

表10-b 食物アレルギー対策(自宅)

| 対策 | 人数 (人) | 割合 |
|------------------------|-----------|-------|
| 病院・薬局への対策 | 10 | 41% |
| アレルギー検査を行う | 7 | |
| 除去食料は主治医に相談する | 1 | |
| 病院・薬局でアレルギーを呼びかけるものを作る | 1 | |
| 医師手紙でアレルギーのことを伝えてほしい | 1 | |
| 店、メーカーに対して | 8 | 2.4% |
| メーカー、店に相談する | 4 | |
| 食品業者にもっと理解を求めよう | 2 | |
| 初めてのときの対策 | 5 | 2.0% |
| 初めてのものは少量にして様子を見る | 2 | |
| 気をつけて食べる | 1 | |
| 体の異常を軽視せず、原因を考える | 1 | |
| 対策なし | 5 | 2.0% |
| その他 | 28 | 15.2% |

アレルゲンを家の中に置かない、手の届く所に置かない、アレルゲンを含む料理を作らない、本人の前でアレルゲンを含む料理を食べないなど、アレルゲンを近づけないという対策 18%、原材料をしっかりと確認するなど、アレルゲンの確認に対する対策 14.7%、除去食の実施 14.7%、親・家族のアレルギーに対する理解を深める、兄弟で同じものを食べる、他の人の食後の手洗いうがい、食事の後片付けを早くするなど、親・兄弟・周りの人への対策 9.8%、アレルギー検査を行う、除去食を主治医に相談する、病院・薬局で食物アレルギーを呼びかけるものをつくる、母親学級でアレルギーのことを指導するなど、病院・薬局への対策 4.1%、メーカー・店に対する対策 2.4%、初めての食べる食品は少量にする、体の異常を軽視せず原因を考えるなど初めて摂食する時に対する対策 2.0%となっている。

次に事例が多かった園・学校の場合では、友達にもらって食べた、交換したなどの友達に関連したアクシデントが 24.5%、配膳ミス 18.9%と多くみられた(表 11)。

表11 食物アレルギーの発生状況(園・学校)

| 原因 | 人数 | 割合 |
|------------------------------|----|-------|
| 朝食・おやつ | | |
| 表示ミス・表示の見落とし | 5 | 9.4% |
| 母・先生のチェックミス | 3 | 5.7% |
| 母から先生への連絡ミス | 1 | 1.9% |
| 給食センターのミスをアレルギー人っていた | 1 | 1.9% |
| 栄養士の原材料の確認ミス | 1 | 1.9% |
| 配膳 | 10 | 18.9% |
| 本人に確認したが、本人はよのっかっていたため、配膳された | 1 | 1.9% |
| 食事時 | 13 | 24.5% |
| 友達に関連したアクシデント | | |
| その他 | 12 | 22.8% |
| 原因不明 | 2 | 3.8% |

これに対する対策は、ネームプレートをつける、専用のプレートにのせ、さらに、確実に除去食が配膳されたことを確認する、先生から直接手渡し

してもらう、アレルギーの子供に先に配膳するなどの、配膳時の対策 17.0%、表示の確認をしつかりするなどのチェック体制の強化 11.3%、園・学校のスタッフへの周知 11.3%、園・学校にスタッフのアレルギーに対する理解を深めてもらう 9.4%、他の園児・生徒にアレルギーを伝える 1.9%、お弁当・おやつを持参する 5.7%、薬を用意する 3.8%、本人に自覚させる 11.3%などがあげられた(表 12)。

表12 食物アレルギー対策(園・学校)

| 対策 | 人数(人) | 割合 |
|------------------------------|-------|-------|
| 学校 | 8 | 17.0% |
| 配膳時の注意 | | |
| ネームプレートをつける | 2 | |
| 専用のプレートにのせる | 2 | |
| 確実に除去食が配膳されたことを確認してもらう | 2 | |
| 先生から直接手渡ししてもらう | 1 | |
| アレルギーの子を先に配膳する | 1 | |
| チェック体制の強化 | 8 | 11.3% |
| 表示の確認をしかりする | 2 | |
| しかりチェックする | 2 | |
| 毎日メニューを手書きで書いて確認してもらう | 2 | |
| 園・学校のスタッフへの周知 | 8 | 11.2% |
| 園・学校のスタッフにアレルギーに対する理解を深めてもらう | 5 | 6.4% |
| 他の園児・生徒にアレルギーを伝える | 1 | 1.9% |
| お弁当・おやつを持っていく | 2 | 5.7% |
| 薬を用意する | 2 | 3.8% |
| アレルギーのことをよく教訓する | 1 | 1.9% |
| 本人 | 8 | 11.2% |
| 本人に自覚させる | 7 | 12.5% |
| その他 | | |

3) 食物アレルギー誘発量の検討:

凍結乾燥鶏卵白タンパク質 7mg でも 8.4%の鶏卵アレルギー患者が過敏症状を惹起した。加熱鶏卵白タンパク質では 7mg で 12.5%の患者が陽性となった。

4) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:

食品群にわたる卵・乳のタンパク質含有量を示す(図 11,12)。

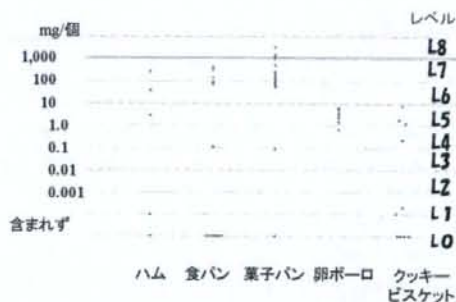


図11 食品群ごと1個あたり卵タンパク質含有量

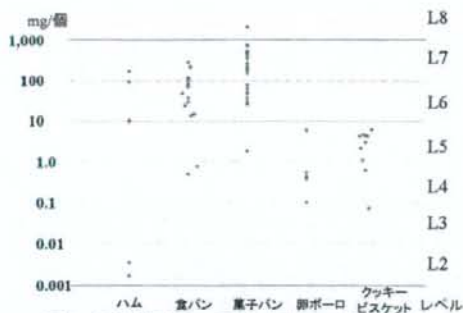


図12 食品群ごとの1個あたり乳タンパク質含有量

加工食品として同じ分類に属するにもかかわらず、卵、乳、小麦、大豆の各タンパク質の含有量には大きな幅があることが判明した。

これらの食品群と食物負荷試験の結果をリンクさせたシミュレーションの表を試作した(図13,14)。

| 品名 | 乳タンパク質含有量 | 乳タンパク質含有量 | レベル |
|--------|-----------|-----------|-----|
| | mg/g | mg/1個 | |
| ビスケットA | 2.15 | 6.03 | 5 |
| ビスケットB | 1.8 | 2.2 | 5 |
| ビスケットC | 1.73 | 4.32 | 5 |
| ビスケットD | 1.13 | 4.66 | 5 |
| クッキーA | 0.56 | 5.34 | 5 |
| ビスケットE | 0.52 | 1.13 | 5 |
| ビスケットF | 0.51 | 0.51 | 4 |
| ビスケットG | 0.04 | 0.07 | 3 |
| クッキーB | 0.01 | 0.08 | 3 |

図13 負荷試験とアレルギー物質含有量のリンク

牛乳の負荷試験で100ml(乳蛋白質3333mg)が陽性であった場合には1/100倍の濃度を安全係数として1ml(乳タンパク37mg)以下の食品は許可をする。一方0.1ml(乳蛋白3.3mg)が陽性だった場合は、同様に乳タンパク質量0.04mgの食品まで許可する。

| 品名 | 牛乳タンパク質含有量 | 牛乳タンパク質含有量 | 1枚でのレベル |
|------|------------|------------|---------|
| | mg/g | mg/1枚 | |
| 食パンA | 3.28 | 282 | 7 |
| 食パンB | 3.16 | 215 | 7 |
| 食パンC | 1.74 | 115 | 7 |
| 食パンD | 0.55 | 37 | 6 |
| 食パンE | 0.49 | 29 | 6 |
| 食パンF | 0.37 | 24 | 6 |
| 食パンG | 0.011 | 0.78 | 4 |
| 食パンH | 0.007 | 0.5 | 4 |

図14 負荷試験とアレルギー物質含有量のリンク

以下を含有するパン食品まで許可する。この場

合の安全係数に関しては今後検討する必要があると思われる。

未だ試作の段階ではあるが、同じ乳タンパク質含有量で分けたアレルギー食品の交換表を示す(図15)。

表15 アレルギー物質乳含有濃度食品交換表

| レベル | 含有量 | パン | クッキーなど菓子 | ハム ウイナー |
|-----|-----------|---------------------|--------------------------|-----------------------|
| 8 | 1000 mg以上 | | | |
| 7 | 1000mg未満 | ほとんどのパン、菓子パン | | |
| 6 | 100mg未満 | ●餅 超△△ ○のバターブレッド | | ●●●●●ロースハム |
| 5 | 10mg未満 | カレー●● | プチ○○○クッキー はじめての●●●● | ○○○○○ベーコン ポーク●●●●● |
| 4 | 1mg未満 | 餃○ 栗の●●●● | プチ△△△クッキー はじめての△△●●●● | |
| 3 | 0.1 mg未満 | | ○●○クッキー プチ●●●クッキー | |
| 2 | 0.01 mg未満 | | | ●●●●●ロースハム |
| 1 | 0.001mg未満 | | ○○○せんべい | |
| 0 | 含有なし | | ●●●かぼちゃボーロ にんじん●●●●● | ●●●●●ロースハム |

D. 考察

1) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討

魚アレルギー患者血清50名を用いたIgE結合能の相関係数は、同種であるベニザケ(さく河性)-ヒメマス(陸封性)間が一番高かった。サケアレルギー患者血清6名でのELISAインヒビションの結果、ベニザケとヒメマスはお互いに同等(ほぼ100%)の阻害率を示し、この結果からアレルゲン性は両者ほぼ同等と考えられた。

タンパク質泳動パターンおよび特異的IgE結合パターンに若干の差が見られたが、イムノプロットインヒビションで、それぞれの特異的IgE結合能を有するタンパク質バンドは、お互いの抗原添加によって、ほぼ同等にIgE結合は阻害された。このことはタンパク質の電気泳動パターンに若干の差が見られるが両者のアレルゲン活性はほぼ同一であると考えられた。

2) 食物アレルギー事例実態調査

食物アレルギー発症年齢は、離乳食のはじまる6ヵ月頃より増加し、1歳をピークに減少傾向にあり、これまでの報告と同様であった。アレルゲン進入ルートは、経口以外に、接触や吸入によるケースもあり、食物アレルギーの場合は食事時間以外の学習・遊戯(小麦の粘土の使用や大豆の入った袋を使用した遊戯)の時間においても注意しなければならないと思われた。

発生回数は初回が半数を占めていたが、4回以上繰り返しているケースもあり、こういったことから、繰り返す原因を探り出す必要があると思われる。

出現症状に関しては、症状は皮膚症状が最も高く、以下呼吸器症状、消化器症状と続いていた。アナフィラキシー症状は 21.1%で、これまでの報告より多かった。アナフィラキシーは患児の親にとって印象が強いため記憶に残りやすいためだと思われる。

原因食品は、義務表示となっている 7 品目が 3/4 を占めており、このことから、わかりやすく、しかも、正しい表示の徹底や、表示の確認の徹底により、誤食を防ぐことができると考えられた。

食物アレルギー発生場所は自宅、園・学校で多く、両者をあわせると過半数を超えていた。

自宅では、初めて食べて症状が出現する例が多かった。再発を防ぐことが難しいケースも多い一方で、表示に関連するアクシデントや、他の人の料理を触った・食べたなどと、なんらかの対策をたてることにより防げるケースも多くみられた。

自宅の次に多かった園・学校に於いては、友達のものに触った、交換して食べたなどの友達に関連したアクシデントや配膳ミスが多かった。配膳時の対策として、ネームプレートをつける、専用のプレートにのせる、確実に配膳されたことを確認するなど、具体的な対策が家族の意見としてあがっていた。

友達に関連した事例では、他の園児・生徒に食物アレルギーを正しく伝えるなどの対策があがっていた一方で、友達との交流を避けるなど消極的な対策の記載もみられた。

原因食品の性状は、原因食品そのもの、原因食品が容易に想像できるものが、6割を占めており、アレルゲンの入っていることがわかっていても、アクシデントが起こっており、アレルゲンを含む食品を手が届くところにおかないなど、アレルゲンをしっかり回避できる環境も同時に整えていく必要がある。

原材料表示に関連するアクシデントには、アレルギー物質が表示されていなかったり、表示がわかりにくい事例があった。正確でしかも誰にでもわかりやすい表示を考えなければならないと思われる。

店頭販売の食品やレストランでの料理には、アレルギー物質表示はなされる必要はない。外観からの自己判断誤りによる健康被害だけではなく、

誤った表示による事故や、店員に確認したにもかかわらずアレルゲンが入っていたなど、表示・口頭での確認がかえってアクシデントを招いているケースもある。今後、店頭販売・レストランにおいては店員に対して食物アレルギー患者接客法の教育を行い意識の向上を図る必要がある。さらには、アレルギー物質表示をする場合や、食物アレルギー対応をする場合は、マニュアルの整備と研修によって、事故が起きない体制作りが求められる。

3) 食物アレルギー誘発量の検討：

鶏卵は凍結乾燥卵白でも加熱卵白でも 7mg で約 10%の患者アレルギー症状を呈することが判明した。アレルギー症状を惹起する閾値を求めるためにはさらに低濃度の鶏卵抗原を用いた経口負荷試験を行う必要がある。

4) アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成：

今回の測定により、同じ食品群でもタンパク含有量にかなりの幅があることが判明した。これまで、「パンなら大丈夫です」「ハム・ウインナーなら食べることでできます」と、食品群で指導をしていたが、これでは過敏性が強い患者ではアレルギー症状が惹起されるおそれがある。アレルギー物質含有量に基づいた交換表ができれば、これを用いて、「交換表でアレルギー物質含有量がこのレベル以下の加工食品であれば安全に摂取できます」と、異なる食品群でも交換表に基づき、摂取可能な市販加工食品の指導が可能であることを示している。

今後は、今回試作した交換表の有用性と信頼性の検討を実際の経口負荷試験から判明した陽性域値と安全に摂取できる市販加工食品と照らし合わせることによって行う。このようなアレルギー物質含有量に基づいた交換表が完成すれば食物アレルギー患者の QOL 向上に役立つと期待される。

E. 結論

1) 表示対象食品のアレルゲン性に関する検討：
ベニザケ（さく河性）とヒメマス（陸封性）とは、IgE 結合能で検討したアレルゲン性はほぼ同一と考えられた。

2) 食物アレルギー事例実態調査

今回の食物アレルギー事例の集計結果をもとに、さらに詳しいアンケート調査を行い、今後、アクシデントの起こりやすい状況、それに対する具体的な対策をあげ、家庭、園・学校など場面ごとの食物アレルギー対応マニュアルの作成を目指す。

このマニュアルは、食に携わる関係者が食物アレルギー対応の具体的な指針となる。食物アレルギー患者の安全を保証し、しいては、食の安心・安全に貢献すると期待される。アレルギー物質の食品表示の改善にも有用な情報を提示できる。

3)食物アレルギー誘発量の検討:

ミリグラムオーダーではかなりの鶏卵アレルギー患者がアレルギーを惹起する。今後、マイクログラムオーダーという低濃度での経口負荷試験を行う計画を進めている。

4)アレルギー物質含有量に基づく食品交換表の作成:

同じ食品群に属する加工食品でも、アレルギー物質の含有量には大きな幅があることが判明した。このことは、アレルギー物質含有量の基づいてレベル分けする意義が示唆された。今回作成したアレルギー物質含有量に基づいた食品交換表の信頼性と有用性を実際の経口負荷試験の結果とリンクさせる検討をする。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1) Sakai S, Matsuda R, Adachi R, Akiyama H, Maitani T, Ohno Y, Oka M, Abe A, Seiki K, Oda H, Shiomi K, Urisu A. Interlaboratory Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods, *J AOAC Int*, 91, 123-129, 2008.

2) Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kato M, Kurahashi H, Urisu A, Asano Y, Up-regulated cytokine inducible SH2-containing protein expression

in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy*, 1493-1506, 2008.

3) Ando H, Movérare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres M, Urisu A, Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy, *J Allergy Clin Immunol*, 122, 583-588, 2008.

4) Doi H, Tsubata Y, Shibata H, Sakai S, Urisu Akiyama H, Teshima R, Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of walnut proteins in processed foods, *J Agri Food Chem*, 56, 7625-7630, 2008.

5) Morishita N, Kamiya K, Matsumoto T, Sakai S, Teshima R, Urisu A, Moriyama T, Ogawa T, Akiyama H, Morimatshu F, Reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of soybean proteins in processed foods, *J Agric Food Chem*, 56, 6818-6824, 2008.

6) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakai S, Kondo K, Toyoda M, Urisu A, Teshima R, Specific detection of buckwheat residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, 2228-2231, 2008.

7) Kondo Y, Ahn J, Komatsubara R, Terada A, Yasuda T, Tsuge T, Urisu. Comparison of allergen properties in salmon (*Oncorhynchus nerka*) from landlocked and anadromous habitats. *Allergology International* (in press).

2.学会発表

1) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Urisu A, Teshim R, Interlaboratory Evaluation of two kinds of ELISA kits for the determination of soybean protein and walnut protein in processed foods, 122nd AOAC Annual Meeting & Exposition, Dallas, USA, 2008, Sep

2) Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Ikuya T, Yasuda T, Urisu A, Allergen analysis of canned tuna using patient's sera Congress of

European Academy of Allergology and Clinical Immunology、2008.June、

3) Urisu A, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kawada Yasusuke Nakajima Y, Yukawa M, Kondo Y, Tsuge I, Tokuda R, Yamada K, Kimura M, Oral immunotherapy by heated and ovomucoid-reduced egg white to children with hen's egg hypersensitivity Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology、2008.June、

4) 宇理須厚雄、小松原亮、平田典子、各務美智子、川田康介、中島陽一、湯川牧子、近藤康人、柘植郁哉、山田一恵、寺西映子、近藤久、アレルギー疾患総合ガイドラインの作成に向けて、食物アレルギーと総合ガイドライン、第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008、6月。

5) 柘植郁哉、中島陽一、小松原亮、平田典子、湯川牧子、各務美智子、近藤康人、山田一恵、木村 守、宇理須厚雄、食物アレルギー研究の最近の進歩、食物アレルギーの寛容誘導法、第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008、6月。

6) 宇理須厚雄、厳格な除去食療法は食物アレルギーの寛解誘導に必須であるか？Conの立場から第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008、6月。

7) 近藤康人、中島陽一、小松原亮、湯川牧子、柘植郁哉、宇理須厚雄、安田俊隆、寺田明彦、サケ（さく河性）とマス（陸封性）の抗原性の相違に関する検討、第20回、日本アレルギー学会春季臨床大会東京、2008、6月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

魚類パルプアルブミンの性状と一次構造特性および非加熱甲殻類の ELISA 検査法の
問題点と改善

| | | |
|-------|-------|------------------|
| 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 | 嶋倉邦嘉 | 東京海洋大学食品生産科学科 |
| | 石崎松一郎 | 東京海洋大学食品生産科学科 |
| | 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 |
| | 上坂良彦 | 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 |

研究要旨

陸封型サケ科魚類のパルプアルブミンの一次構造解析: 陸封型サケ科魚類 3 種(ニジマス、ヤマメ、アマゴ)のパルプアルブミンの一次構造を cDNA クローニング法により解析した。全アミノ酸配列(108 残基)を解明できたニジマスのパルプアルブミンの場合、タイセイヨウサケのパルプアルブミン(アイソフォーム 1)と 96%という非常に高い配列相同性を示した。ヤマメとアマゴのパルプアルブミンについては部分アミノ酸配列(48 残基)を解明したが、この領域のアミノ酸配列はニジマスのパルプアルブミンと完全に一致した。陸封型サケ科魚類 3 種のパルプアルブミンのアミノ酸配列は異種の降海型サケ類(タイセイヨウサケ)のパルプアルブミンと高い配列相同性を示したので、同種の陸封型と降海型の間では変異はあってもごくわずかであると予想され、アミノ酸配列の点では陸封型と降海型のパルプアルブミンの IgE 反応性は同等と判断された。チダイパルプアルブミンの精製および性状: チダイの背側筋肉から、2 成分のパルプアルブミンをゲルろ過および逆相 HPLC で精製した。そのうちの 1 成分は、SDS-PAGE 分析ではパルプアルブミンより分子量が大きいこと、カエルパルプアルブミンに対するモノクローナル抗体とは反応しないこと、魚類アレルギー患者の一部しか反応しないことからパルプアルブミンとは異なる成分であると以前に報告されていたが、部分アミノ酸配列分析によりパルプアルブミンのアイソフォームであると同定された。このパルプアルブミンは、もう 1 成分のパルプアルブミンより IgE 反応性はかなり低いことが ELISA により明らかになった。頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善: 非加熱の「えび」および「かに」を丸ごと検体として ELISA キットで測定したとき、頭胸部に含まれるプロテアーゼが抽出操作中にトロポミオシンを分解するために反応性が低下することが判明した。そこで、プロテアーゼの影響を回避するための有効な抽出方法として加熱抽出法を開発した。各種甲殻類を用いて加熱抽出法を評価した結果、通常抽出法と比較して反応性の改善が確認された。頭胸部を含む非加熱の「えび」および「かに」の測定には、本研究で確立した加熱抽出法が有効であると考えられる。

A. 研究目的

アレルギー表示制度においてサケは特定原材料に準ずる品目として表示が奨励されているが、サケの範囲は降海型のみで陸封型は含まないと

なっている。このことが適切であるかどうかを検討するための基礎データとして、陸封型サケのパルプアルブミンの一次構造解析を目的とした。また、以前の研究において、パルプアルブミンより

分子量が少し大きく一部患者血清と反応するタンパク質（以下、タンパク質 A と呼ぶ）がタイ類に検出されている。タンパク質 A が新規アルゲンカパルブアルブミンのアイソフォームかを明確にするために、精製・同定することも目指した。さらに、すでに開発している甲殻類 ELISA 検査キットでは whole の生エビを測定できないという事例があったので、その原因究明と改善も試みた。

B. 研究方法

1) 陸封型サケ類のバルブアルブミンの一次構造解析

試料：陸封型サケ科魚類として、ニジマス、ヤマメおよびアマゴを試料とした。いずれも東京海洋大学で飼育されていた生魚を入手した。

cDNA クローニング：生魚から背側筋肉を採取し、TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。total RNA から mRNA Purification Kit (GE Healthcare) を用いて mRNA を精製し、さらに 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とし、既知の魚類バルブアルブミンをコードする cDNA の塩基配列から保存性の高い領域に基づいて設計した特異プライマーを用いて 3'RACE および 5'RACE を行った。増幅産物の塩基配列解析からバルブアルブミンのアミノ酸配列を演繹した。

2) チダイバルブアルブミンの精製および性状

精製方法：チダイの背側筋肉に 4 倍量の 0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてホモジナイズした。ホモジネイトを加熱 (100 °C、20 分間) 後、冷却遠心分離 (18,000 g、4°C、20 分間) により得られた上清を抽出液とした。抽出液を 0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-75 カラム (2.5 x 105 cm; GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供し、同緩衝液により溶出した。溶出液は 10 mL ずつ分取し、各フラクションの 280 nm における吸光値を測定した。SDS-PAGE 分析後、タンパク質 A およびバルブアルブミンの両者を含むフラクションを合一し、次に TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm; 東ソー) を用いる逆相 HPLC に供した。カラムの溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸溶液中のアセトニトリルの濃度勾配 (0-70%、2 分) により流速 1 mL/分で行っ

た。溶出液の 220 nm における吸光値を UV 検出器で連続的に測定し、ピークに対応する溶出液を分取した。

SDS-PAGE：SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (GE Healthcare) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare) を使用した。試料は 0.2 M ジチオスレイトール-4% SDS-6 M 尿素-125 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、70 °C、10 分加熱して変性後、泳動に供した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision plus protein standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

アミノ酸配列分析：精製したタンパク質 A を 2 M 尿素-1 mM EDTA-25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、リシルエンドペプチダーゼを添加して 35 °C で 24 時間消化した。酵素消化物を TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm) を用いる逆相 HPLC に供し、0.1% トリフルオロ酢酸溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配 (0-70%、120 分) により流速 1 mL/分で溶出した。溶出液の 220 nm における吸光値を UV 検出器で連続的に測定し、各ピークに対応する溶出液を分取した。分取した溶出液を乾固後、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を分析した。

ELISA：精製したタンパク質 A およびバルブアルブミンの IgE 反応性を、患者血清を用いた蛍光 ELISA により検討した。精製品溶液 (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) に固相化後、患者血清 (1:250 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。

3) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善

試料：スーパーマーケットならびに市場で甲殻類 10 種類および甲殻類加工品 8 種類を購入した。甲殻類は whole で購入可能な非加熱の「えび」7 種類 (ブラックタイガー、クルマエビ、ホッコクアカエビ、アカエビ、サルエビ、サクラエビ、アカザエビ) および「かに」3 種類 (ガザミ、サワガニ、アサヒガニ) を用いた。甲殻類加工品としては釜揚げサクラエビ、素干しサクラエビ、遠赤

外線乾燥アキアミ、釜揚げ後に干したクルマエビ、ホッコクアカエビの沖漬け、ホッコクアカエビのすり身、シラエビのすり身およびシバエビのすり身を用いた。すり身を除く加工品は、いずれも whole の甲殻類が含まれている。使用するまで乾燥加工品は室温に、その他の試料はすべて -80℃ で冷凍保存した。

試料溶液の調製 (通常抽出法) : ホモジナイザーで均一化した試料 1 g に FA テスト抽出用試薬「ニッスイ」(日水製薬; 以下、抽出用試薬と呼ぶ) より調製した抽出液 19 mL を混合して一晩 (12-20 時間) 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。プロテアーゼインヒビター (PI) の効果を検討する場合には、Halt Protease Inhibitor Cocktail および EDTA Solution (Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit、サーモフィッシュサイエントフィック) を 10、20 または 50 μ L/mL になるように添加した抽出液を用いた。

試料溶液の調製 (加熱抽出法) : 氷冷しながらホモジナイザーで均一化した試料 1 g に抽出用試薬より調製した抽出液 19 mL を加え、よく振り混ぜて固形分を均等に分散させた後、速やかに沸騰浴中で 30 分間加熱した。室温に戻した後、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。

ELISA による測定方法 : FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬; 以下、ELISA キットと呼ぶ) を用いた。ELISA キットの測定操作は既報にしたがって、試料抽出液をキット付属の検体希釈液で 20 倍に希釈して測定溶液を調製し、甲殻類総タンパク質濃度を求めた。測定溶液が上限値を超えた場合、希釈試験を実施した。その際の希釈操作には、抽出液を検体希釈液で 20 倍に希釈した溶液を用いた。

SDS-PAGE : ゲルに NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gels (インビトロジェン)、ローディング緩衝液に LDS Sample Buffer (インビトロジェン)、分子量マーカーに SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (インビトロジェン)、泳動用バッファーに MES SDS Running Buffer (インビトロジェン)、ゲルの染色に Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。

C. 研究結果

1) 陸封型サケ類のバルブアルブミンの一次構造解析

cDNA クローニング法により、ニジマスのバルブアルブミンについては全アミノ酸配列 (108 残基) を、ヤマメおよびアマゴのバルブアルブミンについては部分アミノ酸配列 (48 残基) を決定することができた。既知の魚類バルブアルブミンのアミノ酸配列と並べて図 1 に示すが、全アミノ酸配列を解析できたニジマスバルブアルブミンの場合、タイセイヨウサケのバルブアルブミン (アイソフォーム 1) との違いはわずか 4 残基であった (相同性は 96%)。また、ヤマメとアマゴのバルブアルブミンも、配列が明らかになった 48 残基に関してはニジマスのバルブアルブミンと完全に一致し、タイセイヨウサケのバルブアルブミン (アイソフォーム 1) とは 1 残基の違いしか認められなかった。

2) チダイバルブアルブミンの精製および性状

ゲルろ過および逆相 HPLC により、チダイ背側筋肉に含まれるタンパク質 A およびバルブアルブミンを精製した。逆相 HPLC で 2 本のピークが見られ、ピーク 1 にタンパク質 A が、ピーク 2 にバルブアルブミンが溶出された (図 2)。タンパク質 A については、リシルエンドペプチダーゼ分解後に逆相 HPLC でペプチド断片を単離し、そのうちの任意の 4 ペプチドのアミノ酸配列を分析した。その結果、DAGTFDHK、DAFFVIDQDK、LFLQNFK、IGADEFAEMVK の配列が得られ、データベース検索によりこれら配列は魚類バルブアルブミンの 20-27、46-55、65-71、97-107 の領域に相当することが判明した。したがってタンパク質 A はチダイバルブアルブミンのアイソフォームであると判断した。チダイから精製した 2 種類のバルブアルブミン (ピーク 1 成分およびピーク 2 成分) の IgE 反応性を 14 名の患者血清を用いた ELISA で調べたところ、ほとんどの患者でピーク 1 成分の反応性がピーク 2 成分より弱く、患者 123 や 124 ではピーク 1 成分との反応性はほとんどみられなかった (図 3)。

3) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善

Whole 試料と筋肉試料の比較 : ある施設で、非加熱のサルエビを whole で測定すると ELISA 反応が検出限界以下となる事例があったが、筋肉試料でのデータは得られていなかった。また、他の「えび」でもサルエビと同様な現象がみられるかどうか不明であった。これらの点を明らかにするために、サルエビを含む 4 種類の「えび」の

whole および一般的な可食部である外殻を除いた腹部筋肉から通常抽出法で調製した試料抽出液を用いて検討した。ELISA キットおよび SDS-PAGE による分析結果を表 1 および図 4 に示すが、ブラックタイガー、アカエビ、サルエビの whole では、ELISA キットは検出限界以下 ($<0.31 \mu\text{g/g}$)、SDS-PAGE においてもタンパク質バンドはほとんど検出されなかった。ホッコクアカエビの場合、弱い ELISA 反応は確認されたものの、SDS-PAGE ではトロポミオシン (約 38 kDa) より低分子のスミア状のバンドのみであった。一方、腹部筋肉では、すべての「えび」で whole と比較して ELISA キットは 40 倍以上の高い反応性を示し、SDS-PAGE ではアカエビを除いてトロポミオシンを含む高分子タンパク質のバンドが確認された。また、SDS-PAGE においては、ELISA キットの測定値が高いほどトロポミオシンおよび高分子タンパク質のバンドは強く検出された。

加熱およびプロテアーゼインヒビター (PI) 添加の評価: 甲殻類のプロテアーゼ活性は、頭胸部、特に肝臓で高いことが知られているので、ELISA キットにおける反応性の低下は、頭胸部に含まれるプロテアーゼによって抽出操作中にトロポミオシンが分解されることが原因と推測された。そこでプロテアーゼの影響を確認するために、サルエビの whole 試料を用いて加熱および PI の効果について検討した。加熱の検討のためには whole 試料を 100°C で 30 分間加熱後に均質化し、通常抽出法により試料抽出液を調製した。PI の検討には、PI を添加した抽出液を用いて通常抽出法により試料抽出液を調製した。whole 試料から通常抽出法により抽出した場合には ELISA では検出限界以下であったが (表 1)、加熱した whole 試料から抽出した場合には $42,348 \mu\text{g/g}$ 、PI を添加した抽出液 (PI 濃度は $10 \mu\text{L/mL}$) を用いた場合には $2,111 \mu\text{g/g}$ の測定値が得られた。これらの結果は加熱によるプロテアーゼの失活、PI によるプロテアーゼの阻害を意味しており、whole 試料から通常抽出法により抽出した場合の測定値低下の原因はプロテアーゼの影響であると判断した。

生の甲殻類 whole 試料での加熱抽出法の評価: 加熱処理では高い測定値が得られ、whole 試料の測定値低下の改善法として加熱処理は有効と思われた。そこで「えび」7 種類、「かに」3 種類を用いて加熱抽出法の評価を行った。それぞ

れの whole 試料 (ホモジナイザーへの過度の負担を避けるためアサヒガニのみ背甲を除去) をホモジナイザーで均質化後、通常抽出法と加熱抽出法で試料抽出液を作製し、ELISA キットを用いて測定した。表 2 に示すように、加熱抽出法では通常抽出法と比較して非常に高い測定値が得られた。「えび」は種類に関わらず同程度の値であったが、「かに」は種類によって異なる値を示した。これは、検討に用いた「かに」は種類によって頭胸部、鋏脚、歩脚の重量比が異なっており、whole で測定した場合にはトロポミオシンを多く含む鋏脚および歩脚が占める割合に応じて測定値に差が生じたと考えられた。なお、ELISA キットの特異性は各種甲殻類のトロポミオシンに対して同等の反応性が確認されている。

甲殻類加工品での加熱抽出法の評価: 甲殻類は whole で加工されることも多く、このような加工品においても通常抽出法ではプロテアーゼの作用による測定値の低下が懸念される。そこで、8 種類の「えび」の加工品 (すり身 3 種類以外は whole の加工品) を用いてこの点を検討した。ホモジナイザーで均質化した加工品からそれぞれ通常抽出法と加熱抽出法で試料抽出液を調製し、ELISA キットにおける測定値を比較した。表 3 に示すように、通常抽出法による測定値の著しい低下は素干しのサクラエビ、遠赤外線乾燥のアカミ、沖漬けのホッコクアカエビで認められた。一方、釜揚げのサクラエビ、釜揚げ後に干したクルマエビ、すり身の加工品では通常抽出法と加熱抽出法は同程度の測定値を示した。

D. 考察

1) 陸封型サケ科魚類のバルブアルブミンの一次構造解析

これまでにアミノ酸配列が明らかになっている魚類バルブアルブミンの配列相同性は 50-80% であるので、本研究で明らかになったニジマスのバルブアルブミンとタイセイヨウサケのバルブアルブミン (アイソフォーム 1) との配列相同性 (96%) はきわめて高い。ヤマメとアマゴのバルブアルブミンについては、解析できた領域のアミノ酸配列はニジマスのバルブアルブミンと完全に一致していることを考えると、タイセイヨウサケのバルブアルブミン (アイソフォーム 1) との配列相同性はきわめて高いと予想される。

本研究で取り上げた陸封型サケ科魚類の降海

型は、ニジマスではスチールヘッド、ヤマメではサクラマス、アマゴではサツキマスである。同じ魚種で陸封型と降海型ではパルブアルブミンのアミノ酸配列には変異があると考えられるが、異魚種であっても陸封型と降海型(タイセイヨウサケ)のアミノ酸配列の相同性がきわめて高いことが判明したので、同種の陸封型と降海型の変異はごくわずかであると予想される。本研究結果から、主要アレルゲンであるパルブアルブミンの IgE 反応性は陸封型と降海型ではほとんど差がないと判断される。ただし、陸封型と降海型では、環境の違いによってパルブアルブミン含量に違いがあることは考えられるので、アレルゲン性を明確にするためにはパルブアルブミン含量を測定することが望まれる。

2) チダイパルブアルブミンの精製および性状

タイ類に検出されていたパルブアルブミンより少し分子量の大きいタンパク質(タンパク質 A)を精製し、その部分アミノ酸配列からパルブアルブミンのアイソフォームであることを明らかにした。本パルブアルブミンの IgE 反応性はもう 1 成分のパルブアルブミンと比べると弱く、患者 123 や 124 では無視できるレベルであった。チダイから精製した 2 成分のパルブアルブミンは IgE 反応性に大きな違いがあったので、これらパルブアルブミンはパルブアルブミンの IgE 反応性を分子レベルで理解するためのよいモデルとなると考えられる。

以前にイムノプロットによる定性的分析で、タンパク質 A (パルブアルブミンのアイソフォーム)と反応する患者は一部であったことは、本研究の ELISA 結果とよく符合している。タンパク質 A は SDS-PAGE でパルブアルブミンより分子量が少し大きいと見積もられていた。タイ類以外にもパルブアルブミンより少し分子量が大きい位置にタンパク質バンドがみられる魚種があるが、これらバンドもパルブアルブミンの可能性はある。

3) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善

非加熱の whole 試料を ELISA キットで測定できない原因は、頭胸部(特に肝臓)に高濃度に含まれるプロテアーゼにより測定対象タンパク質であるトロポミオシンが分解を受けるためであることを明らかにした。さらに、プロテアーゼの影響を回避するための有効な抽出方法として加

熱抽出法を開発した。各種甲殻類を用いて加熱抽出法を評価した結果、通常抽出法と比較して反応性の改善が確認された。加熱抽出法は抽出液の調製を短縮できかつ抽出効率も良好であるので、非加熱で whole の「えび」および「かに」を測定する際に適した方法であると判断した。

甲殻類加工品の場合、釜揚げのサクラエビ、釜揚げ後に干したクルマエビ、すり身の加工品では通常抽出法と加熱抽出法は同程度の測定値を示した。釜揚げのサクラエビや釜揚げ後に干したクルマエビの場合、沸騰した湯に「えび」を入れて茹で上げる方法であるため、十分な加熱によりプロテアーゼが失活したと考えられた。すり身については、プロテアーゼの影響を受けにくい腹部筋肉のみを使用しているため当然の結果であろう。一方、素干しのサクラエビ、遠赤外線乾燥のアキアミ、沖漬けのホッコクアカエビでは通常抽出法による測定値の著しい低下が認められた。素干しのような非加熱の乾燥品や弱い加熱の遠赤外線乾燥品ではプロテアーゼが失活せずに残存していると考えられた。沖漬けは活きたままホッコクアカエビを丸ごと醤油とみりんに漬けている。このような高塩濃度下においても失活せずにプロテアーゼの活性が残存していた。

以上の結果より、頭胸部を含む甲殻類の ELISA 測定においては、生原料だけでなく非加熱または加熱の程度が弱い加工品にも加熱抽出法が有効であると考えられた。

E. 結論

1) 陸封型サケ科魚類のパルブアルブミンの一次構造解析

陸封型サケ科魚類のパルブアルブミンの一次構造は降海型と非常に類似している。少なくともパルブアルブミンの一次構造の点では、陸封型と降海型のサケ類のアレルゲン性には著しい差異はないと考えられる。

2) チダイパルブアルブミンの精製および性状

チダイから精製した 2 成分のパルブアルブミンの IgE 反応性は大きく異なり、チダイパルブアルブミンはパルブアルブミンの IgE 反応性を分子レベルで解析する際のよいモデルとなり得る。

3) 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法の問題点と改善

生の whole の甲殻類、あるいは非加熱または加熱の程度が弱い whole の甲殻類加工品では、通常

抽出法では ELISA キットでは測定できない。このような甲殻類を ELISA キットで測定する場合、加熱抽出法を採用することが適切である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡 道弘, 阿部晃久, 織田浩司, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穂山 浩, 手島玲子: 食品原材料中に含まれる「えび」, 「かに」等の甲殻類タンパク質の実態調査. 日本食品化学学会誌, 15, 12-17 (2008)
- 2) Y. Kobayashi, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Ani s 1, the major allergen of *Anisakis simplex*: purification by affinity chromatography and functional expression in *Escherichia coli*. Parasitol. Int., 57, 314-319 (2008)
- 3) K. Motoyama, Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y. Lu, H. Ushio and K. Shiomi: Identification of tropomyosins as major allergens in Antarctic krill and mantis shrimp and their amino acid sequence characteristics. Mar. Biotechnol., 10, 709-718 (2008)
- 4) S. Yoshida, A. Ichimura and K. Shiomi: Elucidation of a major IgE epitope of Pacific mackerel parvalbumin. Food Chem., 111, 857-861 (2008)
- 5) 塩見一雄: 甲殻類アレルギーの分子生物学的解析. アレルギーの臨床, 28, 631-637 (2008)
- 6) 塩見一雄: 魚類間および甲殻類・軟体類・昆虫類間の交叉反応性. 臨床免疫・アレルギー科, 50, 188-195 (2008)
- 7) 塩見一雄: 魚介類アレルギーの免疫生物学とアレルギー疾患. アレルギー, 57, 1083-1093 (2008)
- 8) 柴原裕亮, 山田一多, 上坂良彦, 畷尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 塩見一雄: 頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 検知法に適した抽出法の開発. 食品衛生学雑誌 (投稿中)

2. 学会発表

- 1) 繁平有希, 猪又直子, 中河原怜子, 小林征洋, 塩見一雄, 池澤善郎: アニサキスアレルギーにおける精製及び組み換えアレルギー 9 種を用いたブリックテストの検討. 第 58 回日本アレ

ルギー学会秋季学術大会 (2008 年 11 月, 横浜)

- 2) 中村和子, 猪又直子, 大川智子, 前田修子, 桐野実緒, 塩見一雄, 池澤善郎: アスピリン 1.5g の組み合わせ負荷試験により診断し得たイカの食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの 1 例. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2008 年 11 月, 横浜)
- 3) 原田 晋, 塩見一雄, 太田國隆, 工藤比等志: 魚アレルギーの 3 例-原因抗原解析に関する検討と共に-. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2008 年 11 月, 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

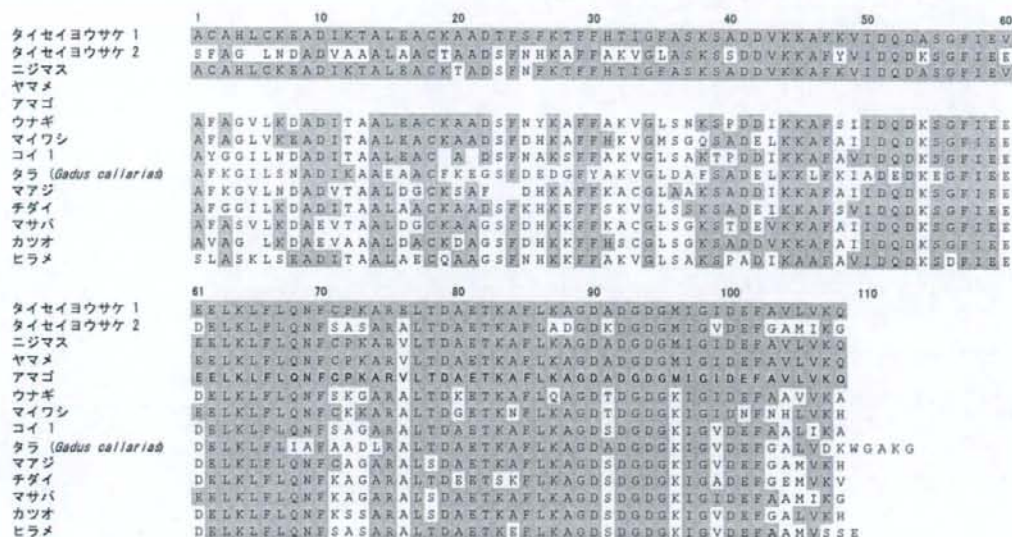


図1 各種魚類パルプアルブミンのアミノ酸配列
タイセイヨウサケ1 (アイソフォーム1) と同じ残基に影をつけて示す。

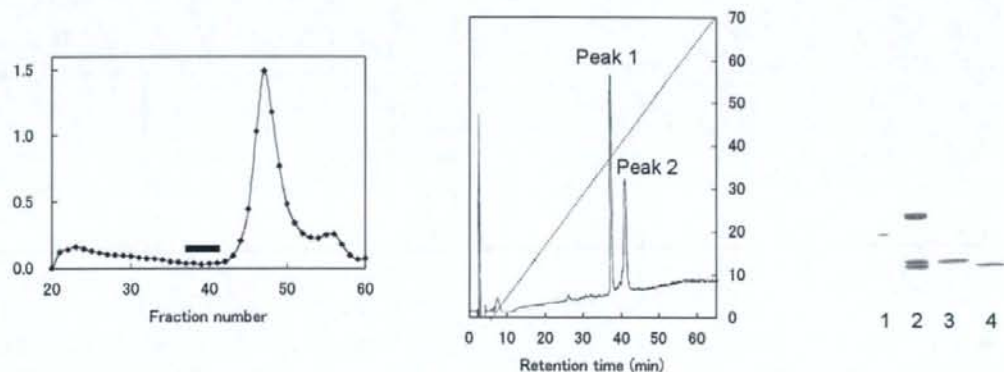


図2 チダイからのパルプアルブミンの精製
(左) ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-75). パルプアルブミンの溶出位置はバーで示す。
(中) 逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T). (右) SDS-PAGE. レーン: 1, 分子量マーカー; 2, 抽出液; 3, peak 1 成分; 4, peak 2 成分.

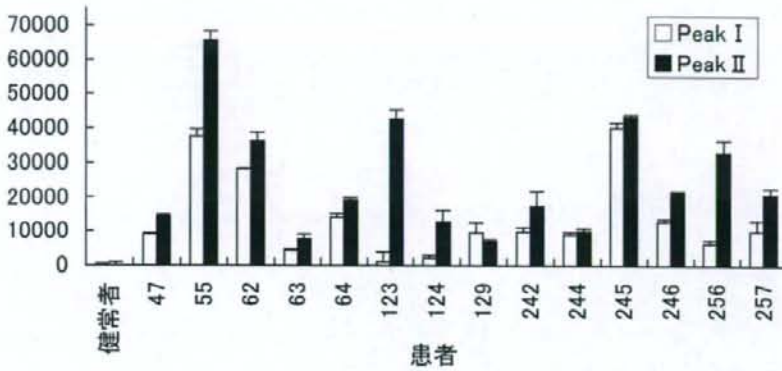


図3 チダイから精製した2成分のパルブアルブミン (peak1成分および peak 2成分) のIgE反応性(蛍光ELISA)

表1 4種甲殻類の whole 試料および筋肉試料のELISAキットによる測定

| 試料 | 甲殻類タンパク質濃度 (μg/g) | |
|----------|-------------------|---------|
| | Whole 試料 | 筋肉試料 |
| ブラックタイガー | < 0.31 | 37,474 |
| ホッコクアカエビ | 2,616 | 117,183 |
| アカエビ | < 0.31 | 14,150 |
| サルエビ | < 0.31 | 109,155 |

図4 4種甲殻類の whole 試料(WB) および腹部筋肉試料(AM)からの抽出液のSDS-PAGE.

レーン:M、標準タンパク質;1、ブラックタイガーWB; 2、ホッコクアカエビ WB; 3、アカエビ WB; 4、サルエビ WB; 5、ブラックタイガー AM; 6、ホッコクアカエビ AM; 7、アカエビ AM; 8、サルエビ AM; TM、トロポミオシン.

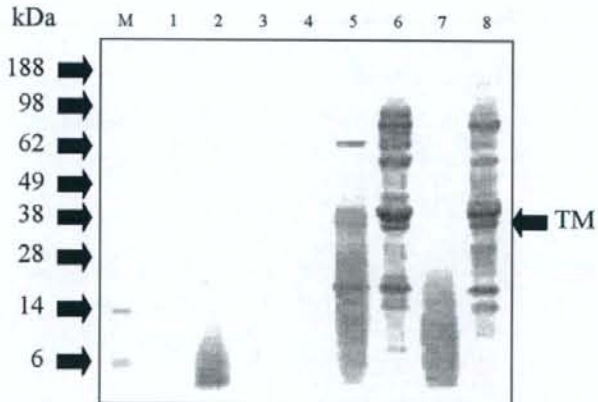


表2 ELISA キットによる甲殻類タンパク質濃度の測定に及ぼす抽出法の影響

| 試料 | 甲殻類タンパク質濃度 (μg/g) | |
|----------|-------------------|--------|
| | 通常抽出法 | 加熱抽出法 |
| ブラックタイガー | < 0.31 | 47,254 |
| クルマエビ | 2 | 49,042 |
| ホッコクアカエビ | 3,600 | 48,829 |
| アカエビ | 3 | 41,681 |
| サルエビ | < 0.31 | 47,155 |
| サクラエビ | 218 | 45,085 |
| アカザエビ | 956 | 37,175 |
| ガザミ | 8 | 35,278 |
| サワガニ | < 0.31 | 9,020 |
| アサビガニ | < 0.31 | 19,340 |

表3 ELISA キットによる甲殻類加工品タンパク質濃度の測定に及ぼす抽出法の影響

| 原料 | 加工方法 | 甲殻類タンパク質濃度 (μg/g) | |
|----------|----------|-------------------|---------|
| | | 通常抽出法 | 加熱抽出法 |
| サクラエビ | 釜揚げ | 89,033 | 86,080 |
| サクラエビ | 素干し(非加熱) | 9 | 33,285 |
| アキアミ | 遠赤外線乾燥 | 370 | 5,578 |
| クルマエビ | 釜揚げ後乾燥 | 374,976 | 403,280 |
| ホッコクアカエビ | 沖漬け | 1,878 | 17,834 |
| ホッコクアカエビ | すり身(生) | 24,009 | 24,544 |
| シラエビ | すり身(生) | 8,833 | 9,587 |
| シラエビ | すり身(生) | 106,710 | 113,039 |

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)
科学的知見に基づく食品表示に関する研究
分担研究報告書

果実・種実類検知法の開発及びバリデーション

研究分担者 安達玲子(国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者 田口大夢、渡辺聡、平尾宜司(ハウス食品株式会社)
阿部晃久、山田彰一(日本水産株式会社)
柴原裕亮、上坂良彦(日水製菓株式会社)
清木興介、織田浩司(株式会社マルハニチロホールディングス)
秋元政信、加藤重城(プリマハム株式会社)
森山達哉(近畿大学農学部)
橋本博之(千葉県衛生研究所)
酒井信夫、梶山浩、手島玲子(国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨: アレルギー物質を含む食品の適切な表示のため、[1]20年度新たに特定原材料に指定されたえび・かきの確認検査法として開発された、えび・かきをそれぞれ特異的に検知する定性 PCR 法の妥当性を評価した。[2]特定原材料に準ずるものであるキウイフルーツを検知する ELISA 法の開発を行った。[3]同じくバナナを検知する ELISA 法の開発を行った。[4]アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発のための基礎検討を行った。その結果、[1]6種類のモデル加工食品を用いた外部機関による多機関バリデーションにおいて、厚生労働省通知の基準(陽性試料の陽性判定率 90%以上、陰性試料の陰性判定率 90%以上)を満たすことが示され、えび・かきに検知 PCR 法はえび・かきの確認検査法として実用可能であることが確認された。[2]平成 17-19 年度の厚生労働科学研究において選択したアクチニジンに対するモノクローナル抗体の組み合わせは、牛肉、豚肉、牛乳、鮭などに対し偽陽性反応を示したため、新たに 5 株の抗変性アクチニジンモノクローナル抗体を調製し検討したところ、偽陽性のない組み合わせが得られた。また、加工食品に対応したイムノクロマトキットでは製品換算で 2 µg/g のキウイフルーツタンパク質が検出できた。[3]キッチンアフィニティーカラムとゲル濾過 HPLC を組み合わせることで得られた未変性キチナーゼを用いて抗体作製を行い、5種類のマウスモノクローナル抗体が樹立された。得られた抗体を組合せ、サンドイッチ ELISA 系を構築した。この ELISA 系を用いてキチナーゼに対する反応性を検討したところ、未変性キチナーゼに対しては優れた反応性を示したが、変性キチナーゼに対する反応性は低かった。[4]アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法開発に必要な抗体を供給するため、オボアルブミンに対するモノクローナル抗体を調製し、これらの抗体が、未変性オボアルブミンだけでなく変性オボアルブミンに対しても反応性を示すことを確認した。

A. 研究目的

食品に関する表示制度の一つである「アレルギー物質を含む食品の表示」制度の適切な運用に資するため、特定原材料であるえび・かきの定性検査法(PCR法)の妥当性評価、特定原材料に準ずるものである

キウイフルーツ及びバナナに対する定量的検査法(ELISA法)の開発、及び、食品製造現場等でも使用可能な迅速・簡便・安価な定量的検知法の開発のためのモノクローナル抗体に関する検討を行った。

B. 研究方法

[1] えび及びかにに検知PCR法のバリデーション

1) えび・かに標準粉末調製: えび一次標準粉末の調製は以下のようにして行った。ウシエビ(ブラックタイガー)(養殖エビ)の尾部筋肉を採取し、氷冷しながら均一にホモジナイズした後に凍結乾燥した。乾燥物を微粉碎し、えび一次標準粉末とした。かに一次標準粉末も同様に、タラバガニの脚肉を採取し、氷冷しながら均一にホモジナイズした後に凍結乾燥した。乾燥物を微粉碎し、かに一次標準粉末とした。これらの一次標準粉末から SDS、還元剤、プロテアーゼインヒビターを含む抽出液にてタンパク質を抽出し、2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いてタンパク質を定量し、標準粉末に含まれるタンパク質量を算出した。

2) 試料: 白粥、鶏肉団子、フリーズドライ野菜スープ(FDスープ)、クリームコロッケ、味噌汁、しらたき麺(えび検知PCRの場合)、ふりかけ(かに検知PCRの場合)を作製した(表1)。陽性試料には、原材料段階でえび又はかに標準粉末を添加し、加工を行った。添加量は終濃度で 10 µg タンパク質/g となるように調整した。

3) 陽性試料の均一性評価: 陽性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、甲殻類検知ELISAキットを用いて定量した。
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、試料内の分散及び試料間の分散を求めた。

4) 2機関プレバリデーション: 多機関バリデーションに先立って、ハウス食品(株)と国立衛研との2機関でプレバリデーションを行った。各モデル加工食品からイオン交換樹脂タイプキット法(QIAGEN Genomic-Tip 20/G)を用いてDNAを抽出し、吸光度を測定した。OD260の値よりDNA濃度を算出し、また

OD260/OD280比よりDNAの純度を確認した。このようにして各試料から抽出したDNAを鋳型として、まず、植物DNA検出PCR(白粥、FDスープ、クリームコロッケ、味噌汁、しらたき麺)または動物DNA検出PCR(鶏肉団子、ふりかけ)を行い、PCRが問題なく進行し増幅産物が得られることをアガロースゲル電気泳動にて確認した。次に、えび検知PCR、かに検知PCRを行い、それぞれの増幅産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。(えび・かにに検知PCRプライマー及びPCR条件については、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21年1月22日食安発第0122001号(以下通知検査法)を参照のこと。)

5) 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。

1. 財団法人食品環境検査協会東京事業所
2. 千葉県衛生研究所食品化学研究室
3. 株式会社ニッポンジーン研究試薬部製品開発課
4. 財団法人日本食品分析センター千歳研究所生物科学課
5. 日本水産株式会社食品分析センター
6. 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
7. 株式会社ハウス食品分析テクノサービス分析サービス部
8. 株式会社ファスマック遺伝子検査事業部
9. 株式会社マルハニチロホールディングス中央研究所
10. 和光堂株式会社商品開発本部開発支援部

6) バリデーション手順: バリデーション参加機関には、各試料から抽出したDNA溶液(陽性試料6種類+陰性試料6種類、各2サンプル、合計24サンプル)を送付し、PCR及びアガロースゲル電気泳動によるPCR増幅産物の確認を行ってもらうこととした。

参加機関には、バリデーション手順に関する文書、試験マニュアル、抽出DNA溶液、えび・かに検知PCRプライマー、PCR試薬一式、PCRプレートを送付した。

参加機関は、えび検知PCR、かに検知PCRそれぞれについて、24サンプルのPCRを行った。2機関プレ

バリデーションの場合と同様に、まず植物または動物DNA検出PCRを行い、PCRが問題なく進行することを確認し、次に、えび又はかに検出PCRを行った。得られたアガロース電気泳動像、及び各サンプルの陽性/陰性判定結果を結果報告様式に記載し、国立衛研代謝生化学部に返送した。国立衛研では参加機関の判定結果を集計し、それぞれの試料についての陽性・陰性判定率を集計した。なお、各サンプルの陽性・陰性の別については参加機関には知らせず、ブラインド試験としてバリデーションを行った。

12]キウイフルーツ検知ELISA法の開発

1) キウイフルーツ検知ELISAキットの偽陽性食品の検証:牛肉、豚肉、牛乳、黒豆、しょうがの各1 gに、0.5% SDS、2% 2-メルカプトエタノール(以下、2-ME)を含むPBS 19 ml加え、1時間沸騰水中で時々攪拌しながら抽出を行った。標準曲線には、同様に沸騰水中で1時間加熱抽出したキウイフルーツタンパク質の希釈溶液を用いた。

2) F(ab')₂化モノクローナル抗体(以下Mab)を用いた偽陽性食品の検証:ImmunoPure F(ab')₂ Preparation KitおよびImmunoPure Mouse IgG1 Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (ピアス社製)によりMabの消化を行い、EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxydase Kit (ピアス社製)によりHorseradish Peroxydase (以下、HRP) 標識を行った。得られたF(ab')₂化抗体ならびにHRP標識抗体を用いて、1)で偽陽性を示した食品に対する反応性を検証した。

3) 変性アクチニジン(以下、D-ACT)認識Mabの新規作製: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)製)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。このD-ACTに対して、常法に従い抗D-ACT Mabを作製した¹⁾。作製したMabについて、マウス腹水法により腹水を得た後、Protein Gカラムで精製し、ビオチン標識を行なった。既存の未変性アクチニジン(以下、N-ACT)認識Mab9株およびD-ACT認識Mab 18株に加え、ビオチン標識抗体を二次抗体としたサンドイッチELISAにより、それぞれ

の組み合わせを検討した。また、選ばれた組み合わせについては、1)に従い他の食品への偽陽性の検証を行なった。

4) 加工食品に対応したイムノクロマトキット(以下、IC)の検討: SDSおよび2-MEをなどで抽出したD-ACTを検出するためのICを検討した。ICに適したMabを選択し、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開発し、検出感度および市販食品における検出を検討した。

13] バナナ検知ELISA法の開発

バナナ検知ELISA法のターゲット分子として、キチナーゼを、キチンアフィニティークラム及びゲル濾過HPLCにて精製した。得られた精製キチナーゼを用いて、常法に従い、ウサギポリクローナル抗体及びマウスモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体の一部をビオチン標識し、未標識抗体と組み合わせることによりサンドイッチ ELISA 系を構築した。このELISA系を用いて、未変性キチナーゼ、SDS及び 2-ME にて変性させたキチナーゼに対する反応性を検討した。

もう一つのターゲット分子候補であるソーマチンライクプロテインに関しては、17-19 年度の厚生労働科学研究において得られた抗体を用いた。アビジン-ビオチン系及び標識酵素の選定を行った。

14] アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発

オボアルブミン(OVA)をラットに免疫し、ハイブリドーマ作製を行った。未変性状態のOVAを96wellプレートにコーティングして反応を確認した。それと同時にSDS-PAGEに供するサンプル前処理と同様の操作でOVA溶液と等量のサンプルPBSを混合し、95度5分加熱処理したサンプルを調製し、変性OVAサンプルとした。未変性OVA、変性OVAに対するハイブリドーマ培養上清の反応性をELISAにより確認し、未変性、変性両方のタンパク質に対する反応するハイブリドーマクローンを選別した。

C. 研究結果

[1] えび及びかにに検知PCR法のバリデーション

1) 陽性試料の均一性評価: 各試料の抗原(えび/かにタンパク質)濃度の均一性評価結果を、表2に示す。えび検知用PCR試料におけるえびタンパク質濃度は7.07-9.74 µg/g、かに検知用PCR試料におけるかにタンパク質濃度は2.99-5.66 µg/gとなった。甲殻類検知E LISAキットに添付されているえび(ブラックタイガー)標準液でかに検知PCR用試料を測定した場合の測定値は実際のかにタンパク質濃度の約1/2となることが事前の検討により示されている。(かに標準液で検量線を作成すると実際の濃度にほぼ等しい結果が得られる。)今回のかに検知PCR用試料の測定はえび標準液を用いて行ったものであり、実際の値は約2倍(約6.0-11.3 µg/g)と考えられる。えび、かにの場合とも、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、えび、かにの場合とも9%以下であった。この結果から、これらの陽性試料は、えび・かにに検知PCR法の試験室間バリデーションのための試料として使用可能であることが確認された。

2) 2機関プレバリデーション: ハウス食品(株)と国立衛研との2機関プレバリデーションとして行った、各モデル加工食品からのDNA抽出の結果を表3に示す。通知検査法では、食品から抽出したDNAについて、濃度は20 ng/µL以上、OD260/280は1.2-2.5、OD260/230は2.0以上であることが望ましいとされている(OD280はタンパク質等不純物由来の吸光度、OD230は糖やフェノール等の低分子化合物由来の吸光度)。2機関それぞれで抽出したDNA濃度はほとんどの場合20 ng/µLを大きく上回る値となった。OD260/280値は全て1.2-2.5の範囲であった。OD260/230値については、2.0を下回る場合も見られた。

上記抽出DNAを用いて、2機関それぞれにおいてPCRを行った。その結果、植物または動物DNA検出PCRが問題なく進行することが確認され、また、えび検知PCR、かにに検知PCRについても問題なく進行し、陽性試料は全て陽性、陰性試料は全て陰性という

判定結果となった(data not shown)。

以上の結果より、2機関プレバリデーションにおいて、各モデル加工食品からのDNA抽出、及びえび・かにに検知PCRが問題なく進行し、試料の陽性・陰性を正しく判定することが可能であることが確認された。

3) 多機関バリデーション: 2機関プレバリデーションにおいて、各試料からのDNA抽出及びPCRが問題なく進行することが確認されたので、バリデーション参加機関には、各試料から抽出したDNA溶液(陽性試料6種類+陰性試料6種類、各2サンプル、合計24サンプル)を送付した。参加機関ではPCR及びアガロースゲル電気泳動によるPCR増幅産物の確認を行った。(えび検知PCRに関しては、偽陽性を示す数種類のかにとの区別が必要な場合には、PCR産物の制限酵素処理を行い、その消化産物をアガロースゲル電気泳動により確認することとなっているが、本バリデーションは、試料の陽性/陰性を判定し、通知検査法に記載されている定性検査法としての基準を満たすことを確認するためのものであるため、制限酵素処理は行わないこととした。)

バリデーション参加機関の電気泳動結果例を図1に示す。このような形で参加機関から電気泳動画像及び陽性・陰性判定結果が国立衛研に返送された。国立衛研では判定結果を確認し、集計した。その結果を表4に示す。バリデーション参加機関は10機関であったが、えび検知PCRでは2機関で、かにに検知PCRでは1機関で、ポジティブコントロールサンプルのPCR増幅産物が確認できなかったため、これらの機関の結果は全て棄却した。そのため、えび検知PCRでは全8機関、かにに検知PCRでは全9機関の結果を集計した。

えび検知PCRの場合は、各モデル加工食品について、2サンプル×8機関=16個の判定結果が得られたが、そのうち、しらたき類で陽性サンプルが陰性と判定されたものが1個、白粥で陰性サンプルが陽性と判定されたものが1個あったため、その2種では正解判定率が94%となっている。それ以外は全て100%の正解判定率であった。かにに検知PCRの場合は、各モデル加工食品について、2サンプル×9機関=18個

の判定結果が得られたが、陽性・陰性の正解判定率は全て100%であった。

[2] キウイフルーツ検知ELISA法の開発

1) キウイフルーツ検知ELISAキットの偽陽性食品の検証:平成 17-19 年度の厚生労働科学研究において開発を進めていたキウイフルーツ検知ELISAキットに関して、各食品に対する偽陽性反応を検討した結果を表 5 に示す。黒豆、しょうがといった植物性食品に対しては偽陽性反応が見られなかったが、牛肉、豚肉、牛乳、鮭といった動物性食品に対しては極めて高い偽陽性反応が認められた。

2) F(ab')₂ 化 MAb を用いた偽陽性食品の検証:1) で他の食品に高い偽陽性反応が認められたため、抗体の F(ab')₂ 化処理を行い、非特異的結合の低減化を図った。しかし、表 6 に牛乳を例として示すように、偽陽性反応は解消できなかった。

3) D-ACT 認識 MAb の作製:これまでの抗体の組み合わせでは、牛乳等に非常に高い偽陽性反応を示すことが明らかとなったので、新たな抗 D-ACT 認識 MAb を作成した。5 株の新規 D-ACT 認識 MAb を確立し、既存の MAb との組み合わせから検出感度が高いものが新たに選択された。そこで、1) に従い標準曲線を作成し(図 2)、各種食品に対する偽陽性反応を確認したところ、落花生、生クルミで 1 µg/g 未満のわずかな偽陽性が見られたものの、他の食品では検出限界以下となり(表 7)、牛乳等に対する高い偽陽性反応が解消された。

4) 加工食品に対応した IC の検討:ELISA 系の場合には加工食品からタンパク質を効率よく抽出するために SDS 及び 2-ME を含む抽出液が使用されている。今回、ELISA と同様に SDS 及び 2-ME を含む抽出液で抽出した変性キウイフルーツタンパク質を検出可能な IC を開発した。この IC では、SDS および 2-ME 存在下で、キウイフルーツタンパク質を製品換算で 2 µg/g まで検出できることが確認された(表 8)。また、本 IC を用いて市販食品を検査したところ、キウイフルーツが表示されているものは全て陽性、表示のないものでは陰性と判定され(表 9)、実際の表示との整合性を示す

非常に良好な結果となった。

[3] バナナ検知ELISA法の開発

バナナキチナーゼの精製には、キチンアフィニティカラムを用いた精製が有効であったが、ゲル濾過 HPLC を組み合わせることでさらに純度が向上した。こうして得られた未変性キチナーゼを用いて抗体作製を行い、5 種類のマウスモノクローナル抗体が樹立された(表 10)。得られた抗体を組合せ、サンドイッチ ELISA 系を構築した。この ELISA 系を用いてキチナーゼに対する反応性を検討したところ、未変性キチナーゼに対しては優れた反応性を示したが、変性キチナーゼに対する反応性は低かった(図 3)。

もう一つのターゲット分子候補であるソーマチンライクプロテインに関しては、17-19 年度の厚生労働科学研究において得られた抗体を用いて、アビジン-ビオチン系及び標識酵素を選定し、高感度なサンドイッチ ELISA 系の構築を試みた。

[4] アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発

オボアルブミン(OVA)をラットに免疫し、ハイブリドーマ作製を行い、各クローンの培養上清を、未変性 OVA と変性 OVA を用いて確認したところ、良好に反応する 5 種クローン(1H1、2C9、3H2、4B12、5B3)が得られた。2C9、3H2、5B3 は未変性 OVA と変性 OVA の両方に反応したが、1H1 と 4B12 は、未変性 OVA のみに反応した(図 4-図 8)。

D. 考察

[1] えび及びかに検知 PCR 法のバリデーション

19 年度までの厚生労働科学研究において開発したえび・かに検知 PCR 法の分析性能を 10 機関による試験室間バリデーションにより評価した。6 種類のモデル加工食品について、ハウス食品(株)と国立衛研との 2 機関プレバリデーションを行った結果、抽出 DNA 濃度の低いもの、OD260/230 値が 2.0 を下回るものも見られたが、PCR は全て問題なく進行することが確認された。バリデーション参加 10 機関には抽出

DNA溶液を送付した。各機関ではこれを鋳型としてPCRを行い、各サンプルについて陽性/陰性の判定を行った。

特定原材料等の定性検査法については、通知検査法において、「特定原材料タンパク質を含む試料についての陽性率は90%以上、ブランク試料における陰性率は90%以上」という基準が示されている。今回のバリデーションでは、6種類のモデル加工食品について、えび検知PCRの場合は陽性・陰性判定率ともに94-100%、かに検知PCRの場合は陽性・陰性判定率ともに100%であり、上記の基準を満たす結果が得られた。従って、これらのえび・かに検知PCR法は、えび・かきの定性検査法として実用可能であることが確認された。

現在これらのえび・かに検知PCR法は、えび・かきの確認検査法として通知検査法(最終改正平成21年1月22日食安発第0122001号)に記載されている。

[2] キウイフルーツ検知ELISA法の開発

平成17-19年度の厚生労働科学研究において選択されたMABの組み合わせでは、アクチニジンを多く含むキウイフルーツ及び近縁種を検出することが可能であり、またキウイフルーツを含む市販製品からもキウイフルーツタンパク質を検出することが可能であった。しかし、アクチニジンは、パパインスーパーファミリーとして分類され²⁾、しょうがプロテアーゼ(GP-II)と60%程度、また牛カテプシンSとは46%程度の相同性が認められることから、キウイフルーツ以外の食品に対する偽陽性は十分に検証していく必要が考えられたため、本研究においては、その点について検討した。その結果、しょうがに対する偽陽性反応は認められなかったものの、牛乳、牛肉、豚肉などに対して強い偽陽性反応が認められた。これらはFcフラグメントを除去したF(ab')₂化抗体でも認められたことから、非特異的な反応ではなく、アクチニジンと共通のエピトープを認識していた可能性も考えられた。

今年度の研究において新たに選択したMABの組み合わせによるサンドイッチELISA系では、問題となっていた牛乳、牛肉などの食品との偽陽性反応は認

められず、キウイフルーツタンパク質に特異性の高い系を構築できたものと考えられた。今後、キウイフルーツの近縁種について検知できる範囲を調べることも、また、その他食品に対する偽陽性反応の確認を広範に行い、ELISA系の完成を急ぐ必要がある。

また、ELISA系では検査に係わる機器が必要であり、個人の手技による検査結果のばらつきなど食品製造現場で簡易に利用することが難しい場合も考えられるため、ELISA系の構築と並行して、ICの開発も行ってきた。今回、SDSおよび2-MEを含む抽出液により加工食品中に含まれるキウイフルーツタンパク質を検出可能なICを開発し、本ICを用いることにより、加熱後の食品でも製品換算で2 µg/gまでのキウイフルーツタンパク質を検出可能となった。

以上の結果より、製造現場では平成17-19年度の厚生労働科学研究にて開発したN-ACT検出用IC、製品検査の簡易検査あるいはスクリーニングにD-ACT検出用IC、定量検査用にサンドイッチELISAを用いることで、キウイフルーツを効果的に検出できるものと考えられた。

[3] バナナ検知ELISA法の開発

本研究では未変性キチナーゼを抗原として抗体を作製し、測定系が構築できたが、今後は変性キチナーゼも免疫し、変性抗原に対して反応性を示す抗体の作製を行う必要があると考えている。また、バナナキチナーゼは、他の果実類とのホモロジーが高いため、交差反応性についても十分な注意が必要である。今後は、構築されたELISA系を用いて、近縁種及び他の果実類との反応性を確認することが重要である。また、もう一つのターゲット分子候補であるソーマチンライクプロテインについても、引き続きELISA系の構築を進める。

[4] アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検知法の開発

食物アレルギー患者の増加に伴い、現在、特定原材料7品目(卵、乳、そば、小麦、落花生、えび、かに)の表示が制度化されており、特定原材料に準ずる