

C. 研究結果

1) ゴマ経口負荷試験の結果と特異的 IgE 抗体価の分布を図 1 に示す。負荷陽性者の抗体価中央値は陰性者より高値を示すが、両者にはオーバーラップが多く、抗体価のみでゴマアレルギーの診断ができるカットオフ値は求められなかった。

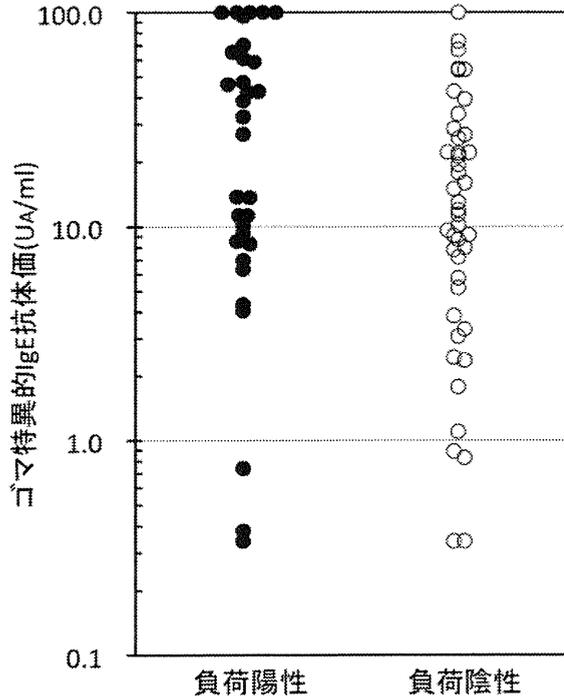


図 1 ゴマ負荷試験結果と特異的 IgE 抗体価

また、負荷陽性者における症状誘発閾値量は、特異的 IgE 抗体価と相関を認めず、抗体価の高さから誘発閾値や症状の重症度を推測することは不可能であった。

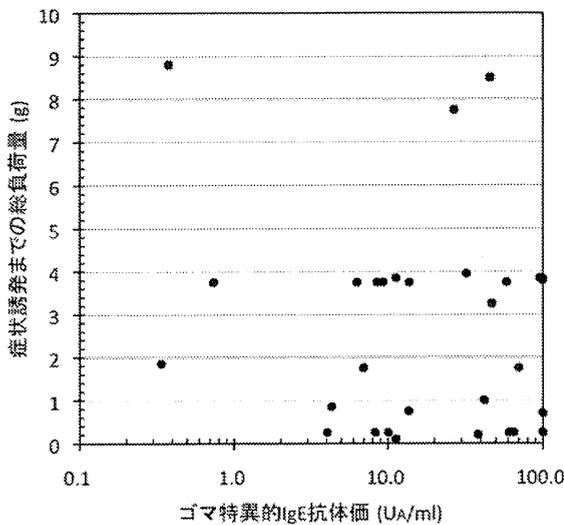


図 2 負荷陽性者における誘発閾値量と特異的 IgE 抗体価

2) 精製したゴマコンポーネント特異的 IgE 抗体価とゴマアレルギーの関連を示す。ゴマの貯蔵タンパクとして含有量の多い 7S ビシリン、11S グロブリンは、ゴマ(f10)と強い相関を示し、ゴマアレルギー患者における陽性率は高いもののゴマアレルギーのない群との鑑別には適さなかった (図 3)。

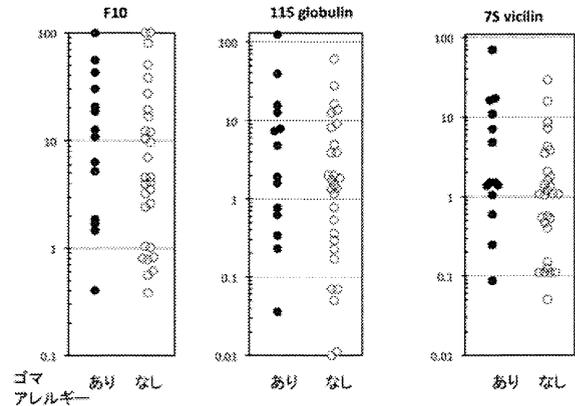


図 3 ゴマ貯蔵タンパク特異的 IgE 抗体価

一方、2S アルブミン、Hsp70、LTP 特異的 IgE 抗体価も、ゴマアレルギー患者ではほぼ 100%の陽性率を示すと同時に、症状陰性者と比較して高い抗体価を示す傾向が認められた。従って、こうした含有量の少ないタンパクが症状の誘発に関与している可能性が示唆された (図 4)。

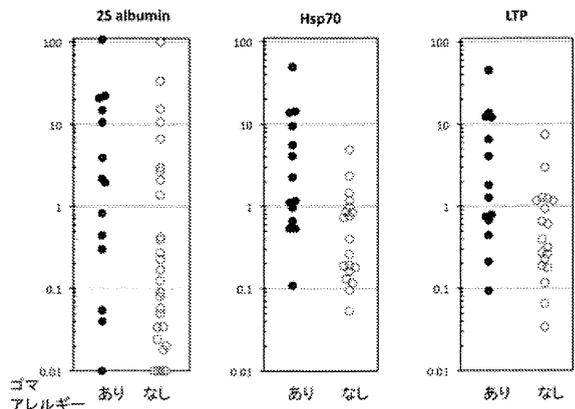


図 4 その他のゴマアレルギーコンポーネント

D. 考察

ゴマアレルギーの診断に有用な臨床検査は現時点で確立しておらず、経口負荷試験による直接的な誘発症状の証明に頼らざるを得ないのが現状である。コンポーネントを用いた新たな検査法としては、やや含有量の少ない貯蔵タンパクであ

る 2S アルブミンなどが有力な候補として挙げられ、今後さらに検討を重ねる必要がある。

2S アルブミンは、すでに Ses i 1、Ses i 2 としてアレルゲン命名されているが、ゴマアレルギーの診断における特異度として評価された研究は今回が初めてといえる。

2S アルブミンは、ピーナッツで最も診断的有用性の高い Ara h 2 や、我々の他の研究において大豆アレルギーの診断でも有用性が示唆された Gly m 2S albumin に相当するアレルゲンコンポーネントである。今後、こうしたコンポーネントのリコンビナントタンパクを用いた抗体測定系を検討し、感度・特異度に優れた臨床検査の開発に資すると同時に、こうした豆類・種子類のアレルゲンの本質に迫っていきたい。

E. 結論

ゴマアレルギーの診断に有用なアレルゲンコンポーネントの候補として、2S アルブミン、Hsp70、LTP などが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito K, Sjölander S, Sato S, Movérare R, Tanaka A, Söderström L, Borres M, Poorafshar M, Ebisawa M. IgE to Gly m 5 and Gly m 6 is associated with severe allergic reactions to soybean in Japanese children. *J Allergy Clin Immunol.* 128(3), 673-5, 2011.

2) 尾辻健太、二村昌樹、漢人直之、林啓一、伊藤浩明. ω-5 グリアジン特異的 IgE 抗体検査の臨床的有用性について. *アレルギー* 60(8), 971-982, 2011.

3) 木許泉、武藤太一郎、武田将典、伊藤浩明、坂本龍雄. テタニーで発症したビタミン D とカルシウム欠乏による栄養障害性くる病の 1 例. *日本小児科学会雑誌* 115(10), 1550-1553, 2011.

4) Ebisawa M, Shibata R, Sato S, Borres MP, Ito K. Clinical Utility of IgE Antibodies to ω-5 Gliadin in the Diagnosis of Wheat Allergy: A

Pediatric Multicenter Challenge Study. *Int Arch Allergy Immunol* 158, 71-76, 2012.

5) Ito K, Futamura M, Moverare R, et al. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clinical and Molecular Allergy* 10, 1, 2012.

2. 学会発表

1) Komei Ito. Soy & Milk allergen components: diagnostic tools to help identify patients at risk. *Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2011, Venice, 2011.2.18*

2) 榎村春江、伊藤浩明. 食物経口負荷試験の結果に基づいた摂取指導方法の開発. 第 11 回食物アレルギー研究会, 東京, 2011.2.19

3) 伊藤浩明. 経口免疫療法の課題 (Con の立場から). 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011.5.14-15

4) 伊藤浩明. 小児の食物アレルギー. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011.5.14-15

5) 伊藤浩明. エピペンの使用法について. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 千葉, 2011.5.14-15

6) Ito K, Kando N, Kobayashi T, Yasui M, Tanaka A. Specific IgE to ω-5 gliadin as a predictive marker for tolerance to wheat allergy. *EAACI 2011, Istanbul, 2011.6.11-6.15*

7) Brostedt P, Sjolander S, Ericson C, Holtz A, Carlsson R, Ito K. Measurement of IgE to purified sesame seed proteins in sera from sesame allergic Japanese children. *EAACI 2011, Istanbul, 2011.6.11-6.15*

8) 安井正宏、小林貴江、漢人直之、伊藤浩明. 当科でのアドレナリン自己注射薬処方例の検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12-8.14

9) 小林貴江、前田徹、岩井明日香、羽根田泰宏、安井正宏、漢人直之、伊藤浩明. 鶏卵経口負荷試験後の食品摂取指導について. 第 47 回中部日本小児科学会, 名古屋, 2011.8.21

10) 伊藤浩明. Oral Food Challenge. 第 48 回日本小児アレルギー学会/第 16 回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会. 福岡, 2011.10.28-30

11) 小林貴江、近藤亜子、小田奈穂、榎村春江、岩井明日香、前田徹、羽根田泰宏、安井正宏、漢人直之、伊藤浩明. 食物経口負荷試験後のアレルギー食品摂取指導について. 第 48 回日本小児アレルギー学会, 福岡, 2011.10.28-30

12) 伊藤浩明. アレルゲンコンポーネントの免疫応答. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011.11.10-12

13) 日野明日香、前田徹、羽根田泰宏、小林貴江、安井正宏、漢人直之、伊藤浩明. 食物経口負荷試験における新たなスコアリングシートの提案と検討. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011.11.10-12

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状および 魚類 ELISA 検知法の開発に関する研究

研究分担者	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
	上坂良彦	日水製薬株式会社研究開発部
	柴原裕亮	日水製薬株式会社製品開発部
	山田彰一	日本水産株式会社食品分析センター
	汪 俊	日本水産株式会社食品分析センター

研究要旨

チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状：タイ類には 12 kDa のパルブアルブミン (PA II) の他に 14 kDa のアレルゲン (PA I) が存在することが示唆されていた。チダイから PA I および PA II をゲルろ過および逆相 HPLC により精製し、リシルエンドペプチダーゼ分解ペプチドのアミノ酸配列を分析したところ、両成分はパルブアルブミンのアイソフォームであることが判明した。PA I の IgG (パルブアルブミンに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体) との反応性および魚類アレルギー患者の血清 IgE との反応性は、PA II を含む他の魚類パルブアルブミンと比較するとかなり弱かった。PA I および PA II のアミノ酸配列を cDNA クローニング法により解析したところ、他の魚類パルブアルブミンと比べると PA I はいくつかの位置で特有のアミノ酸残基を持ち、IgG 反応性および IgE 反応性の弱さとの関連が示唆された。 魚類 ELISA 検知法の開発：マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を作製し、魚類を検知するサンドイッチ ELISA 系を構築した。本サンドイッチ ELISA は、マサバパルブアルブミンとの反応性を 100%とした場合、各種魚類パルブアルブミンと 22.6-99.0% の反応性を示し、さらに 22 魚種からの抽出液のすべてと反応した。検出限界は 0.23 μg (魚類タンパク質) /g (食品)、定量限界は 0.70 $\mu\text{g/g}$ で、あった。5 種類のモデル加工食品を用いた試験室間バリデーションに供したところ、添加した魚類タンパク質の回収率は 69.4-84.8%、併行精度は 1.2-3.3%、室間精度は 3.1-10.5% と良好であった。また、各種市販加工食品を分析した場合、偽陰性あるいは偽陽性はほとんど認められなかった。

A. 研究目的

魚類のアレルゲンとしては主要アレルゲンであるパルブアルブミンの他、コラーゲンなども同定されている。さらに、これまでのイムノブロッティング実験などにおいて、未知アレルゲンの存在も示唆されている。われわれも、魚類抽出液を用いてイムノブロッティングを行っている過程で、マダイの抽出液には 12 kDa のパルブアルブミンの他に、一部患者の血清 IgE と反応するがパ

ルブアルブミンモノクローナル抗体とは反応しない 14 kDa のアレルゲンを見いだした (Kobayashi et al. Allergy 2006; 61: 357-363)。その後、マダイと近縁のチダイにも、同様に 12 kDa のパルブアルブミンの他に 14 kDa のアレルゲンが検出された。そこで本研究では、魚類アレルギー、とくにタイ類アレルギーの診断・治療に資することを目的に、チダイに含まれる 14kDa アレルゲンを同定し、その IgE 反応性および一次構造

を明らかにすることを試みた。一方、魚類は重要なアレルギー原因食品で、わが国をはじめとした多くの国でアレルギー表示対象となっているが、その検知法は開発されていない。そこで、本研究では、加工食品に含まれる魚類を定量的に検知するサンドイッチ ELISA 法の開発もあわせて行った。

B. 研究方法

1) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

加熱抽出液の調製：チダイの背側普通肉を 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 Sephadex G-75 カラム (2.5 x 100 cm) に添加し、PBS で溶出した。溶出液は 10 mL ずつ分取し、各フラクションについて 280 nm の吸光度を測定するとともに、SDS-PAGE に供した。PA I および PA II を含む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た。対照として用いたマアジおよびマサバのパルブアルブミンも、同様にゲルろ過と逆相 HPLC の組み合わせで精製した。なお、マアジおよびマサバの場合、パルブアルブミンは 1 成分でアイソフォームはほとんどみられない。

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。分子量マーカータには Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

リシルエンドペプチダーゼ分解：精製アレルギー (50 µg) を 1 mL の 2 M 尿素-1 mM EDTA-0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、1 µg のリシルエンドペプチダーゼを添加して 37 °C で 24 h 消化した。酵素消化物を TSKgel ODS-120T カラ

ム (0.46 x 25 cm) を用いた逆相 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 min) により流速 1 mL/min で溶出した。溶出液の 220 nm における吸光度を 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。

アミノ酸配列分析：アミノ酸配列は 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) を用いて分析した。試料溶液 1 µL (数 10 pmol の試料を含む) とマトリックス溶液 (10 mg/mL の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸溶液) 4 µL をサンプルチューブの中で混ぜ、1 µL をサンプルプレート (Opti-TOF™ 96 Well Insert, 123 x 81 mm ; Applied Biosystems) の上にアプライして乾燥させた後、MSMS 1kv Positive 測定メソッドで分析した。

ELISA：ウサギ抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体およびマウス抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) とパルブアルブミンとの反応性は可視光 ELISA で調べた。試料 50 µL を 96 ウェル平底プレート (住友ベークライト) に固相化後、1 次抗体であるウサギ抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体 (1:5000) またはマウス抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体 (1:5000) 50 µL、2 次抗体である HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:10000, American Qualex ; 1 次抗体にポリクローナル抗体を用いた場合) または HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:10000, Kirkegaard & Perry Laboratories ; 1 次抗体にモノクローナル抗体を用いた場合) 50 µL と順次反応させた。次いで基質溶液 (0.1% o-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。一方、パルブアルブミンと患者血清との反応性は蛍光 ELISA で調べた。この場合、適宜希釈した試料溶液 50 µL 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 β -ガラクトシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (0.25 µg/mL; American Qualex) を用いた。酵素反応には 0.01% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside-1 mM MgCl₂-0.15 M NaCl-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。

cDNA クローニング: 生きているチダイから背側普通肉を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies) 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 Marathon cDNA ライブラリーを作製した。Marathon cDNA ライブラリーは 3'RACE および 5'RACE のテンプレートとして用いた。まず、既報の魚類パルブアルブミンのアミノ配列から保存性が高い領域に着目して設計したフォワードプライマー (PA-F、5'-TTGAGGAGGAGGAGCTGAAGCT-3') と AP1 アダプタープライマーの組み合わせで 3'RACE を、リバープライマー (PA-R、5'-AGCTTCAGCTCCTCCTCAA-3') と AP1 プライマーとの組み合わせで 5'RACE 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、PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を解析した。データ解析には解析ソフト SeqEd Version 1.0.3 (Perkin Elmer) を用いた。次いで、得られた部分塩基配列をもとに、PA I の場合は遺伝子特異的フォワードプライマー (PA I-F、5'-CCTTTCAAAGGACTGCAGGAT-3') と AP1 プライマーを用いた 3'RACE に、PA II の場合は遺伝子特異的フォワードプライマー (PA II-R、5'-TGCCTTAACAAGGCGAGCAA-3') と AP1 プライマーを用いた 5'RACE に供した。増幅産物はサブクローニング後、塩基配列を解析した。

2) 魚類 ELISA 検知法の開発

標準溶液の調製: マアジの筋肉をホモジナイザーで均一化し、凍結乾燥を行った。乾燥終了後、再びホモジナイザーで均一化して得た粉末を魚標準品とした。魚標準品のタンパク質量を 2-D Quant kit (GE Healthcare) で定量したところ、470 mg/g であった。標準品を適宜希釈し、検量線作成のための標準溶液 (0.78-50 ng/mL) を調製した。

試料溶液の調製: 試料 (市販の食品原料・加工食品およびモデル加工食品) 1 g をホモジナイザーで均一化後、特定原材料抽出用試薬 (森永生科学研究所) を用いて調製した抽出液 19 mL と混合して一晩振とう抽出を行った。次いで 3,000 x g で 20 分間遠心分離して上清を回収し、試料抽出液を得た。試料抽出液を検体希釈液で 20 倍に希釈して試料溶液とした。

サンドイッチ ELISA による測定: 組換えマサ

バパルブアルブミンをウサギに免疫してポリクローナル抗体を取得した。ポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートは、ポリクローナル抗体の固相化、洗浄、牛血清アルブミンによるブロッキング、洗浄、凍結乾燥により調製した。マイクロプレートに試料溶液を 100 μ L/well 添加して常温で 1 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄した。次いでペルオキシダーゼで標識したポリクローナル抗体溶液を 100 μ L/well 添加し、常温で 1 時間反応させた後、5 回洗浄した。酵素反応のために酵素基質液を 100 μ L/well 添加し、常温で 20 分間放置後、反応停止液を 100 μ L/well 添加した。吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 650 nm で測定した。

サンドイッチ ELISA のバリデーション: 魚標準品を 10 μ g/g の濃度で添加した 5 種類のモデル加工食品 (クリームコロッケ、鶏肉団子、豚肉シウマイ、野菜チキンスープ、白がゆ) について、3 試験機関でサンドイッチ ELISA により測定した。参加機関は試料毎に 2 回の抽出・測定を行った。測定は 3 ウェルを用い、同一プレート上で 8 濃度 (ブランクを含む) の検量線の測定も行った。得られた吸光度データに基づき、日水製薬において検量線 (4 係数ロジスティック曲線) を作成し、検量線を使って各試料中の抗原の濃度を計算した。さらに、回収率、併行精度、室間精度を求めた。

C. 研究結果

1) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

チダイ普通肉から調製した加熱抽出液を Sephadex G-75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィー (図 1A) に供したところ、SDS-PAGE 分析により PA I および II はフラクション 37-42 に確認された。フラクション 37-42 を合一して TSKgel ODS-120T を用いた逆相 HPLC に供すると、保持時間 33.2 分 (Peak I) と 37.3 分 (Peak II) に顕著なピークが認められた (図 1B)。SDS-PAGE 分析の結果、peak I の成分は PA I、peak II の成分は PA II であることが判明した (図 1C)。

精製 PA I をリシルエンドペプチダーゼで分解し、ペプチド断片を逆相 HPLC で分離した (図 2A)。これらペプチド断片のうち 3 つ (ペプチド I-1、I-2、I-3) を任意に選んで MALDI TOF-MS/MS によりアミノ酸配列を解析したところ、ペプチド

I-1、I-2、I-3 はそれぞれ魚類パルブアルブミンの 20-27、97-107、45-54 に相当した (図 5 参照)。この結果から、PA I はパルブアルブミンのアイソフォームであると同定した。一方、PA II のリシルエンドペプチダーゼ分解により得られたペプチド断片についても 3 つ (ペプチド II-1、II-2、II-3) を任意に選んでアミノ酸配列を解析した (図 2B)。その結果、ペプチド II-1、II-2、II-3 はそれぞれ魚類パルブアルブミンの 73-80、84-96、55-64 に相当し (図 5 参照)、PA II もパルブアルブミンのアイソフォームであると同定した。なお、チダイパルブアルブミンをコードする cDNA の塩基配列および演繹アミノ酸配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されているが (accession No. : AB375264)、PA I および II のいずれとも異なっているため、データベース上のチダイパルブアルブミンを PA III と呼ぶことにする。

PA I および PA II の IgG 抗体および患者血中 IgE との反応性は、マアジのパルブアルブミン、マサバのパルブアルブミンも用いて比較検討した。抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体の反応性を可視光 ELISA で調べたところ、PA II の反応性はマアジパルブアルブミン、マサバパルブアルブミンとほぼ同程度であったが、PA I は著しく弱いと判断された (図 3A)。抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体との反応性も、チダイ PA I のみが他のパルブアルブミンより弱いと考えられた (図 3B)。一方、12 名の患者血清を用いた蛍光 ELISA では、1 名の患者血清は PA I と PA II に同程度に反応したが、その他の患者血清は PA I に対する反応性は PA II に対するよりも弱かった (図 4A)。次に、チダイパルブアルブミンの IgE 反応性をマアジパルブアルブミン、マサバパルブアルブミンと比較するために、プール血清を用いて蛍光 ELISA を行った。その結果、PA I の IgE 反応性は他のパルブアルブミンより明らかに弱かった (図 4B)。

PA-F と AP1 を用いた 3'RACE により、約 450 bp の増幅産物が認められた。サブクローニングで得られた 8 クローンの塩基配列を解析したところ、5 クローンは PA I を、2 クローンは PA II を、1 クローンは PA III をコードしていた。一方、PA-F と AP1 を用いた 5'RACE においては約 250 bp の増幅産物が得られた。サブクローニングで得られた 5 クローンのうち、2 クローンは PA I を、3 ク

ローンは PA III をコードしていた。残りの塩基配列を解析するために、PA I-F と AP1 を用いた 3'RACE、AP1 と PA II-R を用いた 5'RACE を行ったところ、3'RACE で得られた 13 クローンはすべて PA I を、5'RACE で得られた 6 クローンはすべて PA II をコードしていた。こうして PA I をコードする完全長 cDNA (705 bp) および PA II をコードする完全長 cDNA (654 bp) の全塩基配列を決定することができた (DDBJ/EMBL/GenBank の accession No. : PA I, AB62511; PA II, AB62512)。翻訳領域の演繹アミノ酸配列は、PA I は 107 残基 (開始 Met を除いた残基数で示す)、PA II は 108 残基で、リシルエンドペプチダーゼ分解ペプチドはそれぞれのアミノ酸配列に確認された (図 5)。PA I と PA II のアミノ酸配列の相同性は 72% と高く、各種魚類パルブアルブミンとも 52-80% の相同性を示した。PA I は、他の魚類パルブアルブミンにみられない特徴的なくつかの残基 (Lys-13、Ala-41、Asp-45 など) を含むことが注目された。

2) 魚類 ELISA 検知法の開発

サンドイッチ ELISA の検量線を図 6 に示すが、0.78-50 ng/mL の範囲で良好な反応性を確認した。検出限界は 0.58 ng/mL (0.23 μ g 魚類タンパク質/g 食品に相当)、定量限界は 1.76 ng/mL (0.70 μ g/g 相当) であった。したがって本サンドイッチ ELISA により、魚類タンパク質は 0.78-50 ng/mL (0.31-20 μ g/g) の範囲で定量可能である。

8 種魚類 (ウナギ、マイワシ、マアジ、チダイ、マサバ、カツオ、メバチ、ヒラメ) およびウシガエルから精製したパルブアルブミン (アイソフォームがある場合は主要成分のみ) に対するサンドイッチ ELISA の反応性を評価するために、各種パルブアルブミンを 0.078-250 ng/mL に調製して各 2 重測定した。得られた吸光度より各種パルブアルブミンにおける標準曲線を 4 係数ロジスティック解析により作成し、回帰式 : $y = \{(A-D)/[1+(x/C)^B]\} + D$ (A : 吸光度が最大となる濃度、D : 吸光度が最小となる濃度、C : 吸光度が中間となる濃度、B : 傾き) の C をもとに、反応率 $\{=100 \times (\text{マサバパルブアルブミンの C 値}) / (\text{比較対象のパルブアルブミンの C 値})\}$ を求めた。その結果、魚類パルブアルブミンはいずれも十分に反応し、反応性は 22.6-100.0% (マサバパルブアルブミンとの反応性を 100% とする) と見積もられた。一方、ウシガエルパルブアルブミンとの反応性はわずか 1.2% で、無視できるレベル

であった。

次に、サンドイッチ ELISA の各種食品原材料（魚 22 種類、棘皮動物 1 種類、甲殻類 9 種類、頭足類 8 種類、巻貝 4 種類、二枚貝 9 種類、魚卵 2 種類、海藻 5 種類、鶏卵、牛乳、ゼラチン、ごま、肉類 3 種類、野菜 6 種類、果物 5 種類、穀類 8 種類、きのこ 2 種類、豆 4 種類、ナッツ 4 種類、茶 5 種類、スパイス 10 種類）との反応性を検証した。魚 22 種類は期待通りすべて陽性反応を示したが、定量値（4.0-46100 $\mu\text{g/g}$ ）は魚種によって著しく異なった。魚の他には、頭足類 8 種類中の 5 種類（ミズダコ、ヤナギダコ、ヤリイカ、アオリイカ、モンゴウイカ）および魚卵 2 種類（タラコ、イクラ）で 1.2-3.8 $\mu\text{g/g}$ の非常に弱い陽性反応が認められたが、残りの 82 種類は偽陽性を示さなかった。

日水製菓で実施した試験室内バリデーションでは、5 種モデル加工食品に添加した魚類タンパク質の回収率は 63.6-81.8%、同時再現性の標準偏差は 1.2-8.1%、日差再現性（6 日間）の標準偏差は 8.1~9.5%といずれも良好であった。3 試験室で実施した試験室間バリデーションの結果を表 1 に示す。試験室内バリデーションと同様に、モデル加工食品からの魚類タンパク質の回収率は 69.4-84.8%と良好であった。また、2 回抽出の併行精度（ RSD_p ）はいずれの試料においても 3.3% 以下、室間精度（ RSD_R ）もおおむね 10% 以下で、サンドイッチ ELISA の精度は高いと判断された。

サンドイッチ ELISA を市販の各種加工食品に供した結果を表 2 に示す。魚を含むというラベルがある食品 21 種類のうち、18 種類については濃度はかなり異なるものの魚類タンパク質が検出された。偽陰性の結果を与えた食品は発酵食品 2 種類（ナンプラー、マグロ酒盗）とコラーゲンパウダーであった。一方、魚を含まない加工食品 16 種類のうち、頭足類を含む 2 種類（イカ煎餅、タコ焼き）と魚卵（タラコ）を含む 1 種類（タラコパスタソース）の計 3 種類で、きわめて弱い（1.2-3.8 $\mu\text{g/g}$ ）偽陽性反応がみられた。

D. 考察

1) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

Kobayashi et al. (2006) は、マダイの抽出液に一部患者の血清 IgE と反応するがパルブアルブミンモノクローナル抗体とは反応しない 14 kDa

のアレルゲンを見いだしている。われわれはチダイにも類似の 14 kDa アレルゲンを検出したので、本研究ではチダイを試料として、12 kDa のパルブアルブミン（PA II）とあわせて 14 kDa アレルゲン（PA I）を精製し、精製品のアミノ酸配列分析により PA I はパルブアルブミンアイソフォームであることを証明した。予備実験レベルではあるが、マダイの 14 kDa アレルゲンもパルブアルブミンアイソフォームであることをすでに認めている。

ELISA により、PA I は PA II と比べてだけでなく、マアジやマサバのパルブアルブミンと比べても、抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体、抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体、さらには魚類アレルギー患者の血中 IgE との反応性はかなり弱いと判断された。Kobayashi et al. (2006) が行ったイムノブロットングでは、マダイの 14 kDa アレルゲンと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は陰性であった。本研究で実施した ELISA は定量的方法であるが、PA I は抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体と陽性反応を示すとはいえ、その反応性は弱いと評価された。定性的方法であるイムノブロットングにおいて、マダイ 14 kDa アレルゲンは抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体と反応しないと評価されたことはやむを得ないといえる。

パルブアルブミンはポリペプチド鎖の長さおよびアミノ酸配列の特徴から α タイプと β タイプにわけられている。 α タイプのパルブアルブミンは 109 残基またはそれ以上であるとされているので、107 残基の PA I、108 残基の PA II、PA III はいずれも β タイプであると推定される。実際、 β タイプに特徴的とされている 6 残基（Ala-13、Leu-15、Cys-18、Phe-66、Gln-68、Thr-78）も、PA I で Ala-13 が Lys-13 に変異していることを除くと完全に保存されている。

魚類パルブアルブミンの IgE 結合エピトープに関しては、Gad c 1 で最初に検討された。Gad c 1 の IgE 反応性は加熱処理やタンパク質変性剤処理によっても影響を受けないこと、 Ca^{2+} 除去によって立体構造が変化しても IgE 反応性の低下は約 25% であることから、IgE 結合エピトープはアミノ酸配列に依存すると考えられ、4 つのペプチド領域が IgE 結合エピトープとして提唱されている。しかし近年、コイやマサバのパルブアルブ

ミンでは、Ca²⁺除去によってIgE反応性が著しく低下することが見いだされ、立体構造エピトープの重要性が示唆された。立体構造エピトープは解明されていないが、IgE反応性が弱いと判断されたPAIにのみ特徴的ないくつかの残基（Lys-13、Ala-41、Asp-45のなど）が見いだされたことは興味深い。これら残基は魚類パルブアルブミンの立体構造エピトープに関与している可能性があるため、PAIをモデルタンパク質として各種改変パルブアルブミンのIgE反応性を評価することは、今後の興味深い検討課題であろう。

2) 魚類 ELISA 検知法の開発

わが国では魚ではなく特定の2魚種（サバとサケ）が表示の対象になっている。そこで当初、マサバパルブアルブミンに対するモノクローナル抗体を用いるサバ ELISA 検知法の開発を目指した。しかし、サバパルブアルブミンのみを特異的に認識するモノクローナル抗体は得られなかった。さらに、魚類パルブアルブミン全般に反応するモノクローナル抗体も得られず、マサバパルブアルブミンに対するモノクローナル抗体を利用する魚類 ELISA 検知法の開発も困難であると判断した。そこで、マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を用いる魚類 ELISA 検知法の開発を目指すこととした。

最近、Fæsta and Plassen (J Immunol Methods 2008; 329: 45-55) により、タラパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を利用した魚類 ELISA 検知法が報告された。しかし、この ELISA 法の定量限界は 5 µg/g で、わが国のアレルギー表示制度ではアレルギータンパク質量が数 µg/g 以上の場合に表示することが望まれていることを考えると、感度の点でやや不足である。また、この ELISA 法は、調べた 32 魚種中 12 種で回収率が 1%以下で、かなり多くの魚種に適用できない可能性がある。それに対して本研究で開発したサンドイッチ ELISA は、感度も高いし（定量限界 0.7 µg/g）、ほとんどの魚種に適用可能である。また、われわれのサンドイッチ ELISA は、厚生労働省で示されている試験室間バリデーションのプロトコールを、試験室数が少ないという点を除くとすべて満たしており、加工食品中の魚類タンパク質を定量する信頼性の高い方法であるといえる。

開発したサンドイッチ ELISA は、市販の加工食品におおむね適用可能であったが、一部で偽陰

性または偽陽性がみられた。偽陰性を示した食品は発酵食品 2 種類（ナンプラー、マグロ酒盗）とコラーゲンパウダーであるが、発酵食品では発酵過程でプロテアーゼ作用を受けてペプチドまたはアミノ酸に分解されること、コラーゲンパウダーの場合はパルブアルブミンが除去されていることを考えると不思議な結果ではない。一方、魚を含まない加工食品 16 種類のうち、頭足類を含む 2 種類（イカ煎餅、タコ焼き）と魚卵（タラコ）を含む 1 種類（タラコパスタソース）の計 3 種類で、きわめて弱い（1.2-3.8 µg/g）偽陽性反応がみられたが、表示レベル以下であるのでそれほど問題ないと考えられる。

E. 結論

1) チダイに含まれるパルブアルブミンアイソフォームの性状

チダイには 2 成分のパルブアルブミンアイソフォーム（PAI および II）が含まれるが、PAI は IgE 反応性が他の魚類パルブアルブミンより非常に弱く、パルブアルブミンの立体構造 IgE エピトープ解析におけるモデルタンパク質となる。

2) 魚類 ELISA 検知法の開発

マサバパルブアルブミンに対するポリクローナル抗体を利用したサンドイッチ ELISA 系は、感度および特異性に優れ、加工食品中の魚類タンパク質の定量法として非常に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Kobayashi, K. Ohsaki, K. Ikeda, S. Kakemoto, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi: Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. Parasitol. Int., 60, 144-150 (2011)
- 2) 福本 瞳, 朝山祥子, 高田香織, 二神綾子, 塩見一雄, 川名誠司: パルブアルブミンによる口腔アレルギー症候群—手の職業性接触皮膚炎を合併した例. 皮膚病診療, 33, 1035-1038 (2011)
- 3) M. Kanamori, H. Tanaka, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: New extraction method

suitable for immunoblotting analysis of fish allergens. *Eur. Food Res. Technol.*, 233, 991-997 (2011)

- 4) F.-F. Guo, H. Kubota and K. Shiomi: Purification, immunological properties and molecular cloning of two allergenic parvalbumins from the crimson sea bream *Erythrinus japonicus*. *Food Chem.*, 132, 835-840 (2012)
- 5) 嶋倉邦嘉, 綿谷ゆきな, 塩見一雄: サケ類 *Oncorhynchus masou masou* の陸封型 (ヤマメ) と遼河型 (サクラマス) のアレルギー性比較. 食衛誌 (印刷中)
- 6) S. Ishizaki, Y. Sakai, T. Yano, S. Nakano, T. Yamada, Y. Nagashima, K. Shiomi, Y. Nakao and H. Akiyama: Specific detection of potentially allergenic salmonid fish residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (accepted)

2. 学会発表

- 1) 塩見一雄, 綿谷ゆきな, 嶋倉邦嘉: 陸封型と降海型のサケ類のアレルギー性比較. 第101回日本食品衛生学会学術講演会(2011年5月, 東京)
- 2) 柴原裕亮, 上坂良彦, 汪俊, 山田彰一, 塩見一雄: ELISA法を用いた魚類検出試薬の開発. 第102回日本食品衛生学会学術講演会(2011年9月, 秋田市)
- 3) 額瀨愛子, 三田大, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: スラックタイカ[®]の sarcoplasmic calcium-binding protein の一次構造解析および組換えタンパク質の IgE 反応性. 平成23年度日本水産学会秋季大会(2011年9月, 長崎市)
- 4) 森井愛花, 三田大, 嶋倉邦嘉, 塩見一雄: フラックタイカ[®] sarcoplasmic calcium-binding protein の IgE 反応性は立体構造に依存する. 平成23年度日本水産学会秋季大会(2011年9月, 長崎市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

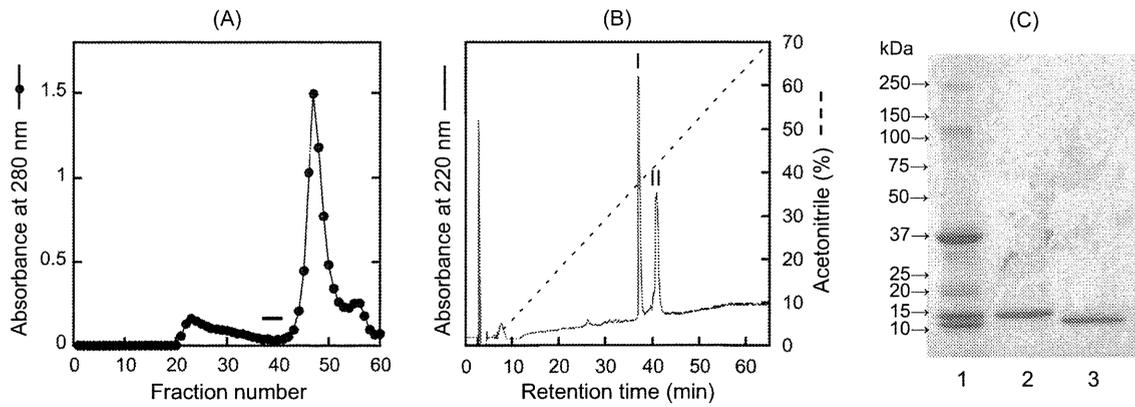


図1. チダイからの PA I および PA II の精製. (A) ゲルろ過. (B) 逆相 HPLC. (C) SDS-PAGE. 試料: レーン 1, 加熱抽出液; レーン 2, 精製 PA I; レーン 3, 精製 PA II.

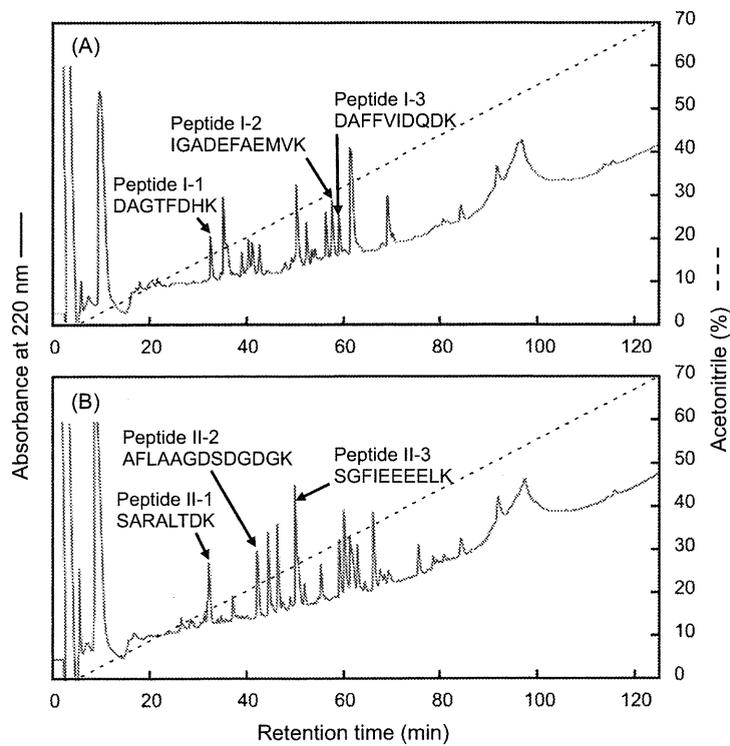


図2. PA I (A) および II (B) のリシルエンドペプチダーゼ分解により生じたペプチド断片の逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) による単離.

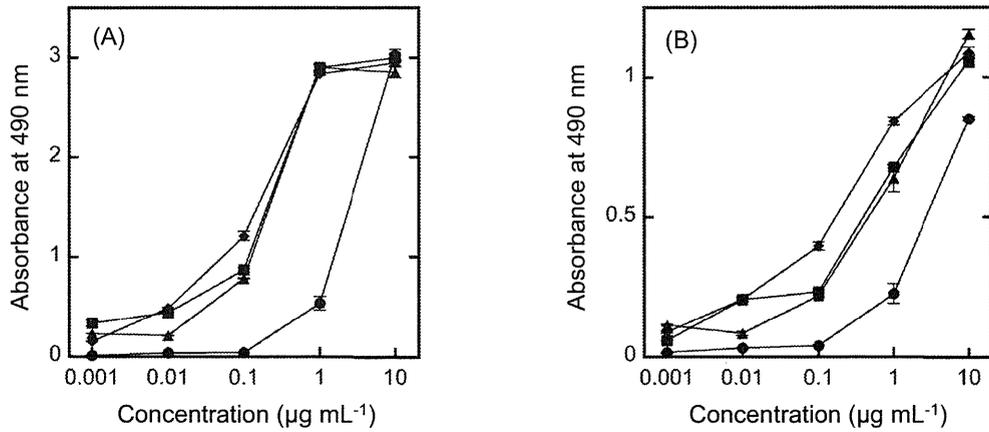


図3. PA I (●), PA II (■), マアジパルブアルブミン (◆) およびマサバパルブアルブミン (▲) の IgG 反応性 (可視光 ELISA). (A) 抗カエルパルブアルブミンモノクローナル抗体との反応性. (B) 抗マサバパルブアルブミンポリクローナル抗体との反応性.

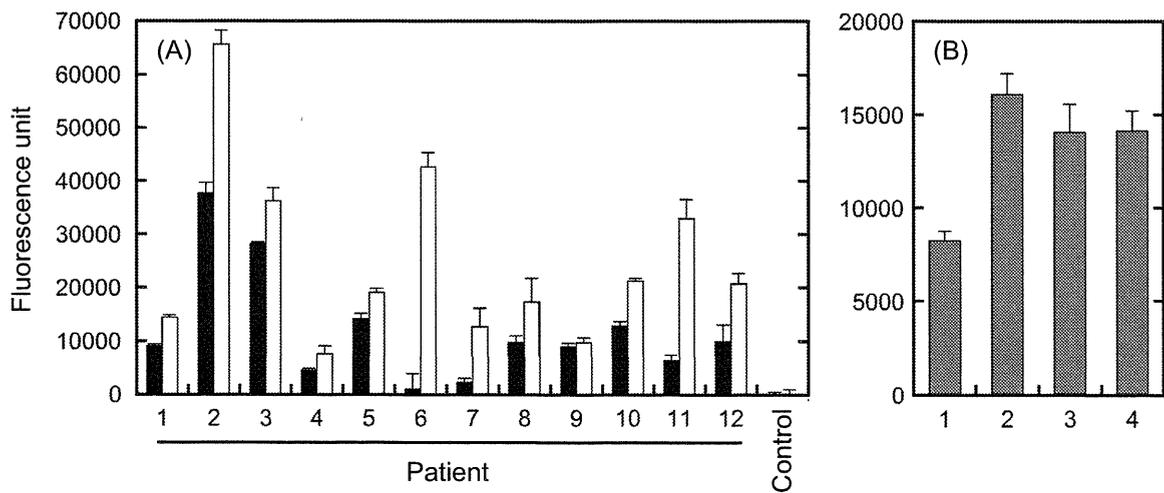


図4. PA I, PA II, マアジパルブアルブミンおよびマサバパルブアルブミンの IgE 反応性 (蛍光 ELISA). (A) PA I (■) および PA II (□) と 12 名の患者血清との反応性. (B) PA I (1), PA II (2), マアジパルブアルブミン (3) およびマサバパルブアルブミン (4) と患者プール血清 (12 名) との反応性.

```

1          10          20          30          40          50          60
PA I      PFKG LQDADVAKALEGCKDAGTFDHKKFFHACGLSGKSGADVKKDAFFVVDQDKSGFIEE
PA II     A-S-V-S---MKA--D--SA-DS--Y---K-----ADE--K--AI-----
PA III    A-G-I-K---ITA--AA--A-DS-K--E--SKV--S--ADEI-K--A-----
Sardine   ALA-LVKE--ITA--A--A-DS--A---KV-M---ADEL-KS-AI-----
Japanese eel A-A-V-K---ITA--A--A-DS-NY-A--AKV--N--PD-I-K--SI-----
Carp      A-A-V-N---I-A--A--A-DS-N--A--AKV--TS--AD--K--AI-----
Atlantic salmon S-A--N---A--AA-TA-DS-N--A--AKV--AS--SD--K--Y-----
Cod       A---I-SN--IKA-EAA-FKE-S--EDG-YAKV--DAF-ADEL-KL-KIA-E--E---
Horse mackerel A--V-N---TA--D---S--A--K---AA--AD-I-K--AI-----
Pacific mackerel A-ASV-K--E-TA--D--A--S-----S-----TDE--K--AI-----
Skipjack   AVA--K--E--A--DA-----S-----K-----AD--K--AI-----
                                                *****

61          70          80          90          100          110
PA I      EELKFLQNFKAGARALDDEETKKFLKAGDSDGDGKIGADEFAEMVKV
PA II     ---S---GKS---K---A--A-----V---AL--A
PA III    D-----E-----
Sardine   -----CKK-----G--N---T-----I-N-NHL--H
Japanese eel D-----SK-----K--A--Q---T-----I--AV--A
Carp      D-----D-----G---T---V---TAL--A
Atlantic salmon D-----S-S---A--A--AD--K---M--V---A-I-G
Cod       D-----IA-A-DL---A--A-----V---GAL-DKWGAKG
Horse mackerel D-----C-----S-A--A-----V---A--H
Pacific mackerel D-----S-A--A-----I---A-I-G
Skipjack   -----SS---S-A--A--L-----V---AL--H
**                *****

```

図 5. チダイパルブアルブミン (PA I-III) と他の魚類パルブアルブミンとのアミノ酸配列比較. Ca 結合部位は*で示す. リシルエンドペプチダーゼ分解ペプチド (PA I 由来のペプチド I-1, I-2, I-3, PA II 由来のペプチド II-1, II-2, II-3) は括弧で囲って示す.

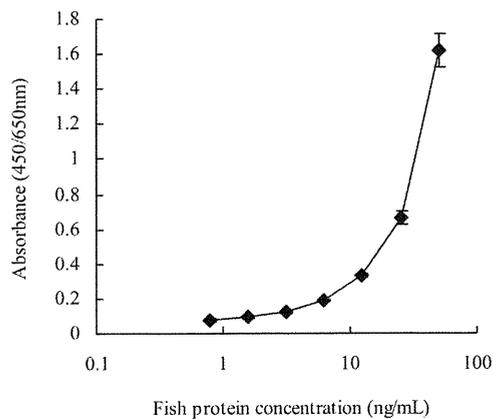


図 6. 魚類サンドイッチ ELISA の検量線.

表 1. 複数機関 (3 機関) における魚類 ELISA 検知法の試験室間バリデーション結果

モデル加工食品	回収率 (%)	併行精度 (RSD _r , %)	室間精度 (RSD _R , %)
鶏肉団子	71.7	2.4	4.7
クリームコロッケ	69.4	2.3	4.9
豚肉シュウマイ	84.8	3.3	10.5
野菜チキンスープ	77.2	1.5	3.1
白がゆ	79.4	1.2	4.5

表 2. 市販加工食品 37 検体の魚類 ELISA 検知法による測定結果

加工食品	測定値 (ppm)	魚類の表示内容
魚醤	9.9	魚
ナンブラー	<1.0	魚エキス
マグロ酒盗	<1.0	まぐろ
コラーゲンパウダー	<1.0	魚コラーゲンペプチド
缶詰 (サーモン水煮)	17.6	アトランティックサーモン
缶詰 (サバ水煮)	257.4	さば
缶詰 (シーチキン)	11.3	きはだまぐろ
レトルト (ツナクリームソース)	1.5	まぐろ水煮
レトルト (紅鮭がゆ)	162.5	べにさけ, 鮭エキス
ちくわ A	790.5	魚肉 (たら, その他)
ちくわ B	1,847.4	魚肉
ちくわ C	523.6	魚肉
かまぼこ	1,643.9	魚肉 (たら, いとより, きんときだい, その他)
魚肉ソーセージ A	19.3	魚肉 (ほっけ, いとより, たら, その他)
魚肉ソーセージ B	106.4	魚肉 (ほっけ, たら, たちうお, その他)
魚肉ソーセージ C	18.8	魚肉 (ひめじ, ほっけ, たら, その他)
魚肉ソーセージ D	797.9	魚肉 (ほっけ, えそ)
シーフードヌードル	26.0	魚肉練り製品, 魚介エキス
サケふりかけ	399.1	鮭エキス, 鮭, かつお節, かつおエキスパウダー, 魚醤
カツオだし	9.9	風味原料 (かつおぶし粉末, そうだかつおぶし粉末)
カツオ節	126.8	かつおのふし
ビスケット	<1.0	
エビ菓子	<1.0	
エビ煎餅 A	<1.0	
イカ煎餅	1.4	
タコ焼	2.3	
カニ缶詰	<1.0	
油揚げ麺	<1.0	
カキフライ	<1.0	
カルボナーラソース	<1.0	
タラコパスタソース	4.2	
ハンバーグ	<1.0	
ドレッシング	<1.0	
レトルトカレー	<1.0	
中濃ソース	<1.0	
シューマイ	<1.0	
クリームコロッケ	<1.0	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
科学的知見に基づく食物アレルギー患者の安全管理と QOL 向上に関する研究
分担研究報告書

果実・種実類に含まれるアレルギー物質及び検知法に関する研究

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 成田宏史（京都女子大学）
山本貴之、伊藤花織（株式会社森永生科学研究所）
松本貴之、森下直樹（日本ハム株式会社）
秋元政信、加藤重城（プリマハム株式会社）
柴原裕亮（日本製薬株式会社）
山田彰一（日本水産株式会社）
織田浩司、小泉大輔（株式会社マルハニチロホールディングス）
谷口嘉之、佐久間恵、中尾義喜（オリエンタル酵母工業株式会社）
蒲生玲子、有馬優美（株式会社ニッポンジーン）
中村厚、酒井信夫、穂山浩、手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

食物アレルギー患者の安全管理と QOL の更なる向上を目的とし、食物アレルギー原因物質の解析及び検査法に関して、[1]特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良、[2]果実類検知ELISA法の開発、[3]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、[4]ゴマアレルギーの解析を行った。その結果、[1]亜硫酸ナトリウム系抽出液により調製した卵、牛乳、小麦、そば、落花生、甲殻類の標準品原液及び高濃度標準品について -80°C 保存時の安定性を検討した結果、現行の 2ME 系抽出液により調製した標準品と同様に少なくとも6ヶ月間は安定であることが示された。[2](1)キウイフルーツ検出法の開発として、キウイフルーツ標準品の製造方法を検討及び保存試験を行った。また、二次抗体にビオチン標識抗体あるいは HRP 標識抗体を用いたサンドイッチ ELISA 系を構築し、どちらの系でもモデル食品からのキウイフルーツタンパク質の検出は可能であることを示した。各種食品への交差反応性を調べた結果、HRP 標識抗体を使用した場合にビオチン標識抗体に比べ交差反応性が多い傾向にあったことから、HRP の標識方法などの見直しが必要と考えられた。本キウイフルーツ検出用 ELISA 系の標的タンパク質であるアクチニジンを高濃度を含むキウイフルーツやサルナシで反応性が高かったが、アクチニジン濃度が低い一部のゴールドキウイやマタタビに対する反応性は低いことが示された。(2)リンゴ検出法の開発として、標準品の調製方法を検討した。また2組の抗 LTP マウスモノクローナル抗体の組み合わせを選択し、ELISA を構築した。リンゴタンパク質含有モデル食品を作成し、添加回収試験を行ったところ、回収率は現行のガイドラインの基準である 50~150 %の範囲に入ることが確認された。この ELISA 系ではリンゴジュースや皮を含まない市販食品ではリンゴを検出できない場合があり、LTP 以外の新たな指標タンパク質を選定する必要性が示された。[3]蛍光偏光度測定によるリンゴアレルギーの簡易検出は可能と考えられた。[4]ゴマアレルギーである 11S グロブリンの全長をカバーする SPOTs 膜を用いてゴマアレルギー患者血清との反応性を検討したところ、全長にわたって 8 カ所の反応部位が検出された。そのうちの3カ所はゴマ以外の他の6種の 11S グロブリンでもエピトープであることが報告されている Allergenic Hot Spot であった。

A. 研究目的

わが国では、食物アレルギー患者の原因食品摂取による健康危害を防止する目的で、特定原材料7品目(卵、乳、そば、小麦、落花生、えび、かに)の表示が義務化されており、さらに特定原材料に準ずる18品目も表示が推奨されている。本研究において

は、食物アレルギー患者の安全管理と QOL の更なる向上を目的とし、食物アレルギー原因物質の解析及び検査法に関する以下の研究を実施した。

[1] 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良

現在の特定原材料 ELISA キットには、0.5% SDS 及び 2% 2-メルカプトエタノール (2-ME)を含む抽出用緩衝液が添付されており、この抽出液を用いて検体(加工食品)からタンパク質を抽出し、ELISA の試料とすることとなっている。また、検量線作成用標準品や希釈液にも 2-ME が含まれている。平成 20 年 6 月、2-ME が毒物に指定されたため、ELISA キット、検査廃液等を毒物として取り扱うこととなり、検査の現場においては保管や廃棄等の点で不便が生じている。また、食品メーカー等で自主検査への使用を考える際にも導入が難しい状態である。このような状況を考慮し、2-ME に代わる還元剤を用いた抽出液について、ELISA キットメーカー、標準品メーカーとの共同研究により検討を行う。23 年度においては亜硫酸ナトリウム(Na_2SO_3)を含有する抽出液を用いて調製した ELISA キット用標準品の安定性に関する検討を行った。

[2] 果実類検知 ELISA 法の開発

推奨 18 品目の果実類のうち、キウイフルーツ及びリンゴの検知法開発に向けた検討を行った。

[3] 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

現在公的機関や指定検査機関では、表示の監視を目的とするアレルギー物質を含む食品の検査法(消費者庁から示されている通知検査法)として、ELISA法、ウエスタンブロット法、PCR法などの検知法が実施されている。しかし食品事業者が食品工場等で自主管理に利用できるような安価・迅速・簡易な方法は存在しない。今後、表示が義務化される特定食物アレルギーは増加していくものと考えられるが、食品事業者が自主管理を目的として通知検査法に従った検査を行うことは、コスト面、設備等から考えると事業者にとって容易ではない。このため、食品事業者が導入することが比較的容易で、安価、迅速、及び簡易な特定食物アレルギーの検出システムが必要である。本研究では、蛍光偏光度測定によるリンゴアレルギーの検出について基礎検討を行った。

[4] ゴマアレルギーの解析

ゴマは、特定原材料及び特定原材料に準ずるものではないが、最近症例数が徐々に増加しており、要注意品目である。即時型食物アレルギー全国モニタリング調査では、食物アレルギー原因食品とし

て、平成 13-14 年度には 25 位であったのが、17 年度には 17 位、20 年度には 16 位と、順位を上げている。また、EU、カナダ、オーストラリア・ニュージーランドでは、アレルギー表示品目に指定されている。

ゴマのアレルギータンパク質としては、2S アルブミン、11S グロブリン、7S グロブリン、オレオシン等が知られている。2S アルブミンは主要アレルギーであり、ゴマタンパク質の 20-30%を占める。3 種のアイソフォームがあり、そのうち 1 種類についてはエピトープ解析が行われている。11S アルブミンはゴマタンパク質の 60-70%を占める最も含有量の多いアレルギータンパク質であるが、詳細なエピトープ解析はまだ行われていない。そこで、本研究では 11S グロブリンのエピトープ解析を行った。

B. 研究方法

[1] 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良

現行の通知検査法別添4には、各特定原材料の標準品規格が定められている。それぞれ一次標準粉末からタンパク質を抽出して標準品原液とし、さらに一次希釈液、高濃度標準液へと希釈される。現行の一次標準粉末からのタンパク質抽出液を表1に示す。本研究では、「0.5% SDS及び2% 2-ME」という部分を「0.6% SDS及び100 mM亜硫酸ナトリウム」に置き換えた抽出液を調製し、一次標準粉末からの抽出を行った。標準品規格に従い、各品目の一次標準粉末に抽出液を加えて一晚抽出し、不溶物を遠心分離及びろ過によって分離し、標準品原液とした。この標準品原液について、2-D Quant kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)によりタンパク定量を行い、また SDS-PAGE 電気泳動像を確認した。同時に現行の 2-ME 含有抽出液による抽出も行い、亜硫酸ナトリウム含有抽出液との比較を行った。これらの標準品原液を、通知検査法別添4の標準品規格に則り、PBS(pH7.4)で10倍希釈したものを一次希釈液とし、これをさらに0.2% BSA含有PBSで2倍希釈したものを高濃度標準液とした。標準品原液及び高濃度標準液を-80℃にて長期保存し、電気泳動像及び ELISA キットにおける吸光度を測定することにより安定性試験を行い、亜硫酸系標準液と 2ME 系標準液の安定性について比較した。

[2] 果実類検知 ELISA 法の開発

(1) キウイフルーツ検出法の開発

1) キウイフルーツ標準品および保存性の検討

標準品原液作製用抽出液組成は、通知検査法の植物系(そば、落花生)抽出液と同じ組成で pH を 8.6 に調整したものを使用した。また、キウイフルーツ中のアクチニジン(指標タンパク質)がプロテアーゼであることから、抽出方法は甲殻類標準品原液の作製方法を参考に実施した¹⁾。キウイフルーツ(Hayward 種)の皮を剥き、凍結乾燥後、粉碎してキウイフルーツ一次標準粉末とした。一次標準粉末を常温に戻したのち、PP 製遠沈管(50 mL 容)に 1.0 g はかりとり、抽出液(0.5 % SDS、2 % 2-ME、0.5 M NaCl、10 μ g/mL E64(プロテアーゼ阻害剤)²⁾、100 mM Tris-HCl pH8.6) 20 mL を加えた。室温で 16 時間振とう抽出を行った後、遠心分離(10,000 \times g、30 分、4 $^{\circ}$ C)し、上清を、0.8 μ m のフィルターでろ過した。ろ液を PP 製遠沈管(50 mL 容)に入れ、沸騰水で 10 分加熱した。2-D Quant kit(GE Healthcare)でタンパク質量を測定し、濃度を調整した。また、SDS-PAGE によるキウイフルーツ標準品原液のバンドの確認を行った。キウイフルーツ標準品原液を PBS で 10 倍希釈し、1 % BSA を含む PBST で 2 倍希釈したものをキウイフルーツ高濃度標準液とした。キウイフルーツ高濃度標準液を、標準品希釈液(抽出液を希釈液で 20 倍希釈したもので希釈し、50 ng/mL に調整したものをキウイフルーツ標準溶液とした。

このキウイフルーツ標準溶液を、-80 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C および 37 $^{\circ}$ C に保存し、HRP 標識抗体を二次抗体とした ELISA で吸光値を測定して、-80 $^{\circ}$ C と 4 $^{\circ}$ C あるいは 37 $^{\circ}$ C との比を求め、保存性を検討した。

2) キウイフルーツ検知用 ELISA

平成 21 年度までに確立した抗アクチニジンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA を使用した。また、ELISA の二次抗体にビオチン抗体あるいは HRP 標識抗体を使用し、標識の違いを検証した。50 ng/mL のキウイフルーツ標準溶液から 0.78 ng/mL までの 2 倍の希釈段を用いて、標準曲線を評価した。

3) モデル食品における添加回収試験

モデル食品としてお汁粉にキウイフルーツタンパク質が 10 μ g/g となるようにキウイフルーツ一次標準粉末を添加し、未加熱、100 $^{\circ}$ C \cdot 10 分、120 $^{\circ}$ C \cdot 4 分処理したものと、キウイフルーツを添加しないブランクを測定した。

4) 交差反応性の検証

卵、乳製品、肉類、米 \cdot 麦類、豆類、種実類、果実類、魚介類、軟体動物 \cdot 魚卵、藻類、香辛料、野菜 \cdot きのこ類、増粘多糖類、飲料、調味料など 188 食品

について、交差反応性の有無を比較した。

5) 各種キウイフルーツおよび近縁種に対する反応性の確認

グリーンキウイ(*Actinidia deliciosa*)のうちのゼスプリグリーン(Hayward)、ブルーノ、香緑、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)のうちのゼスプリゴールド(Hort 16a)、アップルキウイ、サンゴールド、紅鮮、サルナシ(*A. arguta*)のうちの信山、一才、また、マタタビ(*A. polygama*)の未熟、完熟、虫えい)を購入し、それぞれの反応性を確認した。この試験では、二次抗体に HRP 標識抗体を使用した。

(2) リンゴ検出法の開発

1) リンゴ標準品の検討

標準品原液作製用抽出液組成は、通知検査法の植物系(そば、落花生)抽出液と同じ組成で pH を 8.6 に調整したものを使用した¹⁾。リンゴ(サンふじ)を皮付きのまま芯を除いたものを凍結乾燥後、粉碎してリンゴ一次標準粉末を作製した。リンゴ一次標準粉末 1 g に抽出液(0.5 % SDS、2 % 2-メルカプトエタノール、0.5 M NaCl、100 mM Tris-HCl pH8.6) 20 mL を加え、室温で 16 時間振とう抽出を行った。遠心分離(10,000 x g、30 分、室温)し、上清を 0.8 μ m のフィルターでろ過したものをリンゴ標準品原液とした。2D-Quant kit(GE Healthcare)でタンパク質量を測定した。また、SDS-PAGE によるリンゴ標準品原液のバンドの確認を行った。リンゴ標準品原液を PBS で 10 倍希釈し、1 % BSA を含む PBST で 2 倍希釈したものをリンゴ高濃度標準液とした。リンゴ高濃度標準液を、標準品希釈液(抽出液を希釈液で 20 倍希釈したもので希釈し、50 ng/mL に調整したものをリンゴ標準溶液とした。

2) リンゴ検知用抗 LTP 抗体の組み合わせの検討

① 抗 LTP 部分ペプチド-ウサギポリクローナル抗体

リンゴ LTP のアミノ酸配列の中から、抗原性、分子表面への露出度等を考慮して、リンゴ LTP に対する特異的抗体が産生されやすいと考えられる配列をコンピューターアプリケーションにより選択した。このアミノ酸配列のペプチドを合成し、ウサギ 2 羽にそれぞれ 8 回免疫した。その後全採血し、リンゴ LTP に対して特異的な抗血清を選択し、抗原ペプチドを用いたアフィニティ精製によりリンゴ LTP 特異的 IgG 画分(以下、ウサギ PAb)を得た。この一部を Peroxidase Labeling Kit-SH(株同仁化学研究所)により酵素標識した。

② 抗 LTP-ラットモノクローナル抗体

LTP を抗原として平成 22 年度に確立したラットモ

ノクローナル抗体(以下、1A2/9A8)を、SCID マウスを用いた腹水法により腹水を得て、Protein G カラムで精製し、その一部を Peroxidase Labeling Kit-SH により酵素標識した。

③抗 LTP-マウスモノクローナル抗体

6 種類の抗 LTP-マウスモノクローナル抗体(以下、1G、2G、7D、11G、12E、12H)を、BALB/c を用いた腹水法により腹水を得て、Protein G カラムで精製した。この 6 種類のうち酵素標識抗体での性能が確認されている 7D を選択し、Peroxidase Labeling Kit-SH により酵素標識した。

④LTP 検知用サンドイッチ ELISA 系の検討

LTP 検知用サンドイッチ ELISA 系には、2) で得られた各抗 LTP 抗体の組み合わせを検討した。各抗体の組み合わせを表 2 に示した。各組み合わせの検討には、1) で調製したリンゴ高濃度標準液から標準品希釈液で 12 \square g/mL に調整し、その後、標準品希釈液で作成した 10 倍の希釈段を用いた。さらに、選択された組み合わせについては、50 ng/mL に調整したリンゴ標準溶液から 2 倍の希釈段で 0.78 ng/mL まで調製したものをを用いて、標準曲線の評価を実施した。

3)モデル食品における添加回収試験

市販のオレンジジュースとプレーンヨーグルト、また、本検討用に作製したモデルハムにリンゴタンパク質が 10 \square g/g となるようにリンゴ一次標準粉末を添加した。作製したモデル食品は未加熱のもと適宜加熱調理したものを用意した。フードプロセッサで均一にした後、1 g 秤量し 19 mL の ELISA 用抽出液を加え、一晩振とう抽出したものを検査用サンプルとした。50 ng/mL のリンゴ標準溶液から 2 倍の希釈段で 0.78 ng/mL まで調製したものを検量線として、各モデル食品中のリンゴタンパク質の測定値を求めた。

4)市販食品中のリンゴタンパク質の測定

リンゴが原材料として使われる市販食品 13 種類を購入した。フードプロセッサで均一にした後、1 g 秤量し 19 mL の ELISA 用抽出液を加え、一晩振とう抽出したものを検査用サンプルとした。50 ng/mL のリンゴ標準溶液から 2 倍の希釈段で 0.78 ng/mL まで調製したものを検量線として、各市販食品中のリンゴタンパク質の測定値を求めた。

[3] 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

使用装置：infinite F200 (TECAN 社)、励起波長：485nm, 測定波長：530nm、使用マイクロプレ

ート：384 ウェルプレート (蛍光測定用：Corning 社)、FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体、KLH 結合リンゴ LTP ペプチド、抗原抗体反応安定化剤：Immuno Shot

実験方法：1. FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体並びに KLH 結合リンゴ LTP ペプチドを PBS あるいは抗原抗体安定化剤で適宜希釈した。2. 適宜希釈した FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体並びに KLH 結合リンゴ LTP ペプチド各 10 μ L ずつを 384 ウェルプレート内で混合し、infiniteF200 内で 37°C で保温した。3. 各反応時間に蛍光偏光度を測定した。

[4] ゴマアレルゲンの解析

ゴマアレルゲンである 11S グロブリンの4種のアイソフォームのうち、主要なアレルゲンであるアイソフォーム2について、その全長をカバーする 59 本のペプチド(15 アミノ酸残基、オフセット 8)をセルロース膜上にスパーサーを介した共有結合によりスポットした SPOTs 膜(Sigma-Aldrich 社)を作成した。この膜上のスポットとゴマアレルギー患者血清との反応性をドットプロット法と同様にして検討することにより、患者血清中の抗体が認識するエピトープの解析を行った。ゴマアレルギー患者血清は国立病院機構相模原病院 海老澤元宏先生、佐藤さくら先生よりご供与頂いた。

C. 研究結果

[1] 特定原材料ELISAキット用タンパク質抽出液の改良

亜硫酸系抽出液及び従来の 2ME 系抽出液を用いて作成した、卵、牛乳、小麦、そば、落花生、甲殻類それぞれの標準液を -80°C にて保存し、その安定性について検討した。図1には、標準品原液の 0、1、6 ヶ月における電気泳動像を示す。亜硫酸系 3 ロットと 2ME 系 1 ロットの標準品原液を比較したところ、亜硫酸系と 2ME 系で電気泳動パターンに大きな違いはないこと、6 ヶ月後においても泳動パターンに大きな変化はなく安定であること、また、亜硫酸系 3 ロット間で泳動パターンに違いはないことが示された。次に、同様に調製・保管した高濃度標準品をタンパク質濃度 25 ng/mL まで希釈し、各 ELISA キットにて吸光度を測定した。結果の例を図2に示す。左には、亜硫酸系 3 ロット、2ME 系 1 ロット、及び標準品メーカーが長期保管している Control 標準液(2ME 系抽出液を用いて調製したもの)の各測定時点における吸光度を示している。右には、Control 標準液の吸光度に対

する各標準液の吸光度比を示している。測定により吸光度に若干変動が見られるが、長期保存により吸光度が大きく減少するものは見られず、亜硫酸系と2ME系とでは吸光度比はほぼ同様の挙動を示した。また、亜硫酸系の3ロット間で吸光度に大きな変動は見られなかった。ここには検討結果の一部のみを記載したが、他のELISAキットと高濃度標準液の組み合わせの場合も同様の結果が得られており、高濃度標準液の安定性が示された。

[2] 果実類検知 ELISA 法の開発

(1) キウイフルーツ検出法の開発

1) キウイフルーツ標準品の調製および保存性の検討

キウイフルーツ標準品原液のタンパク質濃度は1.7~2.3 mg/mLであった。また、図3のようなSDS-PAGEの泳動像を得た。

また、キウイフルーツ標準品(50 ng/mL)の保存試験結果を図4に示した。37℃では90日以降で吸光値の低下がみられたが、4℃保存品では10ヶ月保存まで-80℃と比較して吸光値の大きな上昇あるいは低下は認められなかった。

2) キウイフルーツ検知用 ELISA

ビオチンおよび HRP 標識抗体を用いたところ、キウイフルーツタンパク質を 50 ng/mL から 0.78 ng/mL の範囲で測定可能であった(図5、6)。

3) モデル食品における添加回収試験

表3示すように、ビオチンおよび HRP 標識抗体を用いて、モデル食品であるお汁粉中のキウイフルーツタンパク質を測定した結果、どちらの標識抗体を用いた場合も同等に測定できた。

4) 交差反応性の検証

188種類の各種食品に対する交差反応性を検証した結果を表4(1)、(2)に示した。ビオチン標識抗体に比べ、HRP 標識抗体を二次抗体に用いた方が交差反応性を示す食品が多かった。

5) 各種キウイフルーツおよび近縁種に対する反応性の確認

各種キウイフルーツおよび近縁種に対する反応性の結果を図7に示した。ELISA系はグリーンキウイ(*Actinidia deliciosa*)のゼスプリグリーン(ヘイワード)、ブルーノ、香緑、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)のアップルキウイ、ならびにサルナシ(*A. arguta*)の信山、一才に高い反応性を見せたが、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)のゼスプリゴールド(ホート16a)、サンゴールド、紅鮮、ならびにマタタビ(*A. polygama*)に対す

る反応性は低かった。

(1) リンゴ検出法の開発

1) リンゴ標準品の調製

リンゴ標準品原液のタンパク質濃度は、273 μ g/mLであった。また、タンパク質濃度が低いことから、SDS-PAGEでは今回指標としたLTPの明確なバンドを得られなかった。

2) リンゴ検知用抗 LTP 抗体の組み合わせの検討

リンゴ検知用抗 LTP 抗体の組み合わせの結果を図8~図10に示す。酵素標識抗体がウサギ PAb の場合(図8)は、いずれの抗体の組み合わせも検出感度が低く、実用化は難しいと考えられた。酵素標識抗体がラット MAb の場合(図9)は、ウサギ PAb との組み合わせが最も感度が高かったが、目標の感度には至らなかった。酵素標識抗体がマウス MAb である7Dの場合(図10)は、12Eか12Hの組み合わせで感度が高く、50 ng/mL程度が検出できる可能性が認められた。そこで、7Dと12E、7Dと12Hの2種類の組み合わせでリンゴ検知用 ELISA を構築した。それぞれ図11及び図12の検量線が得られた。

3) モデル食品における添加回収試験

50 ng/mL のリンゴ標準溶液から 0.78 ng/mL までの2倍の希釈段を検量線として、7Dと12E、7Dと12Hの2組の組み合わせで、モデル食品に含まれるリンゴタンパク質の濃度を測定した添加回収試験の結果を表5に示した。それぞれ2通りの組み合わせで、ガイドラインの基準である5~15 μ g/g(回収率50~150%)の範囲で測定できることが確認された。

4) 市販食品中のリンゴタンパク質の測定

表6で示すようにリンゴチップのように乾燥された皮付きの商品では20 μ g/g以上となった。しかし、リンゴジュースでは栄養成分として0.1%のタンパク質が表示されているにもかかわらず、17~18 μ g/g程度の検出となり、低い測定結果となった。さらに、皮付きではない商品ではリンゴが添加されたヨーグルトのように検出限界以下となった。

[3] 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

(1) 抗体の希釈度の検討

FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体の 10,000 倍希釈(1nM)が良好であり、この後の実験は、全てこの濃度で行った。

(2) リンゴ LTP-KLH 濃度と蛍光偏光度の関係

15分、30分、45分、60分の保温時間で検討したところ、保温時間は30分以上必要であった。

保温時間 60 分の結果を図 13A に示した。また、リンゴ LTP-KLH の 10,000 倍希釈程度から、濃度依存的に蛍光偏光度が増加した。

(3) 抗原抗体安定化剤の影響

上記(1)(2)においては、FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体並びに KLH 結合リンゴ LTP ペプチドを PBS を用いて希釈した。次に抗原抗体安定化剤で希釈し、その影響を検討した。結果を図 13B に示す。抗原抗体反応安定化剤で希釈したものは PBS で希釈したものと比較して、KLH 結合リンゴ LTP ペプチドの低濃度における蛍光偏光度が増大した。

[4] ゴマアレルゲンの解析

ゴマ 11S グロブリンのアイソフォーム 2 について、その全長をカバーする 59 本のペプチド(15 アミノ酸残基、オフセット 8)をスポットした SPOTs 膜を用い、この膜上のペプチドとゴマアレルギー患者血清との反応性を検討した。結果を図 14 に示す。負荷試験陽性(強い症状)の患者の血清(A8-0001、0008、0010)の場合、図中に下線を付した 8 カ所のペプチド配列について、血清中 IgE との強い結合性が検出された。負荷試験陽性(弱い症状)(A8-0013、0014)及び負荷試験陰性(A8-0017、0018)の患者の血清の場合も、強い症状の患者血清とほぼ同様のペプチドに対する IgE の結合が検出されたが、その反応性は強い症状の患者血清と比較して弱かった。なお、コントロール血清ではこのような反応性はほとんど見られなかった。

図 15 には 11S グロブリンアイソフォーム 2 の全ペプチド配列を示す。太字部分が図 14 において患者血清と強い反応性を示した配列部分である。図 14、15 の結果より、患者血清と反応する部分は 11S グロブリンの分子全体にわたって分布していることが示された。

D. 考察

[1] 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良

今年度は、亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いて調製した標準品原液及び高濃度標準品について、 -80°C で保存した場合の長期安定性試験を行った。標準品原液については、0、1、6 ヶ月において電気泳動像を確認し、亜硫酸系標準品原液は 2ME 系標準品原液と同様に安定であり、ロット間の差も無いことが示された。高濃度標準液については、0、3、6 ヶ

月(そばについては 8 か月)において、 25 ng/mL に希釈したものを各 ELISA キットに供し、吸光度を測定した。図 2 左には吸光度を示す。各標準品とも、測定毎に吸光度が若干異なっているが、これは標準品メーカー保存のマスターコントロール標準品においても同様であり、実験操作等に由来する変動と考えられる。図 2 右には、マスターコントロール標準品の吸光度に対する各標準品の吸光度の比を示す。亜硫酸系と 2ME 系で吸光度に若干差が見られる場合もあるが、吸光度は安定しており、ロット間の差も見られなかった。以上の結果から、亜硫酸系抽出液を用いて調製した標準品は 2ME 系抽出液を用いて調製した標準品と同様の安定性を有することが示された。

[2] 果実類検知 ELISA 法の開発

(1) キウイフルーツ検出法の開発

キウイフルーツ標準品の調製方法を検討し、2-D Quant kit によるタンパク質の定量と、SDS-PAGE による電気泳動像が得られ、規格化できるものと考えられた。また、 4°C 保存品には 10 ヶ月目までの吸光値は大きな上昇あるいは低下は認められず、比較的安定であると考えられた。今後、高濃度標準品の保存性も確認する必要がある。

また、抗アクチニジンモノクローナル抗体を使用したキウイフルーツ検知用 ELISA を構築し、二次抗体にはビオチン標識抗体、HRP 標識抗体いずれを使用することも可能であることが明らかとなった。一方、標識抗体によるモデル食品の回収率に差は見られなかったものの、ビオチン標識抗体の方が HRP 標識抗体よりも交差反応性を示す食品が少なく、この点については量標識間で差が認められた。しかし、HRP 標識抗体の方が ELISA のステップが少なく、検査に要する時間が少なく済むというメリットがあることから、現在、HRP 標識方法の見直しを行い、キット実用化の際には HRP 標識抗体を採用したいと考えている。

各種キウイフルーツおよび近縁種に対する反応性では、今回供試したグリーンキウイ(*A. deliciosa*)であるゼスプリグリーン(ハイワード)、ブルーノ、香緑、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)であるアップルキウイ、サルナシ(*A. arguta*)に高い反応性を示したが、ゴールドキウイ(*A. chinensis*)であるゼスプリゴールド(ホート 16a)、サンゴールド、紅鮮とマタタビ(*A. polygama*)に対する反応性は低かった。今回、キウイフルーツ検知法開発に当たり指標タンパク質にア