バナナ

の表示記載のある市販加工食品 9 種類を購入し、実用性について検証し、全ての加工食品で、PCR 法によってバナナを検知することができた(表;安達6)。

大豆及びくるみ検知キットの性能評価

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;安達7に示す。この結果、大豆の場合、くるみの場合とも、試料全てについて、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、大豆の場合は5%以下、くるみの場合は9%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

各試料について、添加量に対する回収率、併行精度(RSD_r)、室間精度(RSD_R)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;安達8,9に示す。

FASTKIT エライザ Ver. II 大豆による回収率は、おしるこで 114%、その他の試料では 97-102%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 RSD₂-5%と良好であった。室間精度は併行精度よりも大きく、9-14%の範囲であった。

モリナガ FASPEK くるみ測定キットによる回収率は、81-120%とやや幅のある値であった。しかし、併行精度 RSD は 3-6%と良好で、室間精度も全ての試料で 10%以下であり、高い精度が得られた。

鶏肉 ELISA 法

各抗体について、検量線の作成と、交差性の検定を行った。

トリ血清アルブミン(抗 CSA 抗体)と未加熱鶏肉可溶性画分を抗原にしたポリクローナル抗体(抗 CMS1 抗体)のみ、鶏肉未加熱標準を用いた検量線を良好に描くことが可能であった。

他の肉類との交差反応を減少させるために、他の肉類や卵の交差吸収カラムを用いて交差吸収を行った。その結果、抗 CMS1 抗体は、他の肉類に対する交差反応はほとんど減少したが、卵に対する交差反応はあまり減少しなかった。

牛肉 ELISA 法

ウシミオグロビンの精製

ウシモモ肉から得られた硫安沈殿画分をアニオン交換カラムにかけると、ほぼ単一のピークがみられた。このピークを分取して電気泳動し

たところ、約 21kDa に単一のバンドがみられ、N 末端アミノ酸分析の結果、ウシミオグロビンと同定された。

抗ペプチド A ポリクローナル抗体の作製

ウシミオグロビンに対する反応性を競合 ELISA で調査したところ、ペプチド A との反応性だけでなく、ウシミオグロビンとの反応性もあり、未変性よりも変性状態のウシミオグロビンとの反応がやや高い傾向があった。また、抗ペプチド A ポリクローナル抗体の交差性をウエスタンブロットで調査した結果、ブタとトリのミオグロビンだけでなく、ウシミオグロビン以外の牛肉タンパク質とも反応しなかった。

抗ペプチド B モノクローナル抗体の作製

抗ペプチド B モノクローナル抗体は 3 種類 (10B, 11H, 1D) 得られ、これらはペプチド B だけでなく D-ウシミオグロビンにも反応した。交差性を調査するためにウエスタンブロットを行った結果、11H がウシミオグロビンにのみ反応し特異性が確認できた。

抗変性ミオグロビンに反応する抗体の作製

抗変性ウシミオグロビンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをいくつか樹立した。ウエスタンブロットにより、変性ウシミオグロビンに対する特異性を調査するとともに、抗ペプチド B モノクローナル抗体とは異なる反応性を示した抗体を選択した。抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体の交差性を調査した結果、トリミオグロビンとは反応しなかったが、ブタミオグロビンとウマミオグロビンに交差反応した。

標準タンパク質の作製

いずれの標準タンパク質においても約 20kDa 付近にミオグロビンのバンドを確認でき、それぞれのタンパク質濃度は、ウシ標準タンパク質は 8.388mg/ml、ブタ標準タンパク質は 9.903mg/ml、トリ標準タンパク質は 11.176mg/ml であった。

モデル食品と測定サンプルの作製

ポリポリサンドイッチによるモデル食品からの牛肉タンパク質の定量結果を表；田辺 1 に示した。牛肉 100% のモデル食品の定量値を 100 とした場合の各牛肉混合区の定量値はほぼ安定していた。なお、ベースとした豚肉と鶏肉の違いはなく、いずれのモデル食品からもほぼ同程度に検出可能であった。未加熱区のモデル食品では牛肉を 0.01% 混合したモデル食品まで定量で

きたが、各加熱区のモデル食品は牛肉を 0.1% 混合したモデル食品までの定量であった。

モノモノサンドイッチにおいても牛肉 100% のモデル食品の定量値を 100 とした場合の各牛肉混合区の定量値はほぼ安定していた。各牛肉混合区の値はほぼ安定していた。また、ベースとした豚肉と鶏肉の違いはなく、いずれのモデル食品からもほぼ同程度に検出可能であった。未加熱区のモデル食品では、ポリポリサンドイッチと同様に、牛肉を 0.01% 混合したモデル食品まで定量できた。

特定原材料と牛肉エキスからの検出

ポリポリサンドイッチとモノモノサンドイッチのいずれにおいても、特定原材料 5 品目から牛肉タンパク質は検出されなかった。牛肉エキスにおいては、ポリポリサンドイッチの定量値よりモノモノサンドイッチによる定量値が高かった。さらに、モノモノサンドイッチに用いている 2 種類の抗体 (抗ペプチド B モノクローナル抗体、抗 D-ウシミオグロビンモノクローナル抗体) と牛肉エキスの反応性をウエスタンブロットにより調査した結果、抗ペプチド B モノクローナル抗体はミオグロビンと同じ位置のバンドとの反応がみられた。

豚肉 ELISA 法

ターゲットタンパク質と他の肉との交差性

免疫した抗原の中で、ミオグロビンと血清アルブミンは力価の高い抗体が得られたが、トロポミオシンと豚肉タンパク質抽出物は抗体価がほとんど上昇しなかった。そこで、ELISA 系はミオグロビンとアルブミンの 2 種類について構築した。それぞれの系で各種の肉タンパク質抽出物を測定すると、ミオグロビンでは交差が大きく、豚肉よりも馬肉の測定値が高かったが、アルブミンでは比較的交差が小さかったため、血清アルブミンが最も好ましい検出ターゲットであると判定し、豚肉中の血清アルブミンをサンドイッチ ELISA 法で定量する方法を検討した。

ELISA の感度

ブタアルブミンに対する抗体を用いた ELISA では、豚肉タンパク質として 0-400ng/ml の濃度で検量線が描け、検出感度は 6.25ng/ml であった (図；田辺 1)。感度の高い発光基質を用いるとさらに感度は 4 倍向上した。

加熱した豚赤肉からの検出

豚赤肉を各種の温度で加熱すると、温度が上昇するのに従い、ELISA の測定値は低下し、特に 121℃ で加熱することにより測定値は著しく

低下した。

各種食肉との交差性

各種の食肉の測定では、豚肉では 7%程度の高い測定値となるが、牛肉・羊肉でも 100ppm 程度の数値で検出された。

抗体の吸収処理

抗血清を吸収処理すると、Western Blot では、未吸収の場合と比べて、アルブミンのバンドがほとんど見えなくなった。しかし、ELISA では、馬肉では交差が減少したが、牛肉、羊肉では減少が見られず、特異性は改善されなかった。

各種食品との交差性

魚介類、野菜、果物、穀類、香辛料などの食肉以外の様々な食品について、タンパク質を抽出して ELISA を行ったが、すべて検出限界以下であった。

ゼラチン ELISA 法

まず、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ウサギに免疫し、得られたポリクローナル抗体を用いて ELISA 系を開発した。その結果、抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体を用いた測定系は種々ゼラチンにほぼ等しく反応する系であること、抗合成ペプチド抗体を用いた測定系はサカナゼラチンとは反応しない系であることが明らかとなった。

本研究では、サカナゼラチンと反応しない測定系の開発を進めることとした。抗合成ペプチド抗体を用いた測定系で、他の特定原材料測定系と同様の抽出液が使用できるかを確認するため、2-メルカプトエタノールと SDS 存在下での測定を試みたところ、サカナゼラチンの反応性が大きく増加し、サカナゼラチンを測り分けるという目的に合致しなかった。

次に、本測定系で畜肉ゼラチン以外に反応するものが無いかを調べたところ、イカ、タコ等の頭足類で高い反応性を示すことが判明した。そこで、吸収操作により反応性を減じようと試みたが、満足する結果が得られなかった。ELISA での分別は困難であると判断し、ウエスタンブロット法でそれらを分別することを試み、加熱した頭足類とは反応しない検出系を開発した。

しかしながら、ELISA 以外にウエスタンブロットも行うことは煩雑なので、やはり ELISA で分別することも志向した。そこで、抗体作製動物を変更することにより反応性が変化しないかの検討を行った。その結果、抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体に各種の吸収操作を加えること

により測定系が組めることが判明した（図；田辺 2）。

本測定系では今まで問題であった加熱した頭足類（イカ、タコ）との反応性も他の魚介類と同等のレベルにまで低減することに成功した（表；田辺 2）。また、加熱した畜肉との反応性も大幅に低下した。その他に食品材料 154 種類測定したが、問題となるような反応性を示す食材は見あたらなかった。これらの結果より、本測定系はゼラチン特異的測定系として利用可能であると判断した。

鶏肉 PCR 法

PCR 法を用いた鶏肉特異的検出に関して、16S リボゾーム RNA 領域を標的としたプライマーを使用することで、鶏肉と畜肉および鶏以外の家禽肉との識別が可能であった（図；田辺 3）。モデル加工食品を用いて検出感度を調べた結果、0.001% (10 ppm) 以上の鶏肉粉末を含むモデル加工食品由来の DNA からは、加熱・未加熱に関わらず検出が可能であった。

牛肉 PCR 法

PCR 法を用いた牛肉特異的検出に関しても同様に、16S リボゾーム RNA 領域を標的としたプライマーを使用した。畜肉およびその他の食品材料より抽出した DNA について PCR 反応を行った結果、牛肉、牛乳およびヨーグルトからはウシ特異的バンドの増幅が認められた。それ以外の検体からは増幅反応は見られなかった（図；田辺 4）。

豚肉 PCR 法

PCR の増幅の結果

ブタ DNA をテンプレートにして、設計した Primer で PCR を行うと、130bp のサイズに明確なバンドが出現した。また、目的のバンド以外には判定に影響を与えるようなバンドは出現しなかった。PCR では 1pg の DNA でもバンドが見られた。

PCR による餃子中の豚肉の検出

餃子に含まれる豚肉は 37 サイクルの PCR で 100ppb のレベルまでバンドが出現し、アレルギー物質の検査には十分な感度が得られた。

各種の肉との交差性

牛肉・鶏肉・羊肉・馬肉とは交差しなかったが、猪肉とは完全に交差した（図；田辺 5）。イノシンの増幅産物のシーケンスを調べると、Primer で挟まれた部分の 1 塩基だけがブタと異なっていた。

Real-Time PCR

豚肉・鶏肉・牛肉・羊肉および馬肉を迅速かつ定量的に検出することが可能な Real-Time PCR 法を確立した。チトクロム b 上に作成したプライマーおよび TaqMan プローブ配列を用いることによって、特異的な検出が可能となった。

小麦 DNA をマトリックスとして肉 DNA の検出感度を求めたところ、0.001% (100 fg/ μ l) まで定量が可能であり、良好な検量線 (R2 値が 0.994-0.999) が作成された。豚肉に関しては、さらに以下の結果を得た。

Real-Time PCR による豚 DNA の検出

ブタ DNA を段階的に希釈して Real-Time PCR を行った結果、10fg のブタ DNA が検出可能であり、従来法と比較して非常に感度が高かった (図; 田辺 6)。

餃子中の豚肉の検出

豚肉の添加量を変えて調製した餃子からの検出では、Real-Time PCR では豚肉として 10ppm 以上の添加量では定量的な検出が可能であった。それ以下の添加量でも検出は可能だが、蛍光強度のグラフが近接してくるので、定量は困難となった。

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

エビミックスおよびトロポミオシンに対するエビアレルギー患者の IgE 抗体価は、十脚目間だけではなく十脚目以外のシャコ(口脚目)、オキアミ(オキアミ目)、ミネフジツボ(フジツボ目)、カメノテ(フジツボ目)に対しても 0.83 以上の高い相関が見られた (図; 宇理須 1)。

甲殻類以外の抗原との交差反応性については、エビミックスならびにトロポミオシンとヤケヒョウヒダニとは相関係数 0.23-0.25 で相関は見られなかった。ゴキブリとはそれぞれ 0.7、0.65 と弱い相関がみられ、アサリ、イカ、タコには 0.7~0.88 の相関が見られた。

また十脚目の「いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属するロブスターとイセエビについても同様に検討した結果、それぞれ 0.95、0.85 と高い相関が見られた。

inhibition 試験を行った結果、固相化抗原と inhibitor 抗原とが同一である場合はいずれの組み合わせでも抑制がかかった。エビ類同士の抑制と比べると、シャコ、オキアミとの間の抑制は低値であった (図; 宇理須 2)。十脚目エビ同士とそれ以外の甲殻類とは交叉反応性の程度に差があるといえた。

魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

イクラと鶏卵白、サケに対する患者 IgE 抗体の相関は両群において認められなかった。イクラとその他の魚卵(数の子、タラコ)に対する IgE に関しては両群で相関がみられた。

イクラアナフィラキシー児 A と B、2-4) においてイクラに対する IgE 結合能は同一抗原のイクラ以外に数の子で強く抑制され、タラコ、サケでも濃度依存性に抑制が見られた。一方、魚アレルギーでイクラが高値であった症例 C においてはイクラの IgE 結合能は同一抗原であるイクラのみで抑制された。また、鶏卵黄による抑制はいずれの症例においても見られなかった。

魚類間の交叉反応性に関与するパルブアルブミン以外の魚肉タンパク質 (図; 宇理須 3)

1 回目のプリック試験

カジキのエピソードの発症前に行った。目(もく)が異なるギンサケやスケトウダラに対するプリック試験は陰性で、同目であるが科が異なるカマスも陰性、同目同科であるが属の異なるマサバも陰性であった。

2 回目のプリック試験

カジキのエピソードのあとに行ったものでホンマグロ以外のクロカジキにも反応がみられた。カジキのエピソードと皮膚試験の結果からカジキアレルギーの合併が考えられた。

ELISA inhibition

ホンマグロとクロカジキの間で 50% 以上の強い抑制がお互いに見られた。マグロに対するクロカジキ(同目異科)添加による抑制は、マグロと同目同科のマサバより強い抑制が見られた。

Immunoblot inhibition

患者血清 IgE はホンマグロの 94kDa、98 kDa に反応していた。これら高分子のタンパクは抗 PA 抗体には反応しなかった。また、これらのタンパクに対する IgE 結合はクロカジキ抗原の添加により濃度依存性に抑制された。同様の抑制は、クロカジキに対する IgE 抗体においてもホンマグロ抗原の添加により見られた。ホンマグロの 94kDa タンパク質を PVDF 膜から切り出し N 末端アミノ酸配列を決定し相同性検索を行った結果、マダイのトランスフェリンのアミノ酸配列と 87.5% 一致していた。

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

登録症例

ナッツアレルギーの疑われた 48 例を検討し、

ピーナッツ 16 例、クルミ 4 例、カシューナッツ 3 例、アーモンド 1 例のアレルギー患者を登録した。また、疑い例として、ピスタチオ、マカデミアナッツ、杏仁寒天を各 1 例登録した。大豆、ゴマは今回症例集積の対象としなかったが、それぞれ 4 例ずつアレルギー症例を認めた。

ピーナッツアレルギー症例の臨床的特徴および他のナッツとの交差抗原性については昨年と同様の結果であったので、ここでは省略する。

カシューナッツアレルギー症例

カシューナッツアレルギー 3 例の臨床像は次の通りである。

症例 1； 4 歳男児。カシューナッツ 100%のスプレットを摂取して呼吸困難と意識障害を伴うアナフィラキシーショック。

症例 2； 7 歳女児。カシューナッツを含むお菓子を食べて嘔吐・腹痛・発赤の既往が 3 回。

症例 3； 5 歳男児。カシューナッツを含むナッツ詰め合わせで腹痛、喘鳴、全身の膨疹。カシューナッツの負荷試験で腹痛・嘔吐を確認。

3 例とも、ピーナッツをはじめとしてこれまで摂取した他の豆類・ナッツ類・チョコレート等でアレルギー症状を認めていない。

これら 3 例のナッツ類検査結果を表 3-1 に示す。症例 1 でピーナッツ、症例 3 ではクルミ・ピーカンが陽性であるが、問診上はクルミ摂取時の誘発症状は経験がない。一方、3 例ともピスタチオ IgE 抗体が陽性であった。

クルミアレルギー症例

確定症例 4 例はいずれも明らかな即時型症状の既往があり、症例 1 は負荷試験において微量摂取のみで口腔症状と口周囲の蕁麻疹を確認した。

既往（アウトグロー）1 例は、平成 14 年 4 月にアナフィラキシーがあり、IgE 21.6 UA/ml であった。その後全く摂取歴がないが、平成 14 年 12 月に 5.52 UA/ml、平成 18 年 10 月には <0.35UA/ml と陰性化した。同時期に松の実でもアナフィラキシーを経験し、松の実 IgE 12.2 UA/ml であったが、これも同時に陰性化した。現時点で負荷試験を施行していないので、臨床的なアウトグローは確認できていない。

ナッツ間の IgE 抗体価の相関

ピーナッツ IgE 抗体価は、他の項目との高い相関は見られなかった。

カシューナッツは、ピスタチオと相関係数 0.967 で強く相関した。臨床的に交差反応を認めないアーモンド・ハシバミ・エンドウ・ブラジルナッツなどとも相関係数 0.7 以上であった。

クルミは、同じクルミ科に属するペカンナッツと相関係数 0.970 と強い相関を認めたが、その他のナッツとは全く相関を認めなかった。

アーモンドとハシバミの間に 0.930 という強い相関係数を認めた。アーモンドアレルギーの 1 症例はアーモンド IgE 0.4UA/ml、ハシバミは 0.34UA/ml といずれも低値であったため、抗体価の相関と臨床症状の関連は検討できなかった。

乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖負荷試験陽性牛乳アレルギー患者 31 人中 1 人。微量牛乳負荷試験； 31 人中 1 人陽性（陽性抗原濃度 36 μg）。牛乳アレルギー患者 31 人の 90%の患者が陰性となる閾値は 3.3mg であった。

アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

代表例としてクッキー・ビスケットを牛乳タンパク質含量でランク 1 から 3 までの 3 段階に分けた。

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

エビ・カニアレルギー患者の中には、原材料にエビ・カニ等甲殻類を含まなくても症状を呈する例がある。

摂取者に占める陽性率は、多い順につみれ（16.0%）、しらす（12.5%）、味付のり（10.8%）、かまぼこ（9.1%）、魚肉ソーセージ（6.9%）、ちくわ（6.1%）、ちりめんじゃこ（5.7%）、佃煮（3.7%）、焼のり（0%）であった。

症例の詳細な検討では一部データが不足している例もあるが、6 例に関しては甲殻類の微量摂取で症状が出現している可能性がある。出現症状としては蕁麻疹、皮膚痒疹と発疹がほとんどで、1 例だけ咽喉頭のイガイガ感を訴えていた。

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

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；塩見 6）。これらの中で、えび等級海苔は 3 検体中 2 検体で 20 μg/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 μg/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; 塩見 7)。さらに、それらの半数以上である 26 検体は 10 $\mu\text{g/g}$ 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 $\mu\text{g/g}$ 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検体は 11 検体であった(表; 塩見 8)。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 $\mu\text{g/g}$)、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 $\mu\text{g/g}$)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 $\mu\text{g/g}$)、グチおよびタチウオでは 12 検体中 5 検体より 20 $\mu\text{g/g}$ 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; 塩見 9)。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。

甲殻類のアレルゲン解析

イムノブロッティング分析

6 種甲殻類(ウシエビ、ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、カメノテ、ミネフジツボ)の加熱抽出液を SDS-PAGE で分析したところ、いずれにおいても約 37 kDa のトロポミオシンのバンドが検出され、イムノブロッティングではすべての甲殻類においてトロポミオシ

ンに IgE 陽性反応が認められた(図; 塩見 7)。アメリカンロブスター精製トロポミオシンを阻害剤として用いた阻害イムノブロッティングでは、すべての甲殻類トロポミオシンのプロットが消失した。

トロポミオシンの一次構造解析

4 種甲殻類(ホッコクアカエビ、ケガニ、ナンキョクオキアミ、ミネフジツボ)のトロポミオシンの全アミノ酸配列を cDNA クローニング法により決定し、既知甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列と並べて図; 塩見 8 に示した。ミネフジツボトロポミオシンは他の甲殻類トロポミオシンとは配列相同性は非常に低く(約 55%)、データベース検索により軟体動物のアワビ類のトロポミオシンに最も近いことが判明した(ミネフジツボとアワビ類のトロポミオシンの配列相同性は 75-80%)。一方、ホッコクアカエビ、ケガニおよびナンキョクオキアミのトロポミオシンは他の甲殻類のトロポミオシンと 90%以上の配列相同性を示した。なお、甲殻類トロポミオシンとしては fast タイプ、slow-twitch タイプおよび slow-tonic タイプの 3 種類がこれまでに知られているが、アミノ酸配列の特徴から、ホッコクアカエビでは fast タイプ、ケガニの脚肉では slow-twitch タイプ、胴肉では slow-tonic タイプ、ナンキョクオキアミでは fast タイプであると判断された。

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; 塩見 9)。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; 塩見 10)。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ト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) と強く反応した (図; 塩見 11)。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。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。

貝類のアレルゲン解析

イムノブロットング分析

11種貝類の加熱抽出液をサザエから精製したトロポミオシンとともにSDS-PAGEに供したところ、すべての抽出液において精製トロポミオシンに対応する約37 kDaの位置にバンドが認められた (図; 塩見 12A)。患者血清を用いたイムノブロットングではすべての加熱抽出液において37 kDa付近に陽性バンドが認められたが、コントロール血清との反応は見られなかった (図; 塩見 12B)。また、患者血清が反応するこのバンドには抗タラバガニトロポミオシンポリクローナル抗体はすべて反応した。さらに、阻害イムノブロットングでは、サザエ、スルメイカおよび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た場合、すべての貝類トロポミオシンのバンドが完全に消失した。

トロポミオシンの一次構造解析

エゾバイを除く10種貝類については、cDNAクローニング法によりトロポミオシンの全アミノ酸配列を決定した。既報と合わせて分類上多岐にわたる食用貝類のトロポミオシンの配列特性を論じるには十分であると判断された。

これまでに解明された貝類トロポミオシンのアミノ酸配列を、頭足類の代表としてスルメイカ、甲殻類の代表としてブラウンシュリンプのトロポミオシンのアミノ酸配列と並べて図; 塩見 13に示した。また、軟体動物と甲殻類のトロポミオシンのアミノ酸配列の相同性を表; 塩見 11にまとめた。配列相同性は甲殻類間あるいは頭足類間では90%以上と非常に高いが、貝類間では同じ目 (カキ目の場合は同じ科) では約90%と高いものの、目 (または科) を越えると70-80%と低くなり、目 (または科) レベルで1つのグループを形成していると考えられる。さらに各グループのトロポミオシンのアミノ酸配列は、頭足類とは約75%、甲殻類とは約60%の相同性

であり、明らかに区別された。

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AQILIEEADHRA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。

魚卵のアレルゲン解析

患者血清の各種魚卵抽出物に対する反応性

SDS-PAGEにより、すべての魚卵抽出物に β' コンポーネント (または β' コンポーネント様タンパク質) が検出された。イクラ (シロザケ卵) アレルギー患者血清を用いて行ったウェスタンブロットングの典型例として、シロザケ卵抽出物での結果を図; 塩見 14に示した。17名の患者血清はすべてシロザケ卵の β' コンポーネントと強く反応し、図; 塩見 14に示した患者血清のように β' コンポーネントのみと反応する血清が多かったが、一部の血清は β' コンポーネントの他にLv-LC (リポビテリン軽鎖) や80 kDaタンパク質とも反応した。全患者血清はサケ科3種 (シロザケ、イトウ、ニジマス) の卵抽出物と反応し、ニジマスに対する若干の患者血清を除くとすべて β' コンポーネントと特に強く反応した。その他の魚の卵抽出物あるいは β' コンポーネントに対する反応性は患者によってさまざまであったが、その反応性はサケ科魚類よりも極めて弱かった。

魚類パルブアルブミンのIgE反応性に及ぼすCa²⁺の影響

タラのパルブアルブミン (Gad c 1) ではCa²⁺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パ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パルブアルブミンのIgE反応性には高次

構造エピト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 種魚類のパ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；塩見 15 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。パ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 魚種パルブアルブミンの主要な IgE エピトープは立体的構造上に存在することが示唆された。

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、アレルギー、アレルギー表示に関する知識・意向- 調査法

これまで小児アレルギー学会会員のいる医療機関に来院する患者を対象とした調査、患者会入会者を対象とした調査、協力医療機関での患者調査などが行われている。Web サイトを利用した調査は、その調査の信頼性についての議論が多くなされている。それは有意抽出であることに他ならないからである。しかし、上記のいずれの調査においても日本における医療機関において確定診断を得た食物アレルギーの患者の母集団からは有意抽出と考えられる。

そのため、今回は、主として成人を対象としたインターネットを利用できる人への調査として位置づけ必要以上の分析・考察はしない。

各種調査

1) 生活状況等調査

男性 20 歳台 1 名 30 歳代 3 名からなる 1 グループと、女性 20 歳台 1 名 30 歳代 4 名からなる 1 グループの合計 2 グループがグループングされた。

発言は女性より男性のほうが 3 日間を通じて多かった。

ラーメンなどの出汁によってもアレルギー症状が惹起しており、重篤な人も見られた。健康危機回避のためには、積極的に尋ねていたり、表示を見てわからない場合には避けるなどがみられた。また、男性はさまざまな意見・態度を示していた。そのなかで、「患者として声をあげたほうがよいのかもしれない」との意見が聞かれた。また「同じアレルギーの人がいることがわかり安心した」との声もあった。

2) アレルゲンと表示に関する知識

回答者は 50 歳台が最も多く 29.3%、次いで 30 歳台 24.4%、40 歳台 21.9%であった。食物アレルギーであると診断を受けた者は全体の 51.1%であった。

回答を精査したところ、その他に記載されていたもののうち、特定原材料等にそれが含まれている場合があった。また、その他において加工食品そのものが記載されている場合があり、不明として分類した。最も多いアレルゲンは「さば」で 21.1%次いで「卵」20.3%「えび」15.2%「かに」13.5%であった。上位 34 品目中に特定原材料等がすべて含まれていた。

食物アレルギーとの確定診断を得られているかは不明であるが、食物アレルギーがあると自覚している者はその健康被害防止のためには食物回避を図る。アレルギー表示によって、ある程度の回避ができると思われた。また、さまざまな食品によって食物アレルギーと自覚できる症状を惹起していた。

「魚介類」との表現では「タコ」や「イカ」「エビ」について含まれるか否か正解率が 80%以下であった。またマーガリンについても同様の結果であった。オンラインディスカッションでも「魚介類」の表記に注意をしているとあった。今後この表記については注意が必要と思われた。

3) 好ましいアレルギー表示方法について

最も好ましいとされたのは、一括欄外に別途欄を設けて特定原材料等について表記をするものであった (62.7%)。次いで一括表示内に別途アレルギー物質として記載したもの (16.8%)、これまでの個別表記 (16.6%) であった。

健康危機回避のためには表示方法の改善が望ましいと考えられた。

アレルギー物質食品表示に関するアンケート 加工食品にアレルギー物質が表示されていることを知っていますか？

91.7%の回答者が表示制度を知っていると回答した。

日常生活でアレルギー物質の食品表示は役に立っていますか？

役に立っている 584 人 (62.6%)、役に立つ場合と立たない場合がある 220 人 (23.6%)、役に立っていない 6 人 (0.6%)、わからない 109 人 (11.7%)、無回答 14 人 (1.5%)。

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？

安心して食品を購入できるようになった 49.1%、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 37.4%、食品表示を見て買うようになったら症状がでなくなった 7.7%、その他 5.8%。

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？

食べてよいのかいけないのか判りづらい表示がある 46.9%。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 22.2%、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 19.4%、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 4.6%。

食べてよいのかいけないのか判りづらい表示の順位。

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。

表示義務アレルギー物質と表示推奨アレルギー物質があることを知っていますか？

知っている 66.2%、知らない 32.3%、無回答 1.5%。

表示推奨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がないことを知っていますか？

知っている 40.9%、知らない 57.6%、無回答 1.5%。

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？

トップ5は大豆、エビ、さば、カニ、キウイフルーツだった。

D. 考察

I. 食品中のアレルギー物質検査法開発（表；宇理須1）

甲殻類 ELISA 法

FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」：酵素免疫測定法（ELISA 法）を測定原理とし、甲殻類トロポミオシンを測定対象タンパク質とする甲殻類検知キットを開発した。本キットのブラックタイガー筋肉より抽出した標準液に対する反応性は、0.78-50 ng/mL の範囲で良好であり、また同時再現性、日差再現性とも良好な結果であった。

本法で測定対象タンパク質としたトロポミオシンは、甲殻類間におけるアミノ酸配列の相同性は 88.3-100%と非常に高いことが知られている。本キットは、精製トロポミオシンに対する反応性において甲殻類間で高い交差率を示したこと、一方、軟体動物、貝類には反応しないことから、本キットで使用した抗体は甲殻類以外の動物種とは相同性が低く、甲殻類間で相同性の高いアミノ酸配列を認識していることが示唆された。この点は、144 種類の食品サンプルを用いた試験においても裏づけされた。

また本キットでは、加熱・加圧変性トロポミオシンにも反応するモノクローナル抗体を選択したことにより、缶詰やレトルト食品の殺菌処理を想定した条件でも十分に検出が可能であった。

甲殻類キット「マルハ」

本測定法の性能を評価した結果、以下のことが判明した。

甲殻類全般に反応し、特に十脚目に属する甲殻類に対して特異性が高かった。一方、甲殻類以外の原材料に対して交差反応性は認められなかった。

市販加工食品において甲殻類の表示のある食品では甲殻類タンパク質が検出され、良好な希釈直線性が認められた。一方、表示のない市販加工食品では甲殻類タンパク質は検出されなかった。

以上のことから、本測定法は様々なマトリックスが存在する加工食品においてもその影響を受けることなく甲殻類タンパク質を特異的かつ正確に測定できるものと考えられた。

甲殻類検知キットのバリデーション

本研究において開発した 2 種類の甲殻類検知キット（甲殻類キット「マルハ」および FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」）の分析性能を、10 機関による試験室間バリデーションにより評価した。5 種類の試料を分析した結果、甲殻類キット「マルハ」はすべての試料で 80%以上の良好な回収率を示した。FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」の回収率は若干低い結果であったが、室間精度はすべての試料で 10%以下と良好であった。甲殻類キット「マルハ」の室間精度は 15%以上でやや大きかった。

特定原材料定量試験方法については、厚生労働省通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（平成 18 年 6 月 22 日食安発第 0622003 号）において、試験室間バリデーションを実施し、回収率 50-150%、室間精度 25%以下であったキットを使うことが示されている。今回評価した甲殻類キット「マルハ」および FA テ

スト EIA-甲殻類「ニッスイ」は、いずれもこの基準に適合しており、食品中の甲殻類検知に使用可能であった。

イカ（軟体動物）ELISA 法

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）ELISA 法

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 PCR 法

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シトクローム 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を実証できた。

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）ELISA 法

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、魚卵中に含まれるビ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。

ダイズ ELISA 法

抽出液を改良することで、以前と同等の感度、特異性を有しながら、肉類モデル加工食品への反応性を向上することができた。本検出法は食品原材料に対して交差反応を示さず、大豆特異的な検出法であることが確認された。

また調理加工の影響を受けることなく、加工食品中の微量な大豆タンパク質を高感度に検出可能であることが確認された。発酵食品については、加工段階における大豆タンパク質の分解の程度によって検出の有無が生じた。大豆油については、加工段階で大豆タンパク質が除去されるため検出不可能であったと考えられた。「大豆イソフラボン」、「大豆ペプチド」を含む検体については、精製度の違いによって、測定値に差が生じる可能性が示唆された。

クルミ ELISA 法

160 品目におよぶ食品原材料と交差反応性を示さないことから、本測定法はクルミ特異的に測定可能であることが示唆された。脱脂クルミの重量を変化させ、2-D と ELISA を行ったところ、濃度依存性のある重量域は限られていることが判明した。濃度依存性のない重量での抽出濃度からタンパク量を決めると、ELISA から得られる測定値は、実際のタンパク量とは乖離した数値を示すことが示唆された。

具体的に 0.4 g から抽出した溶液の 2-D 値からタンパク量を規定 (7 mg/ml) すると、ELISA の値は実際の濃度 (11 mg/ml) より低い値 (7 mg/ml) を示すこととなる。つまり、標準品が低く計算されるので、実際調査したいサンプル中のクルミ含量は高く計算されることとなる。

そこで、抽出の際、濃度依存性のある 0.2 g/19.6 ml から抽出した際の 2-D 値によりタンパク量を規定することとした。そのように規定したタンパク量をもとに、モデル加工食品を作製したところ、通知 (食安発 第 0622003 号) のバリデーションの回収率規準 (50%~150%) をクリアしたため、バリデーション用のサンプルに供することに決定した。

ダイズ PCR 法

供試した市販およびモデル加工食品には焙煎、焼成およびレトルトなど加工度の高い食品も含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のダイズ検知法として適用可能であることが示唆された。また、本研究で開発された PCR 法は市販の ELISA キットより高い感度で大豆を検出することが可能であった。

クルミ PCR 法

matK 遺伝子を標的にした PCR で食用のクルミ科ナッツの検出方法の開発に成功した。さらに、ピーカンナッツ matK 遺伝子を同定し、その遺伝子配列中の制限酵素部位を利用することで、クルミとピーカンナッツの分別法を確立した。

供試したモデル加工食品には焙煎、焼成およびレトルトなど加工度の高い食品も含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のクルミ検知法として適用可能であることが示唆された。

エビ PCR 法

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 5 種類の擬似混入試料を検知できたことから、同法がエビの確定試験法に必要な感度を有することを確認できた。特異性については、試験した 12 種類のエビすべてを検知できて、アミ、オキアミ、シャコや大多数のカニは検知しなかったが、上海ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニだけは偽陽性検出してしまふことが確認された。このうち上海ガニだけは、制限酵素処理によっても、エビとは区別できずに偽陽性となることが確認された。

高級カニとして珍重される上海ガニが加工食品に混入するリスクは比較的小さいと考えられるため、同法は、確定試験に必要なエビ特異性を有するものと考えている (表; 宇理須 2)。

カニ PCR 法

カニ蛋白質 10 ppm 相当量を含有するモデル加工食品(鶏肉団子)中のカニ DNA を検知できたことから、同法がカニの確認試験法に必要な感度を有すると考えられる。但し、シャコを含む食品についてはカニ PCR 検知法の適用範囲外となるため、別途、シャコ特異的検知法を開発する必要があると考える。また、エビ PCR 検知法、カニ PCR 検知法で分析した殆どの市販製品で、表示や ELISA 結果と照らして妥当な結果が得られたことより、二つの PCR 検知法が各種食品の検査に適用できることが示唆された。

キウイフルーツ ELISA 法

本研究において得られた MAb の組み合わせにより、サンドイッチ ELISA 及びイムノクロマトキットで高感度かつ特異的に N-ACT の検出することが可能となった。しかし、加熱により検出感度は低下することから、加工食品の検知法としては適していないものと考えられた。但し、イムノクロマトキットは、キウイフルーツを扱う食品加工工程の検査に利用できるものと考えられた。

キウイフルーツの標準品については、アクチニジンがシステインプロテアーゼであることから、メルカプトエタノールを含む溶液中では、タンパク質分解活性が高くなったものと考えられた。Pastorello et al. が報告した、キウイフルーツのタンパク質の分解が抑制できたとする E-64 を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加えたが、アクチニジン以外のキウイフルーツのタンパク質が全て分解されており、E-64 の添加濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 必要であると考えられた。しかし、E-64 が非常に高価なプロテアーゼインヒビターであること、また、E-64 でアクチニジンが完全に失活するわけではないことから、長期間の保存を前提にする場合には、加熱によるアクチニジンの完全失活が望ましいと考えられた。また、室温抽出したアクチニジンを検出可能な MAb の組み合わせでは加熱抽出したアクチニジンを同等に検出することができず、両者の抗原性が異なることが明らかとなった。

D-ACT 認識 MAb を用いたサンドイッチ ELISA については、63 通りの抗体の組み合わせを検討し、加熱抽出されたアクチニジンの検出に最適な系を構築した。本 ELISA では、加熱抽出した標準品 50 ppb から 0.78ppb まで良好な標準曲線が得られた。また、本 ELISA でキウイフルーツの近縁種を測定したところ、アクチニジンを含むキウイフルーツとサルナシは検出可能であったが、アクチニジンをほとんど含まないゴールドキウイなどは検出できなかった。キウイフルーツの検出法としては、ゴールドキウイなどに対応する方法の検討も今後必要になるものと考えられた。さらに、キウイフルーツの表示がある市販食品ではいずれもキウイフルーツタンパク質を検出可能であったが、缶チューハイで 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ と低く、もともと含有量が低いのか、あるいはアルコール飲料に起因するものかを検証する必要が考えられた。

キウイフルーツ PCR 法

今回作製した 2 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。

このキウイフルーツPCR検知法により、疑似混入ヨーグルト中のキウイフルーツタンパク質10 µg/g (w/w)相当の未加熱キウイフルーツを検知できたことから、同法がキウイフルーツの確定試験に必要な感度を有するものと推測された。また、実際に市販されているキウイフルーツまたはサルナシの表示のある製品に含まれるキウイフルーツやサルナシも、唯一グミキャンディーを除き、検知できることが確認できた。グミキャンディーについては、着色料[果汁(オレンジ、リンゴ、キウイフルーツ由来)]、と表示されていたが、使用量が検知下限よりも少ないために検知できなかったものと考えられる。

今後は、各種加工工程を経た疑似混入試料でバリデーションを行なうことが必要である。また、市販製品からのDNA抽出において、牛乳、乳酸菌などのマトリックス由来のDNAを多く含むと考えると考えられるヨーグルト、小麦由来のDNAを多く含むクッキー、シリアル製品ではDNA収量が高かったが、ジュース、ジャム、ドライフルーツなどでは予想以上にDNA収量が低かった。今後、同検知法のバリデーションを進める上で、キウイフルーツなどの果物からのDNA抽出法の改良・検討が必要となる可能性も考えられる。

バナナ抗原精製

バナナのアレルゲンタンパク質としてすでに知られているキチナーゼはキチンを用いてアフィニティー精製が可能であり、また実際に患者血清IgEによって認識された。熱安定性も高く、加工による安定性も示唆された。よってこの分子をバナナ検知ターゲット分子の有力な候補として良いと思われる。純度に関してはもう少し向上させることが好ましいと考えられた。

ソーマチンライクプロテインに関してもバナナに含まれる主要なタンパク質の一つとして確認されたので、バナナ検知ターゲット分子の候補と考えられた。この分子に関しては抗体を作製し、サンドイッチELISAを構築することができた。今後その特異性や感度について検討する必要がある。

また、新しいアレルゲンの検知法の開発の一環として試みた近赤外蛍光検出を用いたアレルゲンの検出では、化学発光法と同等の高感度であり、かつ異なる波長の蛍光プローブを同時に用いることによって多重検出が可能であった。

バナナPCR法

我々は、rbcl遺伝子を標的にしたPCRでバナ

ナの検出方法の開発に成功した。精製DNAを用いた検討で、50 fg (1 ppm(wt/wt)相当)までのゲノムDNAが検出できることが確認できた。また、市販加工食品には焙煎、焼成および液体などさまざまな加工の食品が含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のバナナ検知法として適用可能であることが示唆された。

大豆及びくるみ検知キットの性能評価

本研究において開発した大豆検知ELISAキット(FASTKIT エライザ Ver. II 大豆)、くるみ検知ELISAキット(モリナガ FASPEK くるみ測定キット)の分析性能を、それぞれ11機関、12機関による試験室間バリデーションにより評価した。大豆検知キットの場合は、5種類の試料を分析した結果、97-114%の良好な回収率を示した。

室間精度は9-14%とやや大きな値となった。くるみ検知キットの場合は、7種類の試料を分析した結果、回収率は81-120%とやや幅があったが、室間精度は10%以下と良好であった。

特定原材料等の定量試験方法については、厚生労働省通知「アレルギー物資を含む食品の検査方法について」(平成18年6月22日食安発第0622003号)において、試験室間バリデーションを実施し、回収率50-150%、室間精度25%以下であったキットを使用することが示されている。

今回評価した大豆検知キット、及びくるみ検知キットは、いずれもこの基準に適合しており、それぞれ食品中の大豆、くるみの検出に使用可能であることが確認された。

鶏肉ELISA法

鶏肉を特異的に検知するELISA法開発のため、鶏肉の様々な成分を免疫原として抗体を作成し、その性能を評価した。そのうち鶏肉抽出物を免疫した抗体を用いたELISA系において、加熱、未加熱抗原ともに1.5ng/mlから50ng/mlまでの範囲で検出が可能であったが、鶏卵に強い交差が見られた。この交差は、吸収処理を行ったものの、消しきれなかった。

牛肉ELISA法

食品に含まれる牛肉タンパク質を検出するためのターゲットタンパク質として、ウシ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タンパク質と異なり、畜種によってアミノ酸配列がやや異なる。しかし、ウシミオグロビンを免疫した抗体ではまだ交差性の問題が憂慮されたので、ウシミオグロビンを免疫して得られる抗体だけでなく、ウシミオグロビンに特異的なアミノ酸配列を2部位選択し、抗ペプチド抗体を作製することで特異性の高い検出系を構

築することとした。

ウシミオグロビンは硫酸濃度 90%でも沈殿しなかったが、等電点である pH6.85 に調整することで沈殿した。この方法では、ほとんどの夾雑タンパク質が硫酸沈殿で除かれているので、アニオン交換カラムで精製することで高純度のウシミオグロビンを調製できた。

抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体の交差性をウエスタンブロットで調査したところ、トリミオグロビンとは反応しなかったが、ブタミオグロビンとウマミオグロビンと反応した。鳥類のミオグロビンとは交差反応しないことが考えられるが、ブタとウマだけでなく、他の哺乳類のミオグロビンとは交差する可能性が高いので、抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体同士のサンドイッチ ELISA は不適であると考えられた。

抗ペプチド A ポリクローナル抗体は、ウシミオグロビンに対して高い特異性を有するように免疫する合成ペプチドを設計した。この抗体のウシミオグロビンに対する反応性と交差反応性を調査したところ、抗ペプチド B モノクローナル抗体と同様に、ウシミオグロビンに対して高い特異性を示すことがわかった。サンドイッチ ELISA では、固相抗体に特異性の高い抗体を用いることで高い特異性を持つ系を構築できると考えられたため、これら 2 種類の抗ペプチド抗体を固相抗体とした系、すなわちポリポリサンドイッチ、モノモノサンドイッチを構築した。

それぞれの系における検出限界を算出したところ、約 15ng/ml と 30ng/ml となり、現行の特定原材料測定キットでの検出限界 (10ng/ml 未満) は達成できなかった。しかし、ウシ、ブタ、トリの標準タンパク質を用いてこれらの系における交差性を調査したところ、いずれの系においてもブタとトリとの交差反応はみられず、ウシに特異性の高い系であることがわかった。

そこで、実際の食品に含まれる牛肉タンパク質の検出が可能かを確認するために、牛肉の混合比率と加熱条件の異なるモデル食品を作製し、その検証を行った。その結果、いずれの系においても牛肉の混合比率に応じた牛肉タンパク質の定量ができたが、検出感度は加熱により低下した。抗体は変性ウシミオグロビンに反応することから、加熱によってタンパク質が凝集してウシミオグロビンが可溶化せずに測定サンプル中に抽出されてない可能性が考えられた。すなわち、可溶化する条件をさらに検討することで、加熱された食品からも未加熱の食品と同等の感度を得られると考えられる。

牛肉エキスは、牛肉から加熱や酵素処理、他の添加物を加えるなど様々な工程を経て製造さ

れている。そのため、製造工程中に牛肉由来のタンパク質はある程度分解されていると考えられ、電気泳動においても明確なバンドが確認できなかった。しかし、いずれの系でも牛肉エキスから牛肉タンパク質を検出することができ、特にモノモノサンドイッチでは高い定量値が示された。さらに、固相抗体に用いている抗ペプチドモノクローナル抗体との反応性をウエスタンブロットにより調査したところ、ウシミオグロビンと同じ位置のバンドを検出することができた。このバンドがウシミオグロビンと仮定すると、ウシミオグロビンは様々な加工工程を経た牛肉エキス中でも分解されることなく存在していることになる。結果的に、加熱や酵素処理に対して耐性があると考えられるウシミオグロビンをターゲットタンパク質としたことは、今回の検出法開発で重要な意味を持つと考えられる。

豚肉 ELISA 法

豚肉検出用の ELISA ではミオグロビンとアルブミンをターゲットにして試験してきたが、ミオグロビンの ELISA は他の動物との交差が極めて大きく、豚肉検出には使えないと判断し、アルブミンを検出する ELISA に的を絞った。

アルブミンはアミノ酸配列の種間差が肉由来タンパク質の中では大きいので、交差は低かった。それでもウシとヒツジに交差があったため吸収を試みた。しかし、吸収した抗体を用いても ELISA では交差は低減しなかったが、Western Blot では非特異的なバンドは消失したので、検出法として Western Blot は有効であると判断した。

豚肉の加熱により ELISA の検出感度は低下するが 100℃までの加熱であれば、検出が可能である。121℃で加熱すると検出感度は大幅に低下するが、熱によってタンパク質の構造が大きく変化したと考えられる。

ゼラチン ELISA 法

本研究で開発した一連の測定系において、種々ゼラチンの反応性は、動物種によるアミノ酸配列の違いの他にゼラチン作成工程での処理方法、つまり酸処理を施して作製したゼラチンか、アルカリ処理を施して作製したゼラチンかということにも大きく影響されることがわかった。また、サカナゼラチンの場合、2-メルカプトエタノールと SDS 存在下で測定すると、Native な条件と比べ、反応性が大きく増加した。これは、Native な条件下では畜肉ゼラチンと立体構造が大きく異なっているために抗体との反応性が低くなっていたが、2-メルカプトエタノ

ールと SDS の影響により立体構造が崩れ、畜肉ゼラチンと同じ様な構造を取るようになったためと思われる。

当初、抗ウシアルカリゼラチンをウサギに免疫した際は、種々ゼラチンにほぼ同程度に反応し、サカナゼラチンを分別することが出来なかった。しかし、免疫動物を変更することにより、加熱した頭足類との反応性を他の魚介類と同等のレベルに低減した畜肉ゼラチン特異的測定系を開発することが出来た。このことは、抗原が同じでも免疫動物が違ふことにより、抗原認識部位が異なり、反応性の異なる抗体が入手できたということを示唆する。本抗体を入手できたことにより、当初の目的であった畜肉ゼラチン特異的測定系の構築が可能となった。

鶏肉・牛肉 PCR 法

トリおよびウシを特異的に検知するためのプライマーとして、ミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 領域を標的とした。ミトコンドリア DNA の方がコピー数が多く、変異が生じやすいため、ゲノム DNA を標的とするよりも高感度で特異性の高い判定が可能になると考えられる。また、加熱した食品検体からも検出する必要があるため、可能な限り増幅サイズを短くした。その結果、鶏プライマーで 102bp、牛プライマーで 97bp のサイズを増幅するプライマーの設計を行った。

これらのプライマーを用いて PCR を行った結果、いずれも種特異的な反応を示した。また、検出感度も 10ppm 以上あり、アレルギー原因物質の検出に適していることが分かった。

豚肉 PCR

PCR 法は、豚肉を高感度で特異的に検出できる方法であることがわかった。他の食品素材との混合物でも、含まれる微量の豚肉を検出できるので、ELISA よりも優れた検出法であると考えられる。

Real-Time PCR

食品に含まれる豚肉・鶏肉・牛肉・羊肉および馬肉を検出することが可能な Real-Time PCR 法を確立した。本方法の感度は、アレルギー物質の検査を行うに十分なものであると同時に、加工食品に混入するミンチ肉の検出に有効であり、食品表示を検証し、消費者の食に対する安心感を保証するものでもあると言える。本法は短時間で結果が得られ、定量性もあり、従来の PCR 法よりも優れていると考えられる。ただし、あまりにも感度が高いので、アレルギー物質の検出では、試料からの DNA 抽出や、反応液の混

合などの実験操作に十分な注意が必要である。

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

エビミックスとトロポミオシンに対する IgE 抗体結合能は、ダニを除く各抗原間で相関が見られたことから、昆虫鋼、頭足鋼における交差抗原性においてもトロポミオシンが重要な要素であることが確認された。ダニに対する IgE 結合能で相関が見られなかったことからダニにおけるトロポミオシンのアレルゲン性は高くないことが考えられた。

また、「7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類」に属する十脚目のロブスターとイセエビに対する相関はエビミックス、トロポミオシンとも 0.85 以上の高い相関を示した。このことから、これらの抗原に対するトロポミオシンの重要性が確認された。

IgE 抗原の抑制試験で、同一抗原により IgE 結合能が抑制されたことからこれら各抗原に対する IgE 結合は特異的なものであることが証明された。

魚卵と魚肉との交差抗原性の検討

RAST 及び ELISA inhibition による結果から魚卵間には強い共通抗原性が存在し、鶏卵とは共通抗原性がないと考えられた。

一方、サケ肉とイクラでは部分的に抑制されることから、両者には弱い共通抗原性が推測され、イムノプロットの結果からビテロジェニンが共通抗原性に関与するものと考えられた。ビテロジェニンは環境ホルモンにより雄や未熟な雌の肝臓でも合成されることから、環境悪化の指標として測定される。このことから、ビテロジェニンがアレルゲンと同定されることは興味深いことであると考えられた。

しかし、 β' コンポーネントに反応するイクラアナフィラキシーを生じる症例 A と B はサケを食べてもアレルギーは生じず、魚アレルギーの C ではリポビテリンに反応しているにもかかわらずサケでイクラの IgE 抑制が見られなかったことに関しては、前者に関しては、 β' コンポーネントはビテロジェニンタンパク質として存在するときは 1 価の結合能しか持たないのではないかと、リポビテリンに対する IgE は 1 価のみで、それはビテロジェニンの表層にはないのではないかと、などが推測されるが、これに関して今後も検討していく必要があると考えている。

さらに、イクラは初回摂取でアナフィラキシーが起こる理由についても、これらサケからの交差反応によるのか、経胎盤もしくは母乳によ

る感作なのかについても研究が必要であると考えられる。

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

魚アレルギーでは単独魚種のアレルギーの報告もあるが、多くの魚種にアレルギーを示すことが多い。この複数の魚種にアレルギーを起こす原因として PA やコラーゲンが報告されているが、そのほかのタンパクの関与については報告されていない。

今回、病歴およびブリック試験からマグロ単独魚種によるアナフィラキシーと考えていた症例が、初めてクロカジキを食べ同様のアナフィラキシー症状をきたした症例を経験した。この患者の血清を用いて、その症状が両者の共通抗原性によって生じたことを ELISA inhibition および immunoblot inhibition によって証明した。

ホンマグロに対する IgE 結合の抑制が、マグロと同目同科に属するマサバより、同目異科であるクロカジキのほうがより強かったことから、魚のアレルギーは魚種の生物学的分類とは必ずしも一致していないことが考えられた。

また、N 末アミノ酸配列の相同性検索によりこの両者の共通抗原性を有するタンパクがトランスフェリンと高い相同性を有することがわかった。魚のトランスフェリンはこれまでアレルギーンとして報告されていないことから、今後更なる解析が必要であると思われる。

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

小児のナッツ類アレルギー患者を集積して検討したところ、診断確定例としてはピーナッツに次いでクルミ、カシューナッツの症例が認められた。これは、日本の小児におけるナッツアレルギーの頻度がある程度反映しているものと考えられる。

カシューナッツアレルギー症例は、これまでに摂取経験のある他のナッツにアレルギー反応はなく、IgE 抗体価も低値であった。しかし、摂取歴はないが同種に属するピスタチオには高い IgE 抗体価を認めた。全症例の検討でも、両者の抗体価は強い相関関係にあるため、この 2 種については強い交差抗原性が存在することが示唆された。

クルミアレルギーの症例も、クルミのみに反応するケースが多く、IgE 抗体価は同じクルミ科に属するペカンナッツと強い相関を認めた他は、他のナッツ類とは抗体価の相関は全く認められなかった。従って、クルミは他のナッツと

は異なるアレルギー性を持つことが示唆された。

その他には、これほど強い抗体価の相関関係を持ったナッツ類はアーモンドとハシバミ以外に存在しなかった。これらについては真のアレルギー症例が見いだされなかったために、臨床的な考察はできなかった。

抗体価の相関という検討からは、ピーナッツは他のナッツ類とは強い交差抗原性を認めなかった。

乳糖・微量牛乳経口負荷試験

乳糖には 1g 当たり 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 人が乳糖経口負荷試験陽性となった。頻度は非常に小さいといえる。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。今後、対象牛乳アレルギー患者数を増やして検討する必要がある。

アレルギー物質含有食品交換表作成の試み

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 倍の幅があることが分かった。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か指導できるようにするためには、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し消費者に公開されれば、食物アレルギー患者は表示に自分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ようになる。

さらに、測定するアレルギー物質の種類と食品数を増やすことも有用性を高めることになる。日本の食品表示制度では表示義務食品に関しては定量的検知法 (ELISA 法) が確立している。さらに、本研究班で表示奨励食品の多くが検知可能となった。アレルギー物質含有食品交換表作成は、この検知法の応用範囲を拡げることになる。

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。

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小甲殻類由来のものと考えられた。いわし稚魚の場合も、フレカラ亜目(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ものと考えられる。

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。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。

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

原材料表示に甲殻類を含まない食品(つみれ(16.0%)、しらす(12.5%)、味付のり(10.8%)、かまぼこ(9.1%)、魚肉ソーセージ(6.9%)、ちくわ(6.1%)、ちりめんじゃこ(5.7%)、佃煮(3.7%))でも、エビ・カニ抗原測定キットによって検出される食品の中には症状を呈する症例がいることが判明した。

症状はア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の微量摂取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・カニ等甲殻類の表示義務化に向け新たな課題となる。

甲殻類のアレルゲン解析

甲殻類の主要アレルゲンはすべて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、トゲエビ亜綱口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する啓蒙活動が望まれる。

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かもしれないので、今後の IgE 結合エピトープ解析が望まれる。

ブラックタイガーの新しいアレルギーンとして 20 kDa の SCP を同定することができた。SCP は甲殻類アレルギー患者の半数が認識しているので主要アレルギーンの可能性がある。この点については今後もっと多くの患者血清を用いて検討したい。

イムノプロットの結果から、エビ類とロブスター類の SCP、特にクルマエビ科エビ類の SCP の IgE 反応性が強く、カニ類の SCP は IgE 反応性を示さないと考えられた。このことは、エビ類のみにアレルギー反応を示すという患者の存在は、fast タイプと slow タイプのトロポミオシンの変異だけでなく、SCP によっても説明できることを示唆している。実際、ELISA において、患者 2 の血中 IgE は SCP とのみ反応しており、この患者はエビ類を認識するがカニ類は認識しないと考えられる。エビ類特有のアレルギー患者を SCP で説明できるかどうかに関しては、臨床現場での負荷試験などによる診断とアレルギーン分析のデータを照合していくことが求められる。

貝類のアレルギーン解析

甲殻類、頭足類の主要アレルギーンはトロポミオシンであることが証明されているが、本研究により貝類の主要アレルギーンも共通してトロポミオシンであることが確認された。また、阻害イムノプロットの結果から、トロポミオシンは貝類間だけでなく、貝類と頭足類、貝類と甲殻類の間でも抗原交差性を示すことも判明した。

しかしながら、トロポミオシンのアミノ酸配列相同性の点から、貝類は甲殻類、頭足類とは区別され、しかも貝類間でも目（または科）レベルでグループを形成していると判断された。したがって抗原交差性を分子レベルでさらに詳細に理解するためには、貝類の場合には目（または科）レベルのグループごとに検討していく必要があると考えられる。

17-18 年度に開発した甲殻類検知キットに利

用した抗トロポミオシンモノクローナル抗体の認識部位は不明であるが、検知キットは甲殻類特異的であったので、抗体は甲殻類トロポミオシンに特有の配列を認識すると考えられる。特定原材料に準ずるとされている軟体動物のイカ、アワビの場合、トロポミオシンのアミノ酸配列相同性はそれぞれ頭足類間、古腹足目間では高いが他の軟体動物や甲殻類とはそれほど高くない。実際、19 年度には、スルメイカトロポミオシンを抗原としてイカ類（頭足類）トロポミオシンに特有の配列を認識するモノクローナル抗体を取得することができ、イカ類（頭足類）検知のための ELISA 系を構築することができた。同様にトロポミオシンを測定ターゲットとして、アワビ類に特異的な ELISA 検知法も開発することができると思われる。

魚卵のアレルギーン解析

イクラアレルギー患者の血清はすべてシロザケの β' コンポーネント（ビテロジェニンの卵黄内代謝産物）と強く反応し、イクラの主要アレルギーンは β' コンポーネントと判断された。シロザケだけでなく、イトウおよびニジマスの β' コンポーネントとの反応性も強く、 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ギーンであると考えられる。

現在のところ、シロザケ卵の β' コンポーネントのアミノ酸配列を約 75% 解析できているが、N 末端 20 残基はニジマス卵中の β' コンポーネントと 95% の高い相同性を示し、抗原交差性を説明できるかもしれない。なお、患者によってはその他の魚の β' コンポーネントとも反応したが、IgE 結合領域は魚種間では異なる可能性がある（たとえばイクラ β' にはタラコ β' には含まれない特有の IgE 結合部位が存在する）。今後は、各種魚卵に含まれる β' コンポーネントの一次構造情報を蓄積するとともに、IgE 結合エピトープを解析することが望まれる。

魚類のアレルギーン解析

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。コイおよびマサバパルプアルブミンの場合、 Ca^{2+} 結合に必須のアミノ酸残基を変異させた改変パルプアルブミンでは 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 が主としてパルプ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プアルブミン（ Ca^{2+} を保持している）を用いて作