

## 【園・学校編】

### A、園・学校のどこでトラブルがありましたか？

- 1 室内      2 園庭・運動場      3 園外・校外      4 その他(      )

### B、いつトラブルがありましたか？

- 1 昼食のとき      2 おやつのとき      3 遊んでいるとき  
4 授業中  
    a、家庭科の授業      b、図画、工作のとき      c、理科、生活科の授業      d、体育  
    e、その他(      )  
5 イベントのとき(お祭り、誕生会など)  
6 その他(      )

### C、トラブルが起きた時、誰がそばにいましたか？

- 1 いなかった  
2 いた → それは誰ですか？      a、学校の担任の先生      b、他のクラスの先生  
    (複数回答可)      c、養護教諭      d、保育士  
    e、生徒      f、看護師  
    g、園の職員      h、その他

### D、そばにいた人は、お子様のアレルギーについて知っていましたか？

- 1 知っていた      2 知らなかった

### E、園・学校にはどのように食物アレルギーについて伝えていますか？

- 1 医師が記入した指示書あるいは診断書を提出している  
2 日本学校保健会作成の学校生活管理指導表を利用し提出している  
3 親が記載した指示書を提出している  
4 口頭で伝えている  
5 食物アレルギーについて伝えていない  
6 その他(      )

### F、園・学校の昼食は給食ですか？お弁当ですか？また、お子様本人は、どのように食事をされていますか？

(複数選択可能)

- 1 お子様は除去をせず他の子どもと同じ給食を食べている  
2 お子様は除去給食、代替給食を食べている  
3 本人が食べれないときにお弁当を持参している  
4 給食はなく全員がお弁当  
5 その他(      )

### G、今回のトラブルのときに、誰が配膳された給食の確認をしていますか？(複数回答可)

誰が確認していますか？

- 1 保護者      2 子供本人      3 担任の先生 (保育士)  
4 栄養士      5 調理師  
6 その他(      )

### H、献立の原材料表が配られていますか

- 1 はい      2 いいえ

### I、どのように今回のトラブルが起きましたか？

- 1 給食が原因の場合  
    a 友達の給食を食べた  
    b 給食の調理中に混入した、

- c 給食で配膳を間違えた
- d その他( )

2 弁当が原因の場合

- a 友達の弁当を食べた
- b 弁当に原因食品が混入していた
- c その他

J、トラブルの原因と思われるところを複数選び、どのようにして起きたか具体的に書いてください。

- 1( ) 給食に問題があった
- 2( ) 弁当に問題があった
- 3( ) 学校スタッフの食物アレルギーに関する認識不足
- 4( ) 配膳時の問題
- 5( ) 調理時の問題
- 6( ) その他

1-6の原因について具体的に書いてください

( )

K、上記のトラブルの解決策があれば、具体的に書いてください

( )

ご協力ありがとうございました。

## 【友達の家の場合】

### A、友達の家のどこでトラブルがありましたか？

- 1 室内      2 室外      3 その他(      )  
4 わからない

### B、いつトラブルがありましたか？

- 1 食事中      2 おやつの時      3 遊んでいる時      4 わからない  
5 その他(      )

### C、今回、友達の家で出された食べ物の原材料確認は、どのように行いましたか？

- 1 原材料は明らかに大丈夫と思ったので、確認していない  
2 友達もしくは保護者に原材料を確認した  
3 その場で本人もしくは保護者が原材料を確認した  
4 その他(      )

### D、トラブルが起きた時、誰がそばにいましたか？

- 1 いなかった  
2 いた → それは誰ですか？ a、母      b、父      c、父や母の友人      d、お子様の友達  
(複数回答可)      e、兄弟姉妹      f、その他

### D、そばにいた人は、お子様のアレルギーについて知っていましたか？

- 1 知っていた      2 知らなかった

### E、トラブルの原因と思われるところを複数選び、どのようにして起きたか具体的に書いてください。

- 1(      ) 家族・友人などの食物アレルギー知識不足  
2(      ) アレルギー物質食品表示の問題  
3(      ) 調理時の問題  
4(      ) 料理の問題  
5(      ) その他  
1-5の原因についてについて具体的に書いてください

### F、上記のトラブルの解決策があれば、具体的に書いてください

ご協力ありがとうございました。

### 【外食編】

A、レストランなどの店先で料理の原材料表示はありましたか？

- 1 メニューなどに表示してあった  
2 メニューなどに表示はなかった  
3 その他( )

B、トラブルが起きた時、誰がそばにいましたか？

- 1 いなかった  
2 いた → それは誰ですか？ a、母 b、父 c、祖母 d、祖父 e、おば f、おじ  
(複数回答可) g、兄弟姉妹 h、友達 i、その他( )

C、トラブルのあったとき、一緒にいた人は、お子様の食物アレルギーのことをご存知でしたか？

- 1 知っていた                      2 知らなかった

D、トラブルの原因と思われるところを複数選び、どのようにして起きたか具体的に書いてください。

- 1( ) 店のスタッフの食物アレルギーに対する知識不足  
2( ) 店のスタッフのメニュー(商品)に関する知識不足  
3( ) メニュー(表示)に問題がある 原材料の表示に関する問題  
4( ) 調理の問題  
5( ) 同伴者の認識不足  
6( ) その他

1-6の原因について具体的に書いてください

E、上記のトラブルの解決策があれば、具体的に書いてください

ご協力ありがとうございました。



## 【キャンプ編】

### A、どのように食事をしましたか？

- 1 他の子と同じメニューで食事した
- 2 同じ食物アレルギーのある子とグループになり、食事を作り食べた
- 3 お子様ひとり、別メニューで食事をした
- 4 お弁当、レトルト食品などを持参した
- 5 その他( )

### B、近くに受診できる病院がありましたか？

- 1 あった
- 2 なかった
- 3 わからない

### C、トラブルが起きた時、誰がそばにいましたか？

- 1 いなかった
- 2 いた → それは誰ですか？ a、母    b、父    c、兄弟姉妹  
(複数回答可)    d、カウンセラー    e、その他( )

### D、そばにいた人は、お子様のアレルギーについて知っていましたか？

- 1 知っていた
- 2 知らなかった

### E、トラブルの原因と思われるところを複数選び、どのようにして起きたか具体的に書いてください。

- 1( ) 家族・友人・キャンプスタッフ などの食物アレルギー知識不足
- 2( ) アレルギー物質食品表示の問題
- 3( ) 調理時の問題
- 4( ) 食事時の問題
- 5( ) その他

1-5の原因について具体的に書いてください

### F、上記のトラブルの解決策があれば、具体的に書いてください

ご協力ありがとうございました。

**【その他 の場合】**

A、いつどこでトラブルがありましたか？

1 いつ？ ( )

2 どこで？ ( )

B、トラブルの原因と思われるところを複数選び、どのようにして起きたか具体的に書いてください。

1( ) 家族・友人・スタッフ など関係者の食物アレルギー知識不足

2( ) アレルギー物質食品表示の問題

3( ) 調理時の問題

4( ) 食事中の問題

5( ) その他

1-5の原因について具体的に書いてください

( )

C、上記のトラブルの解決策があれば、具体的に書いてください

( )

ご協力ありがとうございました

## 食物アレルギー分析の臨床診断への応用に関する研究

分担研究者 伊藤浩明（あいち小児保健医療総合センター アレルギー科）  
研究協力者 漢人直之（あいち小児保健医療総合センター アレルギー科）  
安井正宏（あいち小児保健医療総合センター アレルギー科）

### 研究要旨

食物アレルギーの診断に、アレルゲンコンポーネント特異的 IgE 抗体を測定することによる診断精度の向上を検討した。小麦アレルギーにおいては、 $\omega$ -5 グリアジン特異的 IgE 抗体を経年的に測定して、耐性獲得を予測する臨床検査の有用性を検討した。小麦アレルギーと診断した 87 例（平均年齢 3 歳）を約 3 年間フォローして、耐性獲得群 40 名では  $\omega$ -5 グリアジン特異的 IgE 抗体は有意に低下し、多くは陰性化することを見だし、予後を推定する有用な臨床検査になることを確認した。ピーナッツアレルギーでは、ピーナッツの代表的なコンポーネントである Ara h 1、Ara h 2 特異的 IgE 抗体検査が、従来の粗抗原に比べて優れた診断感度、特異性を示すことを確認した。さらに、Ara h 8(PR-10)や Ara h 9(LTP)に感作された症例では、異なる臨床像を持つことを見だし、同じ食物アレルギーの中でも病型分類が可能となることが示唆された。

### A. 研究目的

食物アレルギーの診断に、アレルゲン特異的 IgE 抗体測定が広く用いられている。現在一般臨床で用いられている IgE 抗体検査法は、食物の粗抽出液を抗原としたものが大部分である。しかしアレルゲン解析の進歩により、食物中の主要なアレルゲンタンパク（アレルゲンコンポーネント）を精製、あるいはリコンビナントで作成して特異的 IgE 抗体測定を行う事により、診断感度、特異度が向上することが見いだされている。

こうしたコンポーネント特異的 IgE 抗体測定により、一つの食物に対するアレルギーの中でも異なる病態が存在することが証明され、より精密な重症度判定や食事指導、予後の推定が可能となってきている。さらに、交差抗原性を有する多くの食品間のコンポーネントを検討する事により、食物アレルギー全体の病型分類も変わろうとしている。

本研究は、昨年度までの成果を発展させてふたつのテーマについて実施した。

テーマ 1：小麦アレルギー耐性獲得の指標としての  $\omega$ -5 グリアジン特異的 IgE 抗体検査の有用性

小麦グルテンに含まれる代表的なアレルゲンコンポーネントである  $\omega$ -5 グリアジンに対する特異的 IgE 抗体検査（以下、 $r\omega$ 5G-IgE）は、平成 22 年 10 月から保険収載となり、一般臨床でも

使用可能となった。本研究では、小麦アレルギーと確定診断された患児を対象として  $r\omega$ 5G-IgE を経時的に測定し、小麦の耐性獲得を予測する臨床検査としての有用性を検討した。

テーマ 2：ピーナッツアレルギーにおけるピーナッツコンポーネント特異的 IgE 抗体の検討

ピーナッツは日本でもアレルギー患者数が増加し、アナフィラキシーを誘発するリスクの高い重要なアレルゲンである。一方で、ピーナッツ粗抗原を用いた IgE 抗体検査は診断特異度が低く、多くの患者が検査結果だけに基づいて不必要なピーナッツ除去を強いられている。本研究では、ピーナッツの代表的なアレルゲンコンポーネント特異的 IgE 抗体検査により、ピーナッツアレルギーの診断精度向上及び病態の解明を行う。

### B. 研究方法

テーマ 1：2005 年 4 月から 2009 年 1 月に小麦及び  $r\omega$ 5G-IgE が測定され、その時点で小麦経口負荷試験又は明らかな誘発症状の病歴から小麦アレルギーと確定診断されている患児を対象とした。小麦及び  $r\omega$ 5G-IgE は原則として年 1 回反復して検査を行い、2010 年 6 月までの小麦アレルギーの耐性獲得状況と抗体価の推移を評価した。

小麦アレルギーの遷延又は耐性獲得は、経口負

荷試験や誤食による即時型誘発症状の病歴、あるいは自然に耐性化して症状なく日常摂取が可能という病歴に基づいて判定し、評価が得られた前後6ヶ月における検査値を採用した。検討対象は87症例で、診断及び耐性獲得確認のための小麦経口負荷試験を延べ156回実施している。

テーマ2: ピーナッツに対する即時型反応が病歴又は経口負荷試験で確認されている症例(PA群)、又はピーナッツ特異的IgE抗体陽性で負荷試験陰性又は日常的に摂取可能であることが確認されている症例(感作群)合計217例を検討対象とした。そのうち、症状の有無が確認される前後1年以内にピーナッツ及び大豆特異的IgE抗体が同時に測定された187例(PA群69例、感作群118例)について、両者の抗体価を比較した。また、PA群42例、感作群33例についてAra h 1、Ara h 2、Ara h 3(以上は貯蔵タンパク)、Ara h 8(PR-10)、Ara h 9(Lipid transfer protein)特異的IgE抗体をImmuno CAP法(ファディア社)で測定した。

### C. 研究結果

テーマ1: 診断時の平均年齢3歳、評価検査時の平均年齢5歳、最終評価年齢は6歳であり、診断時から評価時までの検査間隔は平均2年であった。小麦アレルギー持続群は47例、耐性群は40例で、両群間に診断・評価時の年齢や経過観察期間の有意差は認めなかった(表1)。

表1 対象者の評価プロフィール				
		持続群 n=47	耐性群 n=40	有意差
年齢*	初回検査時	2.96±1.95 (0.6-8.7, 2.4)	2.72±1.80 (0.6-8.1, 2.5)	nd
	評価検査時	5.29±2.33 (1.7-11.4, 4.7)	4.73±2.21 (1.9-11.4, 4.2)	nd
	最終年齢	6.00±2.55 (2.1-12.6, 5.3)	5.92±2.33 (2.7-12.3, 5.6)	nd
平均検査間隔*		2.33±1.02 (1.0-4.7, 2.4)	2.00±0.85 (1.0-4.2, 2.0)	nd
最終追跡期間*		3.03±1.13 (1.1-5.0, 2.9)	3.20±1.12 (1.1-4.9, 3.4)	nd
最終評価方法	負荷試験	25	23	nd
	病歴	22	17	

\*平均±SD (最小-最大、中央値)を示す

診断時の小麦IgEは持続群(対数平均24.6UA/ml、以下同様)に対して耐性群(14.3)は有意に低値(p<0.05)であった。また、評価時には持続群(19.2)は診断時と有意な変化を認めなかったが、耐性群(6.1)は診断時と比較して有意に低下した。しかし、両群ともに診断時・評価時に高い抗体価を示す症例が多く、抗体価で耐性獲得を予測する事は困難と思われた。

rω-5G-IgEも、診断時で持続群(2.6)と耐性群(1.28)に有意差(p<0.05)を認め、評価時には持続

群(1.43)、耐性群(0.49)と耐性群において診断時と比較して有意に低下した。さらに、耐性群において、診断時に抗体価がクラス1以上であった33例中20例(60.6%)がクラス0まで陰性化した。

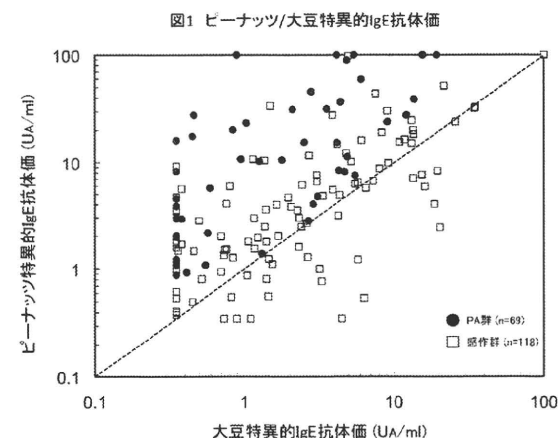
しかし、両群併せて診断時にrω-5G-IgEが陰性であった12例では、持続群5例(42%)、耐性群7例であった。また、診断時rω-5G-IgEが陽性であった75例中32例が陰性化しているものの、そのうち12例(37.5%)は持続群であった(表2)。

表2 小麦・ω-5グリアジンIgE抗体価と小麦アレルギーの経過

小麦アレルギーの経過		持続群 n=47	耐性群 n=40	有意差 p	
対数平均値 (中央値)	小麦	初回検査	24.6 (32.9)	14.3 (20.9)	0.019*
		評価検査	19.2 (17.5)	6.11 (7.37)	0.001*
	Omega-5	t-test	0.362	0.002	
		初回検査	2.60 (2.64)	1.28 (1.21)	0.021*
		評価検査	1.43 (0.85)	0.49 (0.34)	0.001*
	t-test	0.010			
陽性人数(%)	小麦	初回検査	44 (97.8)※例文誤	40 (100)	
		評価検査	46 (97.9)	38 (95.0)	
	Omega-5	陰性化率	1/46 (2.2 %)	2/40 (5.0 %)	0.133*
		初回検査	42 (89.4)	33 (82.5)	
		評価検査	30 (63.8)	13 (32.5)	
	陰性化率	12/42 (28.6 %)	20/33 (60.6 %)	0.005*	
IgE抗体低下率	小麦	中央値	-19.9	-61.5	0.002*
	Omega-5		-65.8	-100.0	0.019*

\* Mann-Whitney U test \* χ<sup>2</sup> test  
ΔIgE=(初回IgE-評価時IgE)初回IgE<100、初回IgE<0.34の症例は除外、評価時IgE<0.34のものは、0として計算した

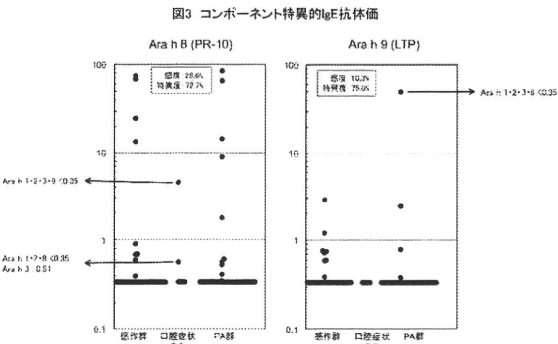
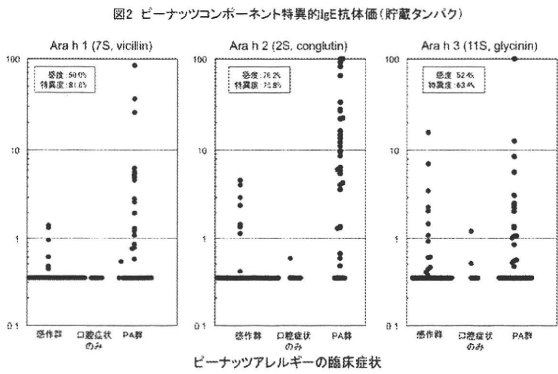
テーマ2: PA群では、全例でピーナッツIgE抗体価が大豆特異的IgE抗体価よりも高値を示した。一方、抗体価クラスの比較でピーナッツ≦大豆であれば88%の症例は感作群となった(図1)。



コンポーネント特異的IgE抗体の中では、Ara h 2が最も優れた診断精度を示し、0.35UA/ml以上で感度76.2%、特異度75.8%であった。Ara h 1は特異度81.8%であるものの感度は50.0%に留まった(図2)。

Ara h 8陽性者は2人のみであったが、いずれもAra h 1、Ara h 2が陰性で口腔症状のみを認

めた症例であった。Ara h 9 が高値を示した 1 例も Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 陰性例であったが、症状ではアナフィラキシーを認めた (図 3)。



D. 考察

テーマ 1: 小麦アレルギー診断時の IgE 抗体価や経年的な抗体価の低下は、小麦アレルギーの予後と有意な関連を認めた。さらに  $r\omega$ -5G-IgE はより明確な耐性化の指標となることが示唆された。特に耐性群において  $r\omega$ -5G-IgE 抗体価が陰性化する症例を多く認めた事は、他の食物アレルゲンには見られない際だった特徴であると思われた。こうした現象がおきる機序については今後の検討課題であるが、食物アレルギーの耐性化と IgE 抗体価の変化について、アレルゲンコンポーネント毎に検討していくことの重要性を示している。

小麦のアレルゲンコンポーネントは  $\omega$ -5 グリアジンだけでなく、水・塩溶性アレルゲンも多数存在する事から、 $r\omega$ -5G-IgE の陰性化が全ての小麦アレルギー耐性化を示すわけではない。臨床的な指標としては、その限界を承知しながら参考とする事が必要である。

テーマ 2: ピーナッツアレルギーは危険なアナフィラキシーを誘発するリスクが高いが、それだけ

に診断された患者の食事に対する恐怖感は強く、QOL が大きく損なわれる。ピーナッツ特異的 IgE 抗体陽性者の中にも誘発症状を認めない感作群が多く存在することから、抗体陽性だけの根拠で安易にピーナッツアレルギーと診断することは避ける必要がある。今回の結果からは、ピーナッツと大豆の IgE 抗体価を比較することで、真のピーナッツアレルギーと感作例を鑑別する参考になることが示唆された。両者が同等の抗体価を示す症例では、IgE 抗体が両者に共通のアレルゲンやエпитープを認識している可能性があり、現在 IgE 抑制試験で検討を進めている。

さらに、ピーナッツに特異性の高いリコンビナントのピーナッツコンポーネントを用いた IgE 抗体検査は、高い診断感度と特異性を示した。特に Ara h 2 と Ara h 1 は欧米からの報告と同様に高い診断精度を示しており、臨床検査として早期に導入されることを期待したい。

Ara h 8 は、シラカンバ花粉の Bet v 1 を代表とする PR-10 タンパクであり、多くは花粉症に関連する口腔アレルギー症候群に関与すると考えられている。今回陽性を示した 2 例も、誘発症状は口腔症状のみであり、花粉感作に関連するピーナッツアレルギーであることが示唆される。

Ara h 9 は LTP であり、モモの Pru p 3 を代表として野菜・果物の摂取によって直接感作されたアレルギーで時にアナフィラキシーを呈することが知られている。今回の 1 例も他の貯蔵タンパクには感作されていないことから、LTP をアレルゲンとするピーナッツアレルギーと考えられた。

このように、コンポーネント特異的 IgE 抗体を検査することにより、診断精度の向上のみならず、同じ食物アレルギーの中にも感作されたコンポーネントによって臨床像が異なる病型分類を行うことが可能となる。それは、他の交差抗原性を有する食物の摂取可否やアナフィラキシーへの備え、予後の推定など患者指導に有効な情報をもたらす。こうした検査が臨床に導入されることによって、食物アレルギーの診療レベルの向上が期待される。

E. 結論

小麦における  $\omega$ -5 グリアジンや、ピーナッツの各種コンポーネント特異的 IgE 抗体検査は、食物アレルギーの診断精度向上のみならず、食物ア

レルギーの新たな病型分類や予後の推定、食事指導に有用な情報をもたらすものと考えられた。

## F.健康危険情報

特になし。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 伊藤浩明 食物アレルギー経口負荷試験ガイドライン 2009 解説 資料 1-7. 日本小児アレルギー学会誌 24(3), 365-368, 2010.
- 2) Torii S, Torii A, Itoh K, Urisu A, Terada A, Fujisawa T, Yamada K, Suzuki H, Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Nonaka A, Hatanaka M, Fujiwara S. Effects of Oral Administration of Lactobacillus acidophilus L-92 on the Symptoms and Serum Markers of Atopic Dermatitis in Children. Int Arch Allergy Immunol. 154(3), 236-245, 2010.
- 3) 高岡有理、二村昌樹、坂本龍雄、伊藤浩明 遷延する牛乳アレルギーの予後に関連する因子の検討. アレルギー 59(11), 1562-1571, 2010.

### 2. 学会発表

- 1) 伊藤浩明. 年代別の食物アレルギーとアトピー性皮膚炎の考え方. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会ミニシンポジウム. 京都, 2010, 5 月.
- 2) S Sjolander, F Bernhardsson, K Ito, M Ebisawa, M Poorafshar, P Brostedt. Diagnostic value of measuring IgE to soybean 2S albumin in clinical assessment of soybean allergic Japanese children. EAACI 2010, London, 2010, 6 月.
- 3) 伊藤浩明. 食物アレルギー. 第 34 回日本小児皮膚科学会シンポジウム. 松山, 2010, 7 月.
- 4) 伊藤浩明、漢人直之、安井正宏、小林貴江、田中昭. 小麦アレルギーの耐性化予測因子としての  $\omega$ -5 グリアジン IgE 抗体検査. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010, 11 月.
- 5) 漢人直之、尾辻健太、武田将典、伊藤浩明. 当科における食物アレルギーに対する急速経口免疫療法の実験. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 2010, 11 月.
- 6) 安井正宏、小林貴江、漢人直之、伊藤浩明. ピーナッツアレルギーの診断におけるピーナッツ/

大豆特異的 IgE 抗体の検討. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 2010, 11 月.

7) 伊藤浩明. 食物アレルギーの知識と食物アレルギーの診断. 第 47 回日本小児アレルギー学会. 横浜, 2010, 12 月.

8) 安井正宏、小林貴江、漢人直之、伊藤浩明. ピーナッツアレルギーにおけるアレルギー component の検討. 第 47 回日本小児アレルギー学会. 横浜, 2010, 12 月.

9) K Ito. Soy & Milk allergen components - diagnostic tools to help identify patients at risk. Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2011. Venice, 2011, 2 月.

## H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 魚貝類アレルギー（サケ類パルブアルブミン、ブラックタイガー sarcoplasmic calcium-binding protein およびクロアワビパラミオシン）に関する生化学的研究

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	石崎松一郎	東京海洋大学食品生産科学科
	嶋倉邦嘉	東京海洋大学食品生産科学科

### 研究要旨

サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型（ヤマメ）と降海型（サクラマス）のパルブアルブミン比較：ヤマメおよびサクラマスの背側普通肉から調製した加熱抽出液を SDS-PAGE で分析したところ、パルブアルブミン含量はヤマメの方が高いことが示唆された。ELISA により、パルブアルブミン含量は 1.8-7.8 mg/g、サクラマスで 0.28-0.52 mg/g と測定された。次に、ヤマメおよびサクラマスから 3 成分のパルブアルブミンをゲルろ過、逆相 HPLC で精製した。3 成分のパルブアルブミンの逆相 HPLC における保持時間および MALDI/TOF-MS により測定した分子量は、両魚種間でお互いによく一致した。

ブラックタイガー sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) の大腸菌における発現：ブラックタイガーの新しいアレルギーとして同定した SCP を、pFN6A (HQ) Flexi vector 系を用いて HisGln (HQ) タグつきタンパク質として大腸菌で発現した。組換え SCP (rSCP) は大腸菌の抽出液（可溶部）に得られ、HisTrap Chelating HP カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができた。患者血清を用いた ELISA および阻害 ELISA の結果から、rSCP の IgE 反応性は天然 SCP と同等であると判断された。

ブラックタイガー SCP の IgE エピトープ：SCP は  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質であるが、ブラックタイガー SCP からキレート剤 (EGTA) を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  を除去すると、IgE 反応性は約半分に低下することを見いだした。また、CD スペクトルの測定により、ブラックタイガー SCP の立体構造は  $\text{Ca}^{2+}$  除去により少し変化することが判明した。次に、ブラックタイガー SCP の全長をカバーするオーバーラップペプチドの合成したが、いずれのペプチドにも IgE 結合能は認められなかった。これらの結果から、ブラックタイガー SCP の IgE エピトープは立体構造のみに依存していると考えられた。

クロアワビパラミオシンの cDNA クローニング：クロアワビの新しいアレルギーとして同定したパラミオシンについて、部分アミノ酸配列情報をもとに cDNA (3025 bp) をクローニングし、全アミノ酸配列 (860 残基) を解明した。クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンとは約 70% という高い相同性を示したが、アレルギーとして同定されているダニ類やアニサキスのパラミオシンとの相同性は約 35% であった。

### A. 研究目的

食物アレルギーによる危害防止のために、アレルギーを起こすおそれがある原材料を含む加工食品に対して表示制度が設けられている。表示することが奨励されている品目（特定原材料に準ずるもの）の一つに「さけ」がある。さけには、同一

種であっても湖沼にとどまるもの（陸封型）と海に下って再び戻ってくるもの（降海型）があり、アレルギー表示制度では降海型のみを対象とし、陸封型は除外されている。しかし、*Oncorhynchus nerka* の陸封型（ヒメマス）と降海型（ベニザケ）は同等の IgE 反応性を示し、両者間での抗原交差

性も明らかにされている (Kond et al. Allergol Int 2009;58:295-299)。一方、筆者らは、ブラックタイガーに約 20 kDa の sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) を、クロアワビに約 100 kDa のパラミオシンを新しいアレルゲンとして同定した。ブラックタイガーSCP についてはすでに cDNA クローニングにより一次構造を明らかにしているが、研究や診断にとって有用な組換え品は作製できていないし、IgE エピトープ情報も皆無である。クロアワビパラミオシンについては部分アミノ酸配列の解析にとどまっている。

以上の背景のもとに、本研究では 1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と降海型 (サクラマス) のアレルゲン性を主要アレルゲンであるパルブアルブミンに着目して評価すること、2) ブラックタイガーSCP の組換え品を大腸菌で発現して IgE 反応性を天然品と比較すること、3) ブラックタイガーSCP の IgE エピトープに関する知見を蓄積すること、4) クロアワビパラミオシンの一次構造を解析すること、を目的とした。

## B. 研究方法

### 1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と降海型 (サクラマス) のパルブアルブミン比較

加熱抽出液の調製: ヤマメおよびサクラマスの背側普通肉をそれぞれ 3 倍量の PBS (0.15 M NaCl-0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0) とホモジナイズし、ホモジネートを 80 °C の温浴中で 20 min 加熱した。冷却後、遠心分離し、得られた上清を加熱抽出液とした。

精製方法: 加熱抽出液を Sephacryl S-100 カラム (2.5 x 105 cm) に添加し、PBS で溶出した。溶出液は 10 mL ずつ分取し、280 nm の吸光度を測定するとともに、抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体との反応を ELISA で調べた。ELISA 陽性フラクションを集め、次に TSKgel ODS-120T カラム (0.46 x 25 cm) を用いた逆相 HPLC に供した。カラムは 0.1% トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルの濃度勾配により、流速 1 mL/min で溶出した。220 nm における吸光度を UV 検出器でモニターしながら、ピークに対応する溶出液を手動で分取し、抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体との反応を ELISA で調べた。

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。泳動に先立ち、試料を 5% ジチオスレイトール-2.5% SDS に溶解し、沸騰浴中で 10 min 加熱変性した。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。

ELISA: 加熱抽出液中のパルブアルブミン濃度の測定および精製過程でのパルブアルブミンの検出には可視光 ELISA を用いた。試料 50  $\mu$ L を 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、1 次抗体である抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (1:5000; Sigma) 50  $\mu$ L、2 次抗体である HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:10000; Kirkegaard & Perry Laboratories) 50  $\mu$ L と順次反応させた。次いで基質溶液 (0.1%  $\alpha$ -フェニレンジアミンおよび 0.03% 過酸化水素を含む 0.05 M リン酸-クエン酸緩衝液、pH 5.0) を用いて酵素反応を行い、490 nm の吸光度を測定した。パルブアルブミンの定量的ためには、マサバパルブアルブミン (0.03-10  $\mu$ g/mL) を用いて検量線を作成した。一方、加熱抽出液と患者血清 (パルブアルブミンを認識する 5 名の患者からのプール血清またはコラーゲンを認識する 4 名の患者からのプール血清) との反応は蛍光 ELISA で調べた。この場合、適宜希釈した加熱抽出液 50  $\mu$ L を 96 ウェル平底プレート (ELISA 用プレート H タイプ (黒); 住友ベークライト) に固相化し、1 次抗体には患者血清 (1:250) を、2 次抗体には  $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (0.25  $\mu$ g/mL; American Qualex) を用いた。酵素反応には 0.01% 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside-1 mM MgCl<sub>2</sub>-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、励起波長 367 nm、蛍光波長 453 nm で蛍光強度を測定した。

分子量の測定: 精製パルブアルブミンの分子量は 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) を用いて分析した。試料溶液 1  $\mu$ L (数 10 pmol の試料を含む) とマトリックス溶液 (10 mg/mL の  $\alpha$ -CHCA 溶液) 4  $\mu$ L をサンプルチューブの中で混ぜ、1  $\mu$ L をサンプルプレート (Opti-TOF 96 Well Insert, 123x81 mm; Applied Biosystems) の上にアプライして乾燥後、測定に



供した。

## 2) ブラックタイガーSCPの大腸菌における発現

大腸菌における発現および精製:ブラックタイガーSCPを、pFN6A (HQ) Flexi vector (Promega)を用いて HisGln (HQ) タグつきタンパク質として大腸菌で発現した。まず、ブラックタイガーSCPをコードするcDNAを、Sgf I 認識部位をもつフォワードプライマーおよび Pme I 認識部位をもつリバースプライマーを用いて増幅した。増幅産物および pFN6A (HQ) Flexi vector を Sgf I と Pme I で消化後、ライゲーションした。大腸菌 (Single Step (KRX) Competent Cells; Promega) をライゲーション産物で形質転換し、0.01% X-gal、0.5 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) および 0.01% ampicillin を含む LB agar plate で、37 °C、一晚培養した。形成された形質転換体の中からシングルコロニーを採取し、0.01% ampicillin を含む 5 mL の LB 培地で 7 °C、一晚培養した。得られた培養液の全量を、0.01% ampicillin を含む LB 培地 500 mL に植菌し、37 °C で OD600 nm が 0.6 に達するまで振とう培養した。その後、ラムノースおよび IPTG をそれぞれ終濃度が 0.1% および 1 mM となるよう添加し、さらに 37 °C、3 h 振とう培養を行って HQ タグつきタンパク質の発現誘導を行った。遠心分離により集めた菌体に 1 mM PMSF-0.5 M NaCl-20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 25 mL を加えて懸濁し、250  $\mu$ L の 10 mg/mL lysozyme-Dulbecco's PBS を加え、4 °C で 1 h 穏やかに振とうして大腸菌を溶菌させた。さらに、超音波破砕機 (UP2005 型、Dr. Hielsher) を用いて破碎した後、遠心分離した。得られた上清を HisTrap Chelating HP カラム (GE-Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供した。カラムに吸着した HQ タグつき SCP は 500 mM イミダゾールで溶出した。

天然 SCP (nSCP) の精製: nSCP は、既報 (Shiomi et al. Int Arch Allergy Immunol 2008;146:91-98) に従って硫酸塩析 (70-90%飽和) およびヒドロキシアパタイト HPLC により精製した。

ELISA および阻害 ELISA: HQ タグつきの組換え SCP (rSCP) の IgE 反応性は、nSCP と比較しながら上述した蛍光 ELISA で調べた。rSCP および nSCP は種々の濃度でマイクロプレートに固相化し、患者血清 (SCP を認識することが判明している 5 人の患者からのプール血清) との反応を調べた。また、阻害 ELISA では、患者血清を種々

の濃度の rSCP または nSCP とインキュベート後、固相化している rSCP または nSCP (固相化濃度は 1  $\mu$ g/mL) と反応させた。

## 3) ブラックタイガーSCPのIgEエпитープ

ブラックタイガーSCPのIgE反応性に及ぼすCa<sup>2+</sup>の影響:ブラックタイガーSCPのIgE反応性を、キレート剤 (EGTA) の非存在下 (Ca<sup>2+</sup>保持) および存在下 (Ca<sup>2+</sup>除去) での蛍光 ELISA により調べた。プレートには SCP (1  $\mu$ g/mL) を固相化し、5 mM EGTA を含まないまたは含む患者血清と反応させた。

円偏光二色性 (CD) スペクトル: CD スペクトルの測定には JASCO J-720 spectropolarimeter を用いた。ブラックタイガーSCPを、0.15 M NaCl-0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) または 5 mM EGTA-0.15 M NaCl-0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に 50  $\mu$ g/mL の濃度で溶解し、190-250 nm の範囲で CD スペクトルを測定した。測定は 7 回繰り返し、データは平均値で示した。

ペプチドの合成:ブラックタイガーSCPの全長をカバーするように、10 残基ずつずらした 20 残基 (C 末端ペプチドのみ 23 残基) のペプチド 18 種類を PMMS-8 peptide synthesizer (島津製作所) を用いて合成した。合成後、逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) で精製し、正しく合成されたかどうかは 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer を用いた分子量測定により確認した。

ペプチドのIgE反応性:ペプチドのIgE反応性は、プレートに Nunc Immobilizer Amino plate for peptide (Nagel Nunc International) を用いた蛍光 ELISA により調べた。ペプチドは 10  $\mu$ g/mL の濃度で固相化し、上述の蛍光 ELISA 法に準じて行った。

## 4) クロアワビパラミオシンのcDNAクローニング

部分アミノ酸配列データをもとに degenerate フォワードプライマー (DegeF1) を設計し、AUAP (abridged universal anchor primer) と組み合わせ 3'RACE を行った。PCR 増幅産物の塩基配列を直接解析し、得られた配列をもとに設計した遺伝子特異的リバースプライマーと部分アミノ酸配列データをもとに設計した degenerate フォワードプライマー (DegeF2) との組み合わせにより RT-PCR を行った。PCR 増幅産物は pT7Blue-2 T-Vector (Novagen) にサブクローニング後、塩基配列を解析した。次いで、RT-PCR により明らか

になった塩基配列をもとに 5'RACE を行い、増幅産物の塩基配列を解析した。

### C. 研究結果

#### 1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)のバルブアルブミン比較

ヤマメ 3 個体、サクラマス 3 個体から調製した加熱抽出液を SDS-PAGE で分析したところ、10 kDa 付近のバルブアルブミンは明らかにヤマメの方が多くことが判明した(図 1)。37 kDa、120 kDa および 240 kDa 付近に認められるバンドは、それぞれトロポミオシン、コラーゲン $\alpha$ 鎖、コラーゲン $\beta$ 鎖と推定され、両魚種での含量はほぼ同程度と判断された。なお、ヤマメにのみ顕著にみられる 20 kDa 付近のバンドはバルブアルブミンの 2 量体と推定される。

SDS-PAGE 分析の結果、バルブアルブミン含量はサクラマスよりヤマメの方が多くことがわかったので、抗カエルバルブアルブミン抗体を用いた ELISA による定量を試みた。マサババルブアルブミンで作成した検量線(図 2)をもとにヤマメおよびサクラマス普通肉中のバルブアルブミンを定量した結果を図 3 に示すが、ヤマメでは 1.8-7.8 mg/g、サクラマスでは 0.28-0.52 mg/g となり、SDS-PAGE の結果とよく対応していた。

ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液に対する患者血清の反応性は図 4 に示す。コラーゲンを認識する患者血清は、両魚種の加熱抽出液に対して同程度の反応を示したが、バルブアルブミンを認識する患者血清は明らかにヤマメ抽出液に対して強く反応した。

次に両魚種のバルブアルブミンを Sephacryl S-100HR カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよび TSKgel ODS-120T カラムを用いた逆相 HPLC により精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、ELISA 分析により両魚種ともバルブアルブミンはフラクション 38 付近に溶出された(図 5)。ELISA 陽性画分を逆相 HPLC に供すると、両魚種ともにバルブアルブミンは 3 つのピークに検出された(図 6; それぞれのピークに対応したバルブアルブミンを保持時間の順に、ヤマメ PA I、PA II、PA III、サクラマス PA I、PA II、PA III と呼ぶ)。これらバルブアルブミンの分子量を MALDI/TOF-MS で分析した結果を表 1 に示すが、ヤマメの PA I、PA II および PA III は、それぞ

れサクラマスの PA I、PA II、PA III と非常に近い値であった。

#### 2) ブラックタイガーSCPの大腸菌における発現

HQ タグつきブラックタイガーSCP を pFN6A (HQ) Flex vector 系を用いて大腸菌で発現したところ、rSCP は大腸菌の抽出液(可溶部)に得られ、HisTrap Chelating HP カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製することができた(図 7)。患者血清を用いた ELISA により、rSCP は nSCP とほぼ同等の IgE 反応性を示すと判断された(図 8A)。また、事前に患者血清を nSCP あるいは rSCP とインキュベートすると、nSCP との反応性も rSCP との反応性も同程度に阻害された(図 8B)。

#### 3) ブラックタイガーSCPのIgEエピトープ

患者血清とブラックタイガーSCP の反応性を EGTA 非存在下および存在下で ELISA により調べたところ、いずれの患者血清も EGTA 存在下で反応性が約半分に低下した(図 9)。EGTA 非存在下では、ブラックタイガーSCP は $\alpha$ ヘリックスに特徴的な 208 nm および 222 nm 付近に負の極大をもつ CD スペクトルを与えた(図 10)。一方、EGTA 存在下では $\alpha$ ヘリックス含量の減少がみられ、立体構造がやや変化していることが確認された。ブラックタイガーSCP の全長をカバーする 18 種類の合成ペプチドは、患者血清を用いた蛍光 ELISA の結果からすべて IgE 反応陰性と判断された(データ示さず)。

#### 4) クロアワビパラミオシンのcDNAクローニング

クロアワビパラミオシンをコードする完全長 cDNA (3025 bp) を、3'RACE、RT-PCR および 5'RACE によりクローニングすることができた(塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースの accession No. AB571843 に登録済み)。得られた cDNA は 2580 bp (アミノ酸 860 残基に対応)の翻訳領域を含んでいた。翻訳領域のアミノ酸配列を、ムラサキイガイ、ダニ類(ヤケヒョウヒダニ、ネッタイタマニクダニ)、アニサキスのパラミオシンのアミノ酸配列と並べて図 11 に示した。また、これらパラミオシンのアミノ酸配列相同性を表 2 にまとめた。クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンとは約 70% という高い相同性を示したが、アレルゲンとして同定されているダニ類やアニサキスのパラミオシンとの相同性は約 35% であった。

## D. 考察

### 1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)のパルブアルブミン比較

SDS-PAGE によりヤマメのパルブアルブミン含量はサクラマスよりかなり高いことが示唆され、このことは ELISA による定量(ヤマメ:1.8-7.8 mg/g、サクラマス:0.28-0.52 mg/g)で裏付けられた。マサバパルブアルブミンで作成した検量線で定量したので、正確な含量ではないかもしれないが、両魚種におけるパルブアルブミンの相対的な含量は反映していると考えられる。さらに、コラーゲンを認識する患者の血清は両魚種に対して同程度の IgE 反応性を示したが、パルブアルブミンを認識する患者の血清は明らかにヤマメの方に強く反応した。

ゲルろ過および逆相 HPLC により、両魚種から 3 成分のパルブアルブミン (PA I、PA II、PA III) が得られた。逆相 HPLC での保持時間はヤマメの PA I、PA II および PA III はそれぞれサクラマスの PA I、PA II、PA III とほぼ一致し、また MALDI/TOF-MS で分析した分子量もヤマメの PA I、PA II および PA III はそれぞれサクラマスの PA I、PA II、PA III とほぼ一致した。これらの結果から、組成比はやや異なるかもしれないが、両魚種のパルブアルブミンは同じ 3 成分のアイソフォームで構成されていると考えられる。

本研究結果から、少なくともパルブアルブミンを認識する魚類アレルギー患者にとっては、ヤマメの方がサクラマスよりアレルギー発症の可能性が高いといえる。*Oncorhynchus nerka* の陸封型(ヒメマス)と降海型(ベニザケ)は同等の IgE 反応性を示すという Kond et al. (Allergol Int 2009;58:295-299) の結果も考慮すると、サケ類の表示奨励は降海型に限っている現行のアレルギー表示制度は見直しの必要があるかもしれない。

### 2) ブラックタイガーSCPの大腸菌における発現

ブラックタイガーSCPをHQタグつきタンパク質として大腸菌で発現し、rSCPを精製することができた。患者血清を用いた ELISA 結果から、rSCPのIgE反応性はnSCPと同等であると判断された。さらに阻害 ELISA の結果も、rSCPはnSCPのIgE結合エピトープを完全に保持していることを支持した。本研究で得たrSCPはHQタグつきであるが、今後の甲殻類アレルギー研究や甲殻類アレルギーの診断において、標準アレルゲンと

して有用であると思われる。

### 3) ブラックタイガーSCPのIgEエピトープ

SCPはCa<sup>2+</sup>結合性タンパク質であるが、ブラックタイガーSCPからキレート剤(EGTA)を用いてCa<sup>2+</sup>を除去すると、IgE反応性は約半分に低下することを見いだした。SCPは無脊椎動物特有のタンパク質で、脊椎動物特有のパルブアルブミンに相当すると考えられている。パルブアルブミンはたまたま魚類の主要アレルゲンであり、SCP同様に、Ca<sup>2+</sup>除去によりIgE反応性はかなり低下することが知られている。

CDスペクトルの測定により、ブラックタイガーSCPの立体構造はCa<sup>2+</sup>除去により少し変化することが判明した。Ca<sup>2+</sup>除去によるIgE反応性の低下とあわせて、Ca<sup>2+</sup>結合によって保持されている立体構造がIgEエピトープとして重要であることを意味している。しかし、Ca<sup>2+</sup>除去によってもIgE反応性が完全に消失するわけではないので、一次構造エピトープも存在する可能性が考えられた。そこで、ブラックタイガーSCPの全長をカバーするオーバーラップペプチドを合成してIgE反応性をELISAで評価したが、IgE反応性を示すペプチドは認められなかった。これらの結果から、ブラックタイガーSCPのIgEエピトープは立体構造のみに依存していると考えられた。

### 4) クロアワビパラミオシンのcDNAクローニング

以前のイムノブロットングおよび阻害イムノブロットングの結果から、パラミオシンはクロアワビ特有のアレルゲンではなく、ムラサキイガイ、スルメイカなど各種軟体動物間で抗原交差性を示すアレルゲンであると推定される。しかし、抗原交差性を分子レベルで理解するための基礎情報であるアミノ酸配列は、ムラサキイガイで解析されているのみである。そこで本研究では、クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列をcDNAクローニングにより解析した。

クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列は、ムラサキイガイパラミオシンと約70%という高い相同性を有していた。この高い配列相同性が抗原交差性の裏付けであることは間違いない。一方、パラミオシンはダニ類(ヤケヒョウヒダニ、ネッタイタマニクダニ)やアニサキスのアレルゲンとしてすでに同定され、一次構造も明らかにされている。しかし、これらパラミオシンとクロアワビパラミオシンの配列相同性は約35%と低い

で、抗原交差性はないと予想される。

クロアワビパラミオシンは他の軟体動物のパラミオシンと交差性を示すだけでなく、クロアワビトロポミオシンとも交差性を示すという興味深い事実が明らかにされている。そこで、クロアワビパラミオシンおよびムラサキガイパラミオシンのアミノ酸配列を BLAST でクロアワビトロポミオシンの配列と比較した。その結果、クロアワビパラミオシンの 3 つの領域 (<sup>181</sup>LKLQVDDLSRQ<sup>192</sup>、<sup>315</sup>LNTRIAQLEDE<sup>325</sup>、<sup>681</sup>LFNENVRLADE<sup>691</sup>)、ムラサキガイパラミオシンの 3 つの領域 (<sup>184</sup>LKAAVDDLTRQ<sup>194</sup>、<sup>318</sup>LSIKIQELED<sup>328</sup>、<sup>684</sup>LQAEVNRLADE<sup>694</sup>) はクロアワビトロポミオシンの 249-259 の領域 (LQKEVDRLADE) に類似していることが判明した。領域 249-259 は brown shrimp トロポミオシンで報告されている IgE エピトープの一つで、この領域のアミノ酸配列は甲殻類のトロポミオシンのすべて保存されている。したがって、甲殻類と軟体動物のトロポミオシンの間での抗原交差性の少なくとも一部は、アミノ酸配列が保存されている領域 249-259 によって説明可能である。同様に、クロアワビおよびムラサキガイの上記 3 つの領域は、パラミオシンとトロポミオシンとの間の交差性の説明になるかもしれない。もしそうなら、軟体動物パラミオシンは甲殻類トロポミオシンとも交差することが考えられるので、今後の検討が望まれる。

## E. 結論

### 1) サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型(ヤマメ)と降海型(サクラマス)のパルブアルブミン比較

ヤマメおよびサクラマスは同じ 3 成分のパルブアルブミンアイソフォームを含む。パルブアルブミン含量はヤマメの方が明らかに高いので、アレルギーの点ではヤマメの方が重要である。

### 2) ブラックタイガーSCPの大腸菌における発現

ブラックタイガーSCPの組換え品は天然品と同等のIgE反応性を示すので、標準アレルゲンとして有用である。

### 3) ブラックタイガーSCPのIgEエピトープ

ブラックタイガーSCPのIgEエピトープは、アミノ酸配列ではなく立体構造に依存している。Ca<sup>2+</sup>を除去すると立体構造が変化し、IgE結合能

が低下する。

### 4) クロアワビパラミオシンの cDNA クローニング

クロアワビパラミオシンのアミノ酸配列はムラサキガイパラミオシンと高い相同性を示し、抗原交差性を裏付けている。しかし、ダニ類やアニサキスのパラミオシンとの配列相同性は低く、交差性はないと思われる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 柴原裕亮, 上坂良彦, 阿部晃久, 山田彰一, 潮秀樹, 塩見一雄: ELISA 法による食品中の頭足類アレルゲンの検出. 日本食品科学工学会誌, 57, 198-204 (2010)
- 2) 清木興介, 織田浩司, 柴原裕亮, 蒲生玲子, 有馬優美, 酒井信夫, 中村 厚, 安達玲子, 塩見一雄, 穂山 浩, 手島玲子: 加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討. 食品衛生学雑誌, 51, 133-138 (2010)
- 3) K. Shiomi, S. Yoshida, T. Sawaguchi and S. Ishizaki: A major IgE epitope of rainbow trout collagen  $\alpha$  2 chain. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 51, 153-159 (2010)
- 4) 塩見一雄: 魚介類アレルゲンに関する最新の分子生物学的知見. 食品衛生学雑誌, 51, 139-152 (2010)
- 5) Y. Kobayashi, K. Ikeda and K. Shiomi: Elucidation of IgE-binding epitopes of Anisakis simplex 1, the major Anisakis simplex allergen. Mol. Biochem. Parasitol., 174, 128-131 (2010)
- 6) 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、イカによる食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの一例. アレルギー, 59, 1634-1641 (2010)
- 7) M. Suzuki, Y. Kobayashi, Y. Hiraki, H. Nakata and K. Shiomi: Paramyosin of the disk abalone *Haliotis discus discus*: identification as a new allergen and cross-reactivity with tropomyosin. Food Chem., 124, 921-926 (2011)

## 2. 学会発表

- 1) 福本 瞳, 小坂祥子, 中田朋子, 高田香織, 二神綾子, 塩見一雄, 川名誠司: 魚の成分であるパルブアルブミンによる接触蕁麻疹と口腔アレルギー症候群の 1 例. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010 年 5 月, 京都)
- 2) 柴原裕亮, 上坂良彦, 阿部晃久, 山田彰一, 潮 秀樹, 塩見一雄: ELISA 法を用いた頭足類検出試薬の開発. 第 99 回日本食品衛生学会学術講演会 (2010 年 5 月, 東京)
- 3) K. Yasuda, K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio, K. Shiomi: Unique peptide sequence inducing inflammatory response of macrophage. 35th FEBS Congress 2010 (2010 年 6-7 月, Göteborg, Sweden)
- 4) 張 虹, 潮 秀樹, 塩見一雄: 無脊椎動物主要アレルゲントロポミオシンに対するモノクローナル抗体作製とその性状解析. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (2010 年 9 月, 京都)
- 5) 郭 芳菲, 久保田紘章, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: チダイに検出された 13 kDa アレルゲンの精製および同定. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (2010 年 9 月, 京都)
- 6) 額瀨愛子, 三田 大, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: ブラックタイガーの新規アレルゲンとして同定された sarcoplasmic calcium-binding protein の一次構造解析および大腸菌における発現. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (2010 年 9 月, 京都)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

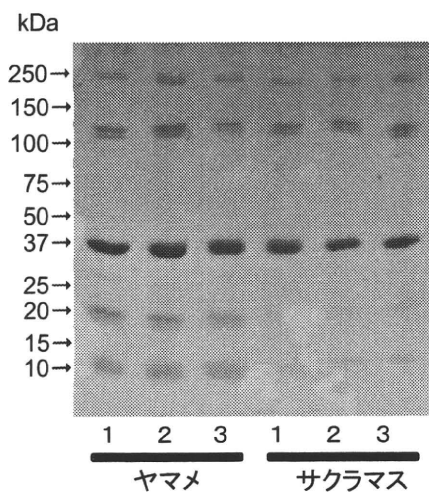


図 1. ヤマメおよびサクラマスの普通肉から調製した加熱抽出液の SDS-PAGE

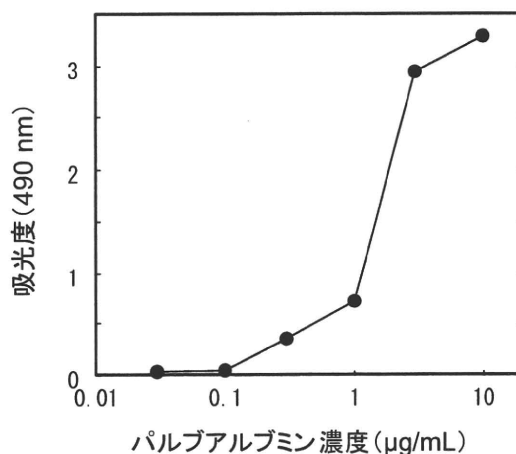


図 2. パルブアルブミン定量のために精製マサバパルブアルブミンを用いて作成した検量線

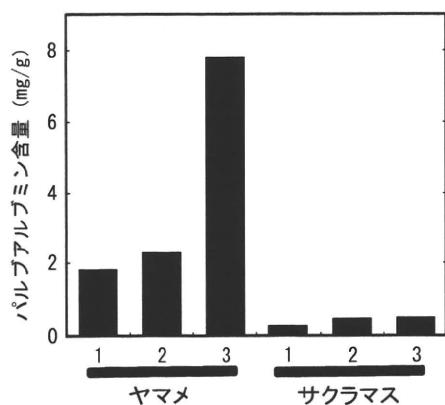


図 3. ヤマメおよびサクラマスのパルブアルブミン含量

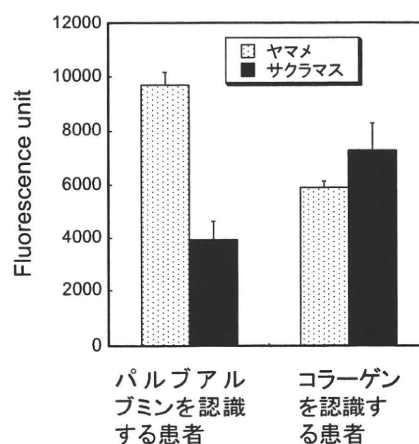


図 4. ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液と患者血清との反応

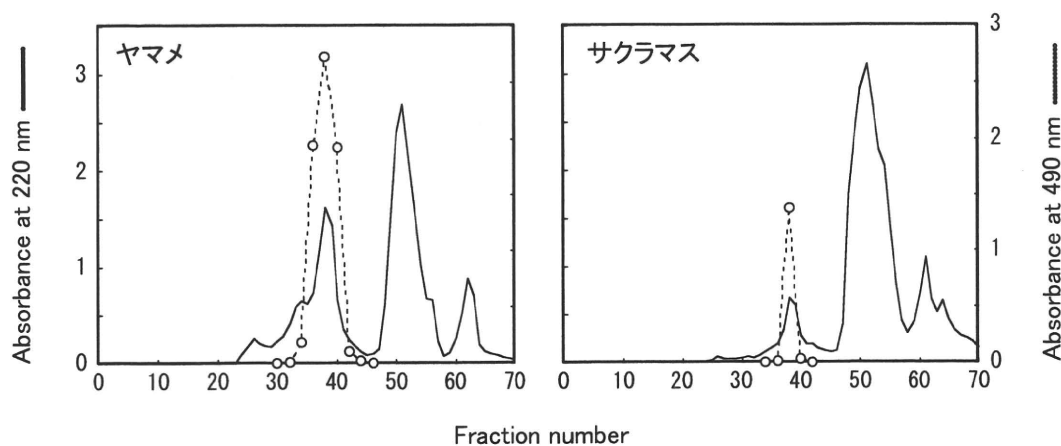


図 5. ヤマメおよびサクラマスの加熱抽出液のゲルろ過

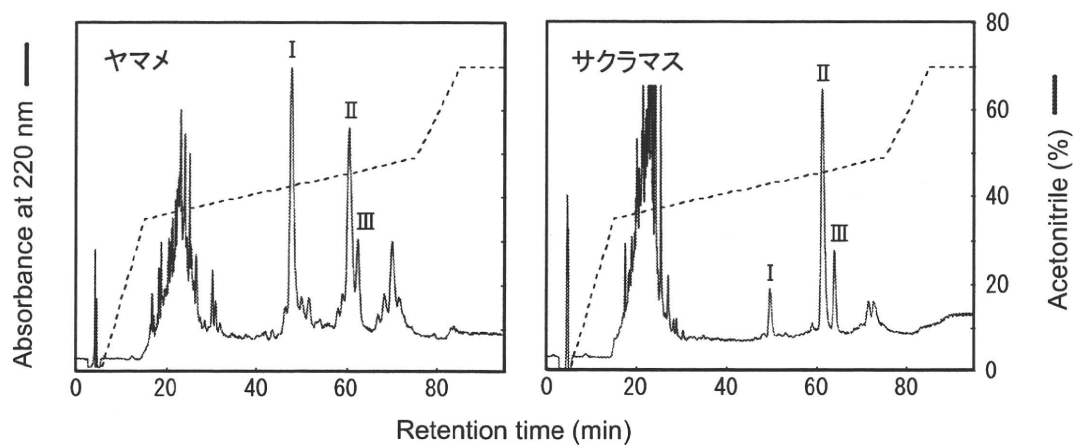
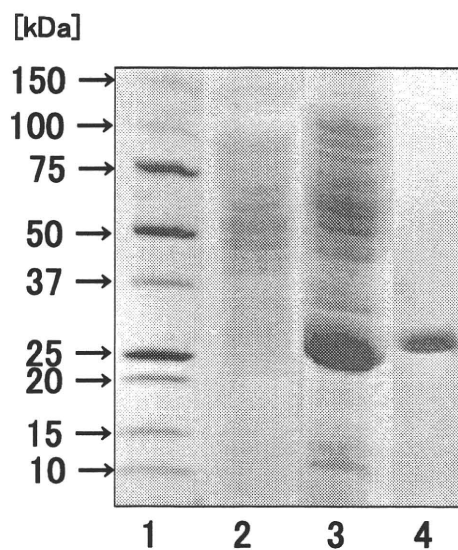


図 6. ヤマメおよびサクラマスに含まれるパルブアルブミンの逆相 HPLC による精製

表 1. ヤマメおよびサクラマスから精製した 3 成分のパルブアルブミンの分子量

魚種	分子量		
	PA I	PA I	PA I
ヤマメ	11615.6	11145.9	11144.9
サクラマス	11615.4	11143.0	11143.4



1: 標準タンパク質    2: 大腸菌抽出液 (発現非誘導)    3: 大腸菌抽出液 (発現誘導)  
4: アフィニティークロマトグラフィーで精製した組換え SCP

図 7. 大腸菌で発現したブラックタイガーSCP の SDS-PAGE

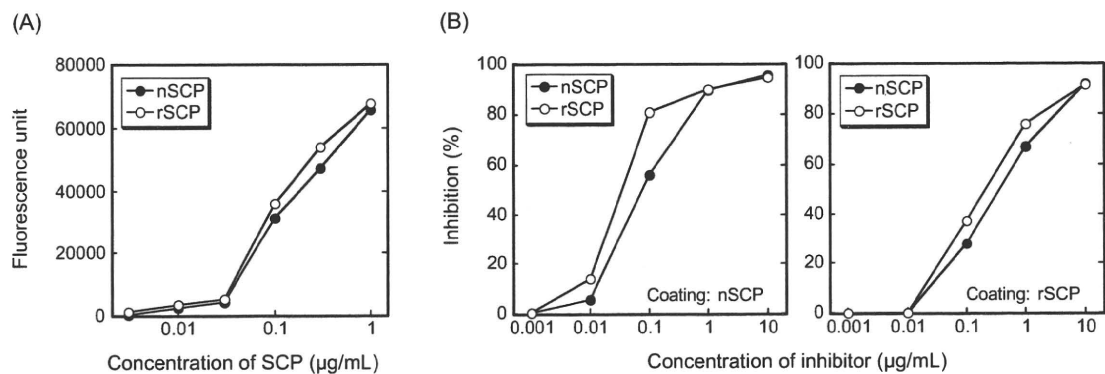


図 8. ELISA (A) および阻害 ELISA (B) によるブラックタイガーSCP の天然品 (nSCP) と組換え品 (rSCP) の IgE 反応性比較

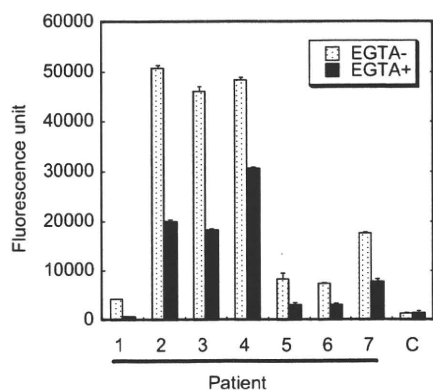


図 9. ブラックタイガーSCP の IgE 反応性に及ぼす EGTA の効果

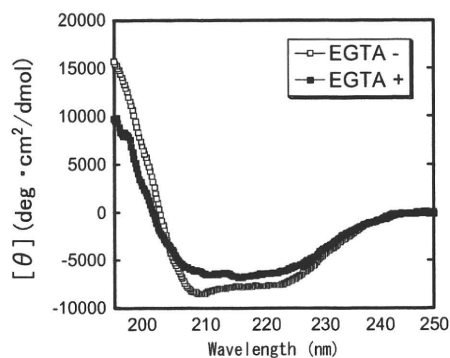


図 10. ブラックタイガーSCP の CD スペクトル