

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 13. 大腸菌で発現したブラックタイガーSCP の SDS-PAGE.

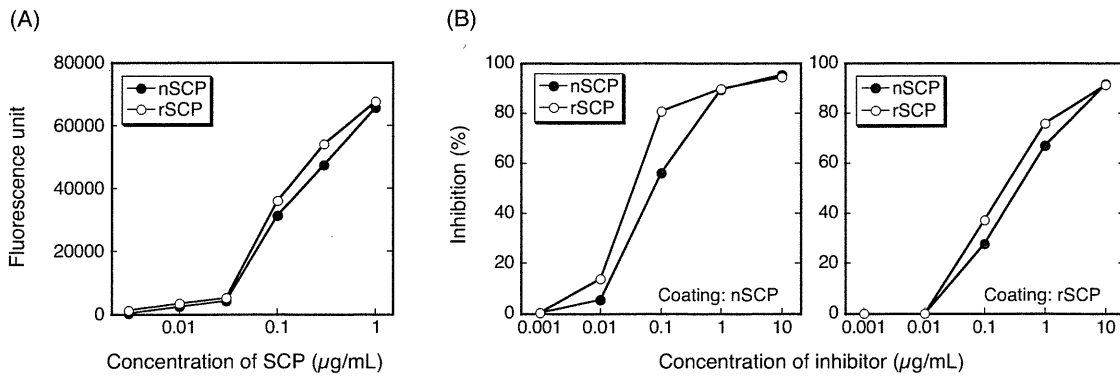


図 14. ELISA (A) および阻害 ELISA (B) によるブラックタイガーSCP の天然品 (nSCP) と組換え品 (rSCP) の IgE 反応性比較.

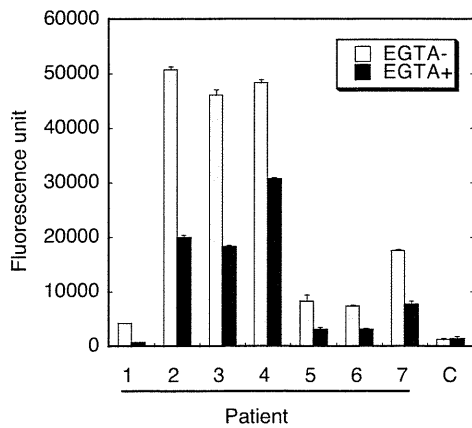


図 15. ブラックタイガーSCP の IgE 反応性に及ぼす EGTA の効果.

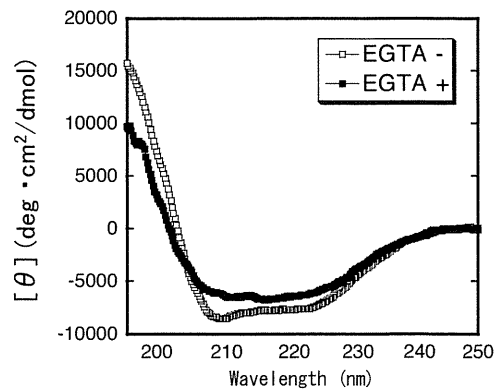


図 16. ブラックタイガーSCP の CD スペクトル.

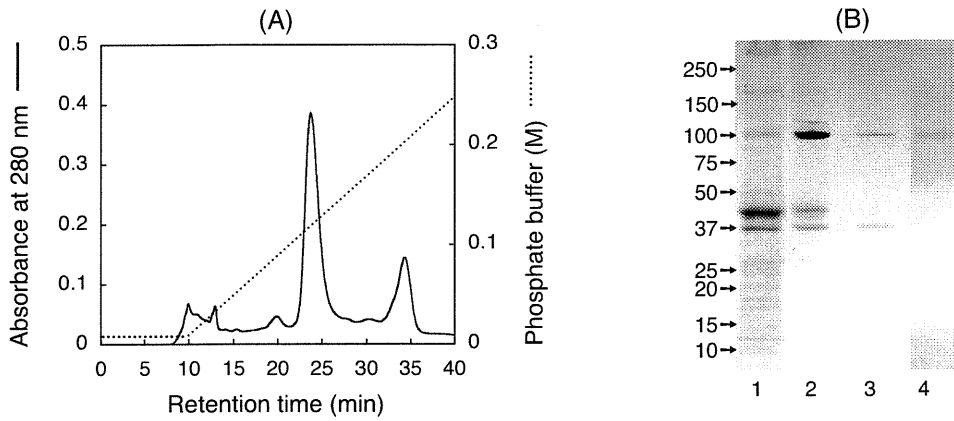


図 17. クロアワビからの 100 kDa アレルゲンのヒドロキシアパタイト HPLC による精製 (A) および SDS-PAGE による純度検定 (B).

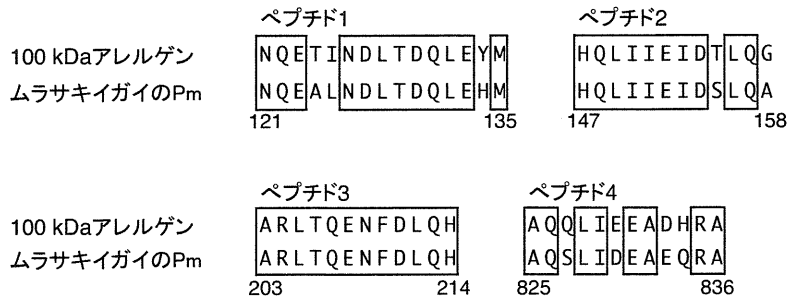


図 18. 100 kDa アレルゲンのリシルエンドペプチダーゼ分解で得られたペプチド 1-4 のアミノ酸配列とムラサキイガイパラミオシン (Pm) の対応する領域のアミノ酸配列.

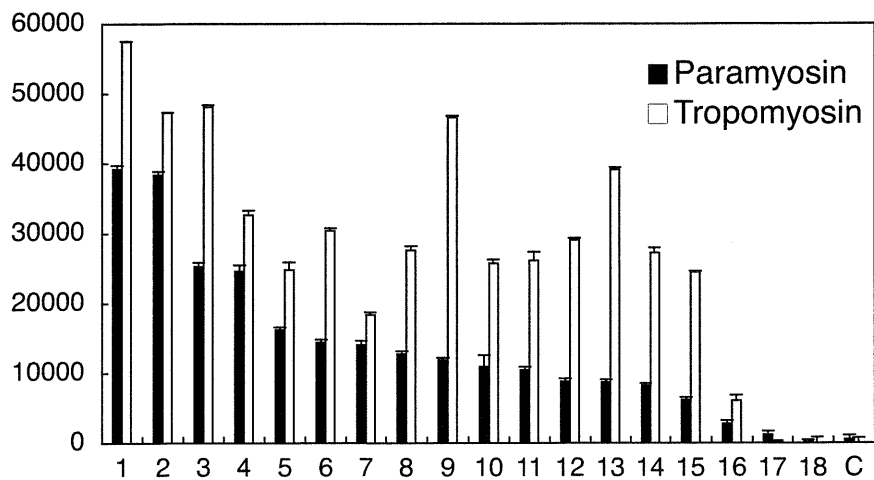


図 19. クロアワビから精製したパラミオシン (100 kDa アレルゲン) およびトロポミオシンの IgE 反応性 (蛍光 ELISA). 19 人の健常者血清で得られたコントロールデータ (C) を平均し、平均値+2SD を越える値を陽性と判断した.

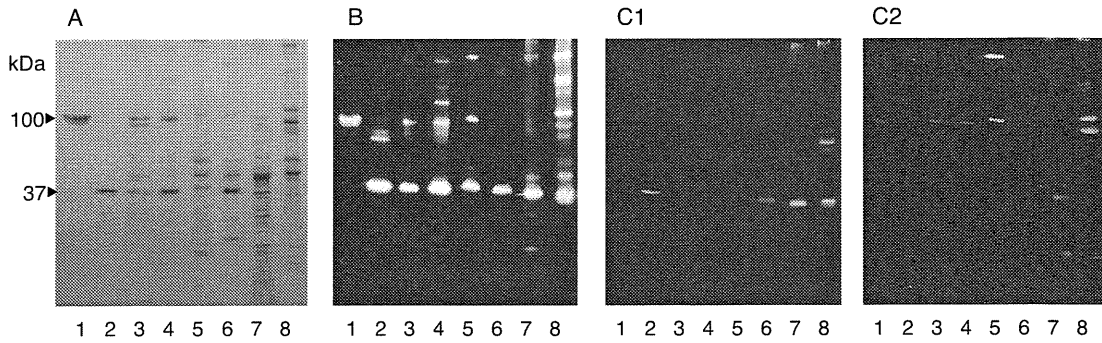


図 20. 6 種軟体動物の非加熱抽出液の SDS-PAGE (A), イムノブロッティング (B) および阻害イムノブロッティング (C) による分析. レーン: 1, クロアワビパラミオシン; 2, クロアワビトロポミオシン; 3, クロアワビ抽出液; 4, サザエ抽出液; 5, ムラサキガイ抽出液; 6, ホタテガイ抽出液; 7, スルメイカ抽出液; 8, マダコ抽出液.

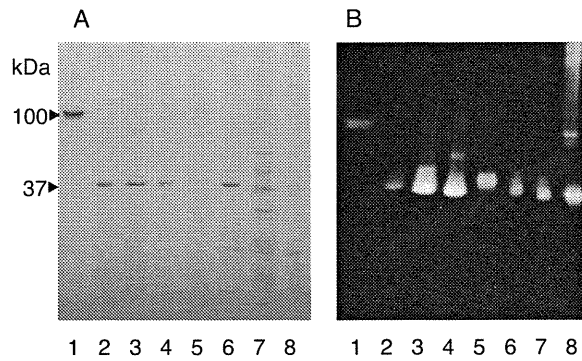


図 21. 6 種軟体動物の加熱抽出液の SDS-PAGE (A), イムノブロッティング (B) および阻害イムノブロッティング (C) による分析. レーン: 1, クロアワビパラミオシン; 2, クロアワビトロポミオシン; 3, クロアワビ抽出液; 4, サザエ抽出液; 5, ムラサキガイ抽出液; 6, ホタテガイ抽出液; 7, スルメイカ抽出液; 8, マダコ抽出液.

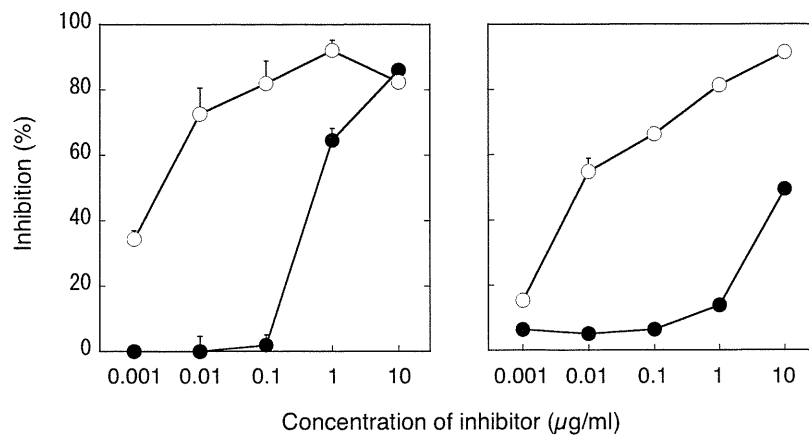


図 22. 阻害 ELISA によるクロアワビパラミオシンとクロアワビトロポミオシンの抗原交差性分析. 患者血清 10 人のプール血清と固相化したパラミオシン (左) またはトロポミオシン (右) との反応性に対するパラミオシン (●) またはトロポミオシン (○) の阻害効果を調べた. 患者血清 (1:100) を等量の阻害剤溶液と事前にインキュベートし, 一次抗体として用いた.

クロアワビ	MD--YGDVSSKVVRT-VSHRSYNYVYRGSSPATQNRLEARIRELEDALDTERDCRVRAEKNLAEITFYQYDQVADRLEEQ	75
ムラサキイガイ	SSLRLDSSRIVRHSSSSSEMLYQSLLMMDA	78
ヤケヒョウヒダニ	MSARTAKYMYRSSGAGASGDIS EY TDLGALTDKLSDES EMQIREK LQI VMSLSE A	77
ネッタイタマニクダニ	MAARSAKMYQSSRAGHGGDIS IEY TDLGALTDKLSDES ELQVREKSDVLMNLTE T	
アニサキス	MSDTLYRSPSMAIRSSADMGALTSMSVADLGLSLTDKLSQDFES ELNI RER DLSVLIALT QDA	79
クロアワビ	GGVTVQQIEINKKRESELNKVRKDLLEAVISHESAEASLRKRNQETINDLTDQLEYMTKQKNRVEKEKHQLIIEIDTLQ	155
ムラサキイガイ	M TSTTVS VSR A V SCAQF AT QNM R H AL H G S S A N S A	158
ヤケヒョウヒダニ	E SSESVT M D A L L DVHMES ETAHH QKH AAVHEMQ DQLQ A KSD QKFQA VFE LS	157
ネッタイタマニクダニ	E SSESVT M D A L L DVHMES ETAHH QKH AA QEMQ DQVQ A KSD QKFQA VFE LA	
アニサキス	ECA DS S R V S L L ESQLEN D MNV KH DVCL Y E I QLQ KNSK IDR RQR QH V IE TA	159
クロアワビ	MTDSLAKAKSSAESRADGLQGSVDRLKLQVDDL SRQL TDANSAKARLTQENFDLQHVQVEL DSANAALAKAKSQLQASND	235
ムラサキイガイ	N G Q S M D K I A E NS AA T N S LS G N A A ILC	238
ヤケヒョウヒダニ	QLETAN E LT LKSVKE EYT HE NIKIEE IN TVI LT H Q TE IKE H VKLQLDNANHL Q IAQGLE	237
ネッタイタマニクダニ	QVETAN D LV QKTVEK EYT HE NIKIEE IN TVVEVTAHRQ S SE IKE H YK I SLDNANHL G IAQGLE	
アニサキス	T I Q Q D HV KM QKFEEQQTIE SNK E NKHVN LAQQRQ QA S LAE I HDQVQLDN QHV Y AQGLE	239
クロアワビ	DLKRQLDDESRQRQLQVQFSQLQSGYDNLNARYEESESASTLRTQLSKVNAEFAALKARFEKELMAKSEALEELRRRL	315
ムラサキイガイ	N LAAI D N S A SLS TY TKYD Q E I	318
ヤケヒョウヒダニ	TRHR EE E K SS ENHAHT EVELS KVQLDD ARLE ER T A GDA SW SKY A Q HADEV KM	317
ネッタイタマニクダニ	TRHR E E K SS ENHAHT EVELS KVQLDD ARLE ER T A GDA SW SKY A Q HVDEV KM	
アニサキス	ESR R E AE E SQM A LH V LEL SVRVALD AARVEAEHK LA T I QW SK DA VALHH EV D KKM	319
クロアワビ	NTRI AQL EDECE TL RARNNL EKTAKL TAEIKEIT IELENTQ I IVQDLTKRNR TLENENGLQRRCDELGAEVSALRAE	395
ムラサキイガイ	S I K Q E T Q T C T N V R Q N N N E A A K D S NGQ N	398
ヤケヒョウヒダニ	AQK SEY EQL A LNKCSS Q SR QS VEVL IMD KAAAH A Q E VAQ KI LD KDKLE VTMLMEQAQK	397
ネッタイタマニクダニ	AQK SEY EQL A LNKCSA Q R QS VEVL IMD KATAHA A E VSQ KI LD KSKLE VSMLEQTKQD	
アニサキス	MQKQ EY EQ I IMLQKVSQ A R QS VEVL IVD KA NT IAI ERAKEQ KQVLEMKS I LV LE AQR	399
クロアワビ	KASLAEVHRLRVANAELTERNDNLQRENKNSDQLREAQLALKDANRELNELRQIRAQL EMERDSLASQLRDTEEALRD	475
ムラサキイガイ	N CA K A K A E AG QNA NNE A TI TALK N A	478
ヤケヒョウヒダニ	LRIKIG LQK QHEYEKVRDQR Q A K T D A K SQ N H RIH QE IE I KR N E SAAYKEA TLRKQ	477
ネッタイタマニクダニ	LRVKI DLQK QHEYEKLRDQKEA A K A D A K SQ N H RIH QE IE I KR N EE AAYKEA TLRKQ	
アニサキス	ARAAL LQKMKQLYEKAV QKEA A K Q D H NE A K H DLEN R AG IRD QVA KES A R	479
クロアワビ	AEGKLAQAALNQLRIDMENRLREKDEEIDNIRRSSARAEELQRTLIEVETRYKTEISRICKKYETDIRELEGALDNA	555
ムラサキイガイ	A SE Q S K D V	578
ヤケヒョウヒダニ	E A NQRL I E A V H Y K AQ EAL KQYQIE Q NMR A A AKL A L QAQ T LS A	577
ネッタイタマニクダニ	E A NQRL T E A T H Y K AQ E EAL KQYQIE Q NMR A A AKL VA L QAQ T LS A	
アニサキス	ARAQR L E Q V E R Q E MEAL K MQFE DR TAA ADA A M A A LR QAE A MTV L	579
クロアワビ	NKANAEYLKQIRSLQLRVKLEVLLEEERLADDLRGQLSISERKRIALQQEVEDVRSLLEAAERARKNAENELNDANAR	635
ムラサキイガイ	R K N NR LQ AT QL T N V TI L A H GEVTV	638
ヤケヒョウヒダニ	IDLQ T KKQA QIT QAHYD VH QLQAVD GVTQ RCQ A L EM IA Q S KRQ QLHEE VV	637
ネッタイタマニクダニ	IDLQ T KKQA QITG QAHYD VH QLQAVD GVTQ RCQ TA L EM VN Q L KRA QMHEE VV	
アニサキス	R L AQ T KKQSEQIQ QAN DTQ QLQQLTD YALAQ IS SA L ECKTA DN I Q AD EE HV	639
クロアワビ	LSELQIQVTALSNDKRRMEADISAMQSDLEDAINAQRAAEERADRLFNENVRLADELQEQENYKNAESLRKQLEIEIRE	715
ムラサキイガイ	T V L T A D L G QA VN R D	718
ヤケヒョウヒダニ	VN TT INVN ASA SKL SEF L A YDEVHKEL ISD VQK TI LKSTK L IE RLVKL TVK S Q V T	717
ネッタイタマニクダニ	VN TT INVN ASA SKL TEF L N YDEVHKEL ISD VQK TI VKSTK L ES TERVTKL TIK S T V N	
アニサキス	I D T S I NSN TAI NKL TEL TA A DEVTKELH D N ALADAA AVQ HE HSMKIDA S EQVKQ	719
クロアワビ	ITVRL EEA EFATREGKRMAKLQARIRDLEAELEAEQRRVREAFATSRKLERQYKEIQMQTEDDRRILAETMSINDQLS	795
ムラサキイガイ	Q Q I N D L A SA F N TVQASDE QV LT T T	798
ヤケヒョウヒダニ	LH I V N LAG VI ES V I V E R HA TEKML KDHRV LLL N E HKQIQLLQEMT K N	797
ネッタイタマニクダニ	LQI I V N LAG VI ES V I V E R HA TEKML KDHRV LLL N E HKQIQLLQEMS K N	
アニサキス	LQ QIQ A LLG VI ET VA DE T HK TQSAL KD RI V IDEEHKMFVMAQD TA RML	799
クロアワビ	MKVKYAKRR I EES EDVANL TMNKYRK AQQLE E EADHRA DMAEKNL VAVRRSRSMSVT RDVK I VRI	860
ムラサキイガイ	C T M A S I S D EQ Q T S E TR V V	864
ヤケヒョウヒダニ	E V MQ Q GMSQQNL TRV RF REL A ED Q S SF I AKHRSW T SQVPGGTRQVFTTQEETTNY	875
ネッタイタマニクダニ	E V MQ Q GMSQQNL TRV RF REL A ED Q S SF I AKHRSW T SQVPGGTRQVFTEQESSNF	
アニサキス	E LNIQ LG A AMTQNLQRV RY REL D EG Q SS NL I AKHRGT AVGKAT DVYV EED	869

図 23. パラミオシンのアミノ酸配列。クロアワビと同じアミノ酸残基はどつと (・) で示す。以前のリシルエンドペプチダーゼ分解により判明していた配列は□で囲ってある。

表 3. パラミオシンのアミノ酸配列相同率 (%)

動物	アミノ酸配列相同率 (%)				
	クロアワビ	ムラサキイガイ	ヤケヒョウヒダニ	ネッタイタマニクダニ	アニサキス
クロアワビ	100	70	35	34	33
ムラサキイガイ		100	35	35	35
ヤケヒョウヒダニ			100	89	50
ネッタイタマニクダニ				100	50
アニサキス					100

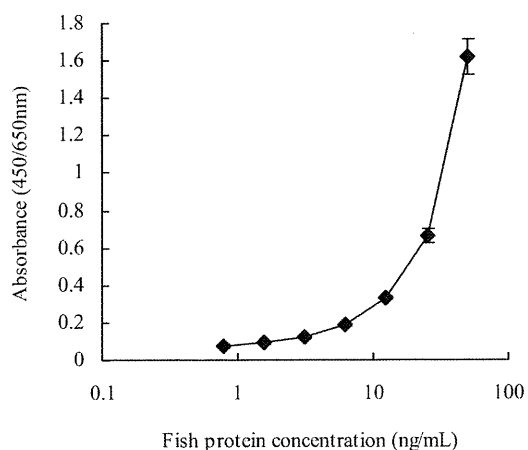


図 24. 魚類サンドイッチ ELISA の検量線.

表 4. 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 <sub>r</sub> , %)	室間精度 (RSD <sub>R</sub> , %)
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 5. 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
ナンプラー	<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	
シュウマイ	<1.0	
クリームコロッケ	<1.0	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 21-22 年度

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）

平成 23 年度

## 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）  
森山達哉（近畿大学）  
柴田治樹、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）  
上坂良彦、柴原裕亮（日水製薬株式会社）  
山田彰一（日本水産株式会社）  
清木興介、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、穉山浩、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]加工食品に含まれる甲殻類の実態調査、[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、[5]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、甲殻類の標準品について、タンパク質濃度及、電気泳動像、 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存時の安定性が現行の 2ME 系抽出液により調製した標準品とほぼ同等であることが示された。[2]キウイフルーツ標準品の調製及び保存に問題が無いこと、アクチニジンを標的とする ELISA 系の 2 次抗体としてビオチンあるいは HRP のどちらの標識も使用可能であることを示し、今後 HRP の標識方法等に検討を加え実用化を目指すこととした。また、リンゴ標準品を調製し、LTP を標的とする ELISA 系を構築した。今後 LTP 含有量の低い加工食品への対応を検討する。[3] 魚肉すり身を原料とする加工食品へのえび・かに混入の実態調査を行い、比較的高い割合でえび・かに混入しているがその含有量は少ないこと、ほとんどの場合はえびが混入していることを示した。[4]BIST による多品目同時検出、及び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であることを示した。[5]ゴマアレルギーである 11S グロブリンの全長にわたって患者 IgE と反応する部位が存在し、そのうちの 3 カ所は他種の 11S グロブリンでエピープであることが報告されている Allergenic Hot Spot であることを示した。

### 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、牛乳、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 (2ME)を含む抽出液が添付されており、検体(加工食品)からタンパク質抽出に使用されている。また、検量線作成用標準品や希釈液にも 2ME が含まれている。平成 20 年 6 月、2ME 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。そこで、

2ME に代わる還元剤として亜硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )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、標準品に関する検討、及び実際の加工食品の測定に関する検討を行った。また、今回のような定量検査法の改良は今後も必要に応じて行われるべきものと考えられる。そこで、このような状況に対応するための改良検査法の評価に関するガイドライン案を作成した。

### [2] 果実類検知 ELISA 法の開発

特定原材料に準ずるもの 18 品目のうち、果実類であるキウイフルーツ、リンゴ、及びバナナの定量的検出法の開発を目的として、ELISA法構築に関する検討を行った。

### [3] 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

魚肉すり身は、原料である魚が甲殻類を餌として摂取しているため、加工工程において甲殻類タンパク質が混入する可能性がある。我々はこれまでに魚介類加工食品へのえび・かにの混入に関する実態調査を行い、魚肉すり身 132 検体中 59 検体(44.7%)に甲殻類タンパク質が混入していることを報告している。本研究では、魚肉すり身を原料とする加工食品を対象としてえび・かにの混入に関する実態調査を行った。

### [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

現在、公的機関等では、特定原材料の表示監視目的で、消費者庁から示されている検査法(「アレルギー物質を含む食品の検査法について」平成 22 年 9 月 10 日 消食表第 286 号、以下通知検査法)に従った ELISA 法、ウェスタンブロット法、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を目的として上記の検査を行うことは、コスト面、設備面の問題から容易ではない。そのため、導入することが比較的容易で、安価、迅速、簡易な検出法の構築が重要である。そこで、このようなシステムの構築を目的とし、多項目同時解析ツールである BIST(Bead array in Single Tip)に関する検討、及び、蛍光偏光度測定に関する検討を行った。また食物アレルギー検査法のバリデーションプロトコルの国際的ハーモナイゼーションの会議に参加し検討を行った。

### [5]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、即時型食物アレルギー全国モニタリング調査において最近症例数が徐々に増加している要注意品目である。また海外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。11S グロブリ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

#### (1)標準品に関する検討

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。本研究では、現行の抽出液の組成のうち、「0.5% SDS及び2% 2ME」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て標準品を調製した。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2ME含有抽出液による抽出もを行い、亜硫酸ナトリウム含有抽出液との比較を行った。また、標準品規格に則り、標準品原液を、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測定により安定性を検討し、2ME系標準液の安定性について比較した。

#### (2)加工食品の測定に関する検討

2ME含有抽出液を用いるELISA系と亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いるELISA系を用いて、実際に加工食品中の特定原材料タンパク質の定量を行い、両者の定量結果を比較した。

#### (3)従来法と改良検査法の同等性評価のガイドライン案に関する検討

従来使用されている特定原材料定量検査法と、そ



の改良法との間で、検量線、定量値の相関、精度、検出限界・定量限界、特異性等を比較検討して従来法と改良法との同等性を示すためのガイドライン案を検討した。

## [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) 標準品に関する検討

キウイフルーツ(ヘイワード種)の皮果肉を凍結乾燥・粉砕して一次標準粉末とした。この粉末 1 g に抽出液(0.5 % SDS、2 % 2ME、0.5 M NaCl、10 µg/mL E64(プロテアーゼ阻害剤)、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後、遠心分離(10,000×g、30 分、4 °C)し、上清を、0.8 µm のフィルターでろ過した後、沸騰水で 10 分加熱した(ELISA 標的タンパク質であるアクチニジンがプロテアーゼであるため、失活操作を行った)。2-D Quant kit でタンパク質濃度を測定し、SDS-PAGE により電気泳動像を確認した。標準品原液を PBS で 10 倍希釈し、さらに 1 % BSA を含む PBST で 2 倍希釈したものを高濃度標準液とした。これを標準品希釈液で 50 ng/mL に希釈したものを標準溶液とした。この標準溶液を、-80°C、4°C および 37°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、保存性を検討した。

#### 2) ELISA に関する検討

抗アクチニジンモノクローナル抗体を調製し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。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。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 µg/g となるように一次標準粉末を添加し、未加熱、及び加熱処理したものについて測定した。また、卵、乳製品、肉類、米・麦類、豆類、種実類、果実類、魚介類、軟体動物・魚卵、藻類、香辛料、野菜・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。

グリーンキウイ(*Actinidia deliciosa*)のうち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*)のうちのゼスプリゴールド(ホート 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)について、ELISA 系における反応性を確認した。

### (2) リンゴ検出法の開発

#### 1) 標準品に関する検討

リンゴ(サンふじ)の芯を除き皮付きのまま凍結乾燥・粉砕して一次標準粉末とした。この粉末 1 g に抽出液(0.5 % SDS、2 % 2ME、0.5 M NaCl、100 mM Tris-HCl pH8.6) 20 mL を加え、キウイフルーツの場合と同様に抽出、遠心、ろ過したものを標準品原液とした。タンパク定量、電気泳動像の確認の後、キウイフルーツの場合と同様に高濃度標準液を調製した。これを、標準品希釈液で 50 ng/mL に希釈したものを標準溶液とした。

#### 2) ELISA に関する検討

抗 Lipid Transfer Protein (LTP)部分ペプチド-ウサギポリクローナル抗体、抗 LTP-ラットモノクローナル抗体、抗 LTP-マウスモノクローナル抗体を調製し、これらを組み合わせてサンドイッチ ELISA 系の検討を行った。オレンジジュース、ヨーグルト、ハムにリンゴタンパク質が 10 µg/g となるように一次標準粉末を添加したモデル食品(加熱品及び未加熱品)、及び市販食品 13 種類について、ELISA 系によりリンゴタンパク質濃度を測定した。

#### (3) バナナ検出法の開発

バナナアレルゲンである Class I キチナーゼ(以下 CIC)を還元カルボキシメチル化し、変性 CIC とした。BALB/c マウスに変性 CIC を免疫し、脾臓細胞とミエローマ細胞(P3X63Ag8.653)との細胞融合の後、限界希釈法によるクローニングを行った。

## [3] 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

魚肉すり身の加工食品として、ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げの 4 種について、それぞれ市販 12 製品を検体とした。通知検査法に従い、2 種類の ELISA キット(甲殻類キット「マルハ」((株)マルハニチロ食品製、以下 M キット)、FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬(株)製、以下 N キット))による定量検査、及び PCR による確認検査を行った。

## [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

#### (1) 特定原材料検査用 BIST に関する検討

BIST は異なる抗体を固定した 1mm 径ビーズを複数個キャピラリーに封入して作製した。特定原材料 7 品目について新たに抗体を作製し、7 品目同時測定について検討した。また、段階的にシグナル強度の異なるビーズを作製してコントロールビーズとし相対定量化についても検討した。

#### (2) 蛍光偏光法に関する検討

励起波長：485nm，測定波長：530nmにて蛍光偏光を測定した。FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体並びに KLH 結合リンゴ LTP ペプチドを PBS あるいは抗原抗体安定化剤 (Immuno Shot) で適宜希釈し、各 10  $\mu$ L ずつを 384 ウェルプレート内で混合し、37°Cにて蛍光偏光度を測定した。

(3) 食物アレルギー検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションの検討

2010年5月9日から12日にカナダのトロントで行われた 6th Workshop on Food Allergen Methodologies に参加し、講演と議論を行った。

#### [5]ゴマアレルギーの解析

種子ゴマ、洗いゴマ、煎りゴマについて、それぞれ黒ゴマ、白ゴマ、金ゴマの市販品を購入した。ミルサーで粉碎し、0.6M ショ糖含有 10 mMリン酸バッファー(pH 7.5)中でホモジナイズし、ろ過後、10,000  $\times$  g、15分遠心し、得られたペレットを Milli-Q に懸濁してソニケーションした。再遠心後得られた上清を抽出タンパク質溶液とした。非還元条件下電気泳動し、タンパク質染色及びウェスタンブロッティングを行った。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。

白ゴマ未熟種子を富山大学 山本将之先生よりご供与頂き、11S グロブリンアイソフォーム 1 及び 2 の cDNA を得た。それぞれ全長をカバーする 3 種のフラグメント(20-30aaのオーバーラップあり)を発現するベクターを調製し、各フラグメントを GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させた。不溶性タンパク質として発現させた各フラグメントを粗精製し、患者血清を用いたウェスタンブロッティングを行った。

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。この膜上スポットと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。

### 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

(1) 標準品に関する検討

各特定原材料一次標準粉末から調製された標準

品原液のタンパク定量の結果を表1に示す。(卵については2ロットについて検討した。)2ME系抽出液と亜硫酸系抽出液の場合で大きな差は見られなかった。またSDS-PAGE電気泳動像についても泳動パターンに大きな差は見られなかった。

標準品原液及び高濃度標準液を-80°Cにて保存しその安定性を検討した。標準品原液については0、1、6ヶ月における電気泳動像を確認したところ、2ME系標準品と同様に亜硫酸系標準品についてもパターンに大きな変化はなく、安定であることが示された。高濃度標準品については、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1に示す。左に、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。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系の吸光度はほぼ同様の挙動を示し、高濃度標準液の安定性が示された。

(2) 加工食品の測定に関する検討

2ME含有抽出液を用いるELISA系、及び亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いるELISA系を用いて、加工食品中の特定原材料の定量を行い、両者の結果を比較した。図2に両ELISA系の測定結果の相関(例)を示す。横軸は2ME系での測定値(ppm)、縦軸は亜硫酸系での測定値(ppm)を示す。両測定結果間の近似直線( $Y=aX$ )を求めた結果、直線の傾きは、0.8-1.1の範囲に入り、良好な相関が見られた。

(3) 従来法と改良検査法の同等性評価のガイドライン案に関する検討

上記の結果も考慮に入れ、アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン案を作成した(別紙参照)。検討項目としては、検量線、従来法との相関、精度、検出限界・定量限界、特異性とし、それぞれの検討内容及び基準を設定した。

#### [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) 標準品に関する検討

標準品原液のタンパク質濃度は 1.7~2.3 mg/mL であった。保存試験の結果、37°Cでは 90 日以降吸光値の低下がみられたが、4°Cでは 10 ヶ月まで、-80°Cと比較して吸光値の大きな変化は認められな

かった。

## 2) ELISA に関する検討

アクチニジンに対する 26 種のモノクローナル抗体より抗体を選択し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。2 次抗体としてビオチンおよび HRP 標識抗体を用いたところ、キウイフルーツタンパク質 50 ng/mL から 0.78 ng/mL の範囲で測定可能であった。またビオチンおよび HRP 標識抗体を用いて、モデル食品であるお汁粉(キウイフルーツタンパク質 10 µg/mL 含有)を測定したところ、測定値はそれぞれ 6.1-7.8 µg/mL、6.1-7.3 µg/mL となり、同等の結果となった。188 種類の各種食品(卵、乳製品、肉類、米・麦類、豆類、種実類、果実類、甲殻類、魚介類、野菜・きのこ類、軟体動物・魚卵、藻類、香辛料、増粘多糖類・その他)に対する交差反応性を検証したところ、ビオチン標識抗体の場合は交差反応性を示す食品は 10 種類、そのうち 1 µg/mL 以上の値を示したものは 4 種類あり、青海苔の 1.9 µg/mL が最大であった。HRP 標識抗体の場合は交差反応性を示すものは 57 種類、そのうち 1 µg/mL 以上の値を示したものは 21 種類あり、カレイの 2.9 µg/mL が最大であった。

各種キウイフルーツおよび近縁種に対する反応性の検討結果を図 3 に示した。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。

## (2) リンゴ検出法の開発

### 1) 標準品に関する検討

標準品原液のタンパク質濃度は、273 µg/mL であった。タンパク質濃度が低いことから、SDS-PAGE では LTP の明確なバンドを得られなかった。

## 2) ELISA に関する検討

抗 LTP 抗体の組み合わせについて検討し、2 次抗体、1 次抗体をそれぞれマウス MAb 7D と 12E、7D と 12H とする 2 種類の組み合わせで ELISA を構築した。リンゴタンパク質(10 µg/mL)含有モデル食品について測定したところ、2 通りの抗体の組み合わせで、測定値はそれぞれ 6.4-12.7 µg/mL、6.5-13.2 µg/mL となり、良好な結果が得られた。市販食品については、皮付きの商品(リンゴチップ等)では 20 µg/g 以上となったが、リンゴジュースではタンパク質 0.1 %と栄養表示されていたが測定結果は 17~18

µg/g 程度となった。果肉のみを含有する商品(リンゴヨーグルト等)では検出限界以下となった。

### (3) バナナ検出法の開発

変性 Class I キチナーゼ(CIC)をマウスに免疫することにより、現在までに抗変性 CIC モノクローナル抗体を 2 種類確立した。

## [3] 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

魚肉すり身製品の代表的な加工方法である“焼く”、“ゆでる”、“蒸す”、“揚げる”にそれぞれ対応する製品として、ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げ、それぞれ12種類を検体とした。各検体から抽出した DNA に関しては、濃度、精製度ともに良好であった。検査結果を表2に示す。ELISA法では0.313 µg/g以下を不検出(N.D.)とした。ちくわについては、ELISA法では全48検体中36検体、えびPCRでは35検体、かにPCRでは1検体が陽性であった。

## [4] アレルギー物質を含む食品の迅速・簡便な定量的検出法の開発

### (1) 特定原材料検査用 BIST に関する検討

各ビーズ上で特異的な抗原抗体反応が起きており、7 項目同時検査の可能性が示唆された。えび・かに検出用にコントロールビーズも共に封入した BIST を作製し、両者とも 10 µg/g を測定できた。

### (2) 蛍光偏光法に関する検討

抗体濃度については FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体の 10,000 倍希釈(1nM)が良好であった。リンゴ LTP-KLH 濃度と蛍光偏光度の関係について検討したところ、保温時間は 30 分以上必要であった(図 4A)。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、リンゴ LTP-KLH の低濃度における蛍光偏光度が増大した(図 4B)。

### (3) 食物アレルギー検査法のバリデーションプロトコールのハーモナイゼーションの検討

Canada, USA, EU, Australia、日本の国際コミュニティの中で食物アレルギー検査法のバリデーションプロトコールのハーモナイゼーションを検討し、卵と牛乳の検出法に関して国際的な指針を確立した。

## [5] ごまアレルギーの解析

ゴマタンパク質を抽出して電気泳動を行ったところ、50 kDa 付近に 11S グロブリンのバンド 2 本、15 kDa 付近に 2S アルブミンのバンド 2 本が確認された。患

者血清を用いたウェスタンブロッティングにおいて、ゴマ負荷試験陽性患者血清中の IgE 抗体は、11S グロブリン、2S アルブミンに強く結合した。

11S グロブリンのアイソフォーム 1(438aa)とアイソフォーム 2(474aa)をそれぞれ 3 つのフラグメントに分割して(フラグメント間で 20-30aa のオーバーラップあり)発現させ、患者血清との反応性を検討した。その結果、アイソフォーム 1, 2 とも全てのフラグメントに対して患者血清の反応性が確認され、3 種のフラグメントの全てにエピトープとなり得るアミノ酸配列が存在する可能性が示された。

次に、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 5 に示す。負荷試験陽性(強い症状)の患者の血清の場合、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)及び負荷試験陰性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 6 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。太斜字部分が図 5 において患者血清と強い反応性を示した部分である。これらの結果より、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

#### (1) 標準品に関する検討

亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた標準品原液に関してタンパク質濃度及び電気泳動像を検討した結果、2ME 系標準品と概ね同等の結果が得られた。標準品原液及び高濃度標準品について -80℃ で保存した場合の長期安定性試験を行った。電気泳動像より、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。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。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については、亜硫酸系と 2ME 系で若干差が見られる場合もあるが、数値は安定しており、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) 加工食品の測定に関する検討

実際に特定原材料を含有する加工食品を対象として、2ME 系 ELISA キットによる測定値と亜硫酸系 ELISA キットによる測定値との相関について検討した。近似直線の傾きは 0.8-1.1 の範囲に入り、両 ELISA 系の測定値はほぼ同等であることが示された。

#### (3) 従来法と改良検査法の同等性評価のガイドライン案に関する検討

本ガイドライン案が改良検査法の評価法として認められた際には、特定原材料の定量検査法について、偽陽性反応等に対応するための改良が現在と比較してより円滑に行われるようになり、ELISA キットによる検査の正確性の向上、ひいては食物アレルギー患者の安全確保につながるものと考えられる。

## [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) 標準品に関する検討

アクチニジンがシステインプロテアーゼであるため、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64 の添加、及び、アクチニジンを完全に失活させるための抽出後の加熱処理を行い、安定した標準品の作製が可能となった。4℃ 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。

#### 2) ELISA に関する検討

抗アクチニジンモノクローナル抗体を使用した ELISA を構築し、モデル加工食品からの回収率が、通知検査法の基準範囲に収まったことから、本 ELISA 系の定量検査法としての有用性が示された。二次抗体としてはビオチン標識抗体の方が交差反応性を示す食品が少なかったが、HRP 標識抗体の方が ELISA のステップが少ないというメリットがあることから、今後 HRP 標識方法等の見直しを行い、最終的には HRP 標識抗体を採用する予定である。

グリーンキウイ(*A. deliciosa*)であるゼスプリグリーン

(ヘイワード)、ブルーノ、香緑、ゴールドキウイ (*A. chinensis*) 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。*A. chinensis* の一部でアクチニジン濃度が低いと報告されており、そのために本 ELISA 系における反応性が低かったと考えられる。

### (2) リンゴ検出法の開発

加工品用リンゴの約 90% はジュース用である。リンゴジュースは、除芯後、皮付きのままクラッシャーで破碎され、搾汁機にかけられ原果汁にされる。つまり、リンゴは皮を含み加工原料として使用されることが多いと考えられたことから、耐熱性、耐ペプシン消化性があり、果皮に比較的多く含まれるアレルギーである LTP を ELISA の指標とすることとした。リンゴタンパク質を 10 µg/g 含有するモデル食品の添加回収試験では回収率が 50~150 % の範囲に入ることが確認され、本検出系の有用性が示された。

しかし、リンゴを原材料に含む市販食品を検査した結果、皮付きのリンゴチップではリンゴタンパク質が検出されたが、リンゴジュースでは想定される値よりも低いものとなった。さらに、皮が付いていない製品ではリンゴを検出することができなかった。これは LTP が皮に比較的多く含有されるタンパク質であるためと考えられる。上記の結果より、LTP を指標とした ELISA 系では、市販食品にリンゴが混入していても検出できない場合がある可能性が示唆された。

### (3) バナナ検出法の開発

本研究において抗変性 CIC モノクローナル抗体を 2 種類確立した。今後は、モノクローナル抗体の種類をさらに増やすとともに、現在までに作製した抗体との組み合わせを検討し、バナナ検出用 ELISA の開発を進める。また、他の植物由来キチナーゼとの交差反応性についても検証する。

## [3] 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

ちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げの 4 種の魚肉すり身加工食品において、ELISA 法陽性率は比較的高かった。しかしタンパク質含有量としては少ないものがほとんどであった。PCR 法で陽性となったものはほとんどがえびであり、かに PCR 法で陽性となったのはさつま揚げ 1 検体のみであった。

本研究に用いた検体中、原材料欄に魚体の小さい魚が記載されていた 15 検体 (C-2、C-7、C-9、C-12、H-4、K-1、K-2、K-4、K-7、K-8、K-9、K-11、

K-12、S-1、S-9) では陽性となった割合は 87% (13 検体) であり、原材料欄に魚体の大きい魚のみが記載されていた 9 検体 (C-8、C-11、H-2、H-5、H-8、H-11、H-12、K-10、S-8) では 44% (4 検体) であった。この差は魚体の大きさによる加工工程での消化管内容物混入の違いを反映していると考えられる。

## [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

### (1) 特定原材料検査用 BIST に関する検討

BIST の特長を活かした小型の全自動測定装置を使用することで、従来の ELISA 法より迅速で簡便な検査の実現が期待できる。今後、様々な市販食品を用いた検証実験を進め、特定原材料等の簡易検査法として確立させたいと考えている。

### (2) 蛍光偏光法に関する検討

FITC 標識抗リンゴ LTP 抗体と KLH 結合リンゴ LTP ペプチドの相互作用を用いて、蛍光偏光度で解析することは可能と考えられた。今後、測定結果の CV 値の低下が課題と思われる。

### (3) 食物アレルギー検査法のバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションの検討

食物アレルギー表示の閾値を設定をしているのは世界でわが国のみであり、この閾値の設定がわが国のアレルギー表示の適正化が進んでいる要因と国際的に評価されている。

## [5] ごまアレルギーの解析

ゴマアレルギー患者の血清のゴマタンパク質に対する反応性の検討を行い、血清がゴマ 11S グロブリンに強く反応することを示した。11S グロブリン アイソフォーム 1 及び 2 の全長を 3 個に分割したフラグメントについて検討した結果、全てのフラグメントに対して患者血清が反応したことから、それぞれのフラグメントにエピトープが存在することが示唆された。11S グロブリンの全長をカバーするペプチドの SPOTs 膜を作成して検討したところ、負荷試験陽性 (強い症状) の患者血清と強い結合性を示す配列が分子全体にわたって 8 カ所検出された。負荷試験陽性 (弱い症状) 及び陰性の患者血清では、結合性は弱いながらもほぼ同様の部位に反応することから、症状の有無や強弱と上記 8 カ所の配列には特に相関関係はなく、エピトープとなりやすい部位に対する抗体が産生されているものと考えられる。

11S グロブリンについては、これまでに、6 種 (カシューナッツ、クルミ、ヘーゼルナッツ、大豆 2 種、ピーナ

ツ)の11Sグロブリンのエピトープの比較により、エピトープとなりやすいAllergenic Hot Spotと呼ばれる配列が報告されている。Hot Spot No.1-3については、SPOTs膜解析において患者血清との反応性を示した部位と一致しているが、Hot Spot No.4については一致しなかった。Hot Spot No.3は上記6種の11Sグロブリン全てにおいてエピトープと同定された部位である。また、No.1、2、4は6種のうち4種においてエピトープと同定された部位である。3カ所のHot Spotが本研究におけるゴマ11Sグロブリンに関するSPOTs膜解析の結果と一致したことは非常に合理的な結果であり、今後エピトープ解析を進めていく上で大変有用な知見である。

## E. 結論

### [1] 特定原材料 ELISA キット用タンパク質抽出液の改良

特定原材料 ELISA キットにおいて使用するタンパク質抽出液について、毒物に指定された 2ME を含有する従来の抽出液に代わるものとして、亜硫酸ナトリウム含有抽出液に関する検討を行った。標準品原液のタンパク質濃度及び SDS-PAGE 電気泳動像は 2ME 系抽出液を使用した場合と亜硫酸系抽出液を使用した場合でほぼ同等であった。標準品原液及び高濃度標準品について  $-80^{\circ}\text{C}$  保存時の安定性を検討した結果、2ME 系抽出液を用いて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。加工食品を検体とし、2ME 含有抽出液を用いた場合の ELISA の測定値と亜硫酸ナトリウム含有抽出液を用いた場合の測定値とを比較したところ、両者の相関を示す近似直線の傾きは 1 に近い値となり、両系においてほぼ同等の測定結果が得られることが示された。

また、今回のような特定原材料定量検査法の改良に対応するため、従来法と改良検査法との同等性を評価するガイドライン案を作成した。

### [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

キウイフルーツ標準品を調製し、 $4^{\circ}\text{C}$  で安定であることを示した。抗アクチニジンモノクローナル抗体を用いたキウイフルーツ検出用 ELISA を構築し、モデル加工食品の測定したところ良好な結果が得られた。2 次抗体としてビオチン標識抗体及び HRP 標識抗体について検討し、どちらの系も機能することが確

認された。各種食品に対する交差反応性の検討において、HRP 標識抗体の方がビオチン標識抗体に比べ交差する品目が多かったことから、HRP の標識方法などの見直しが必要と考えられた。アクチニジン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。

#### (3) バナナ検出法の開発

バナナ検出用 ELISA を構築するため、抗変性 CIC モノクローナル抗体を 2 種類確立した。

### [3] 加工食品に含まれる甲殻類の実態調査

魚肉すり身を原料とする加工食品であるちくわ、はんぺん、かまぼこ、さつま揚げ、合計 48 検体について、ELISA 法および PCR 法についてえび・かに混入の実態調査を行った。ELISA 法で陽性となったものは 36 検体 (75%) であったが、タンパク質濃度は比較的低かった。PCR 法で陽性となったものは 36 検体 (75%) であり、35 検体はえび、1 検体のみかにであった。以上の結果から、魚肉すり身を原料とする加工食品には比較的高い割合で甲殻類が混入しているが、その含有量は少ないこと、ほとんどの場合はえびが混入していることが示された。

### [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

BIST による多項目同時測定の見直しを行い、 $10\ \mu\text{g/g}$  のタンパク質を検出可能であることが示された。今後は安価、迅速、簡易な検出システムの構築を目指す。蛍光偏光度測定によるリンゴアレルゲンの簡易検出は可能と考えられたので、今後市販食品の検討を行う。

また、国際的なアレルギー検査法及びバリデーションプロトコルのハーモナイゼーションに関しては、今後も引き続き検討に積極的に参加する。

### [5] ごまアレルゲンの解析

ゴマ抽出タンパク質の電気泳動像から、種子ゴマ、洗いゴマ、煎りゴマについて、また種皮色の違いである白、黒、金について、タンパク質の発現パターンに大きな違いはないことが示された。主要アレルゲンである 2S アルブミンの他に、タンパク量として最も多いアレルゲンである 11S グロブリンにも患者 IgE が強く反応することが示された。11S グロブリンアイソフォーム 1 及び 2 を 3 個に分割したフラグメントを調製

し、患者血清との反応性を検討した結果、11Sグロブリンのエピトープはタンパク質全長にわたって複数存在することが示唆された。11S グロブリンの全長をカバーする SPOTs 膜を用いて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。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 論文発表

- 1) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Doi H, Shibata H, Urisu A. Determination of walnut protein in processed foods by enzyme-linked immunosorbent assay: Interlaboratory study. J AOAC Int. 93(4), 1255-1261 (2010).
- 2) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Morishita N, Matsumoto T, Urisu A. Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for the determination of soybean protein in processed foods: Interlaboratory evaluation. J AOAC Int. 93(1), 243-248 (2010)
- 3) Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Teshima R. Japanese Regulations and Buckwheat Allergen Detection. Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists, (Ed. Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K) John Wiley & Sons, Inc. (2009)
- 4) 酒井信夫、安達玲子、中村厚、柴原裕亮、上坂良彦、清木興介、織田浩司、穂山浩、手島玲子、いわゆる健康食品に含まれる甲殻類様タンパク質の実態調査. 日本食品化学学会誌 16(3), 118-122 (2009)
- 5) 穂山浩、安達玲子、手島玲子、食物アレルギーについて. 都薬雑誌、31(10), 18-22 (2009)
- 6) 安達玲子、酒井信夫、穂山浩、手島玲子、アレルギー物質を含む食品の表示と検査法 ―えび、かこの表示義務化―. 食品衛生学雑誌 50(3), J225-230 (2009)
- 7) 安達玲子、酒井信夫、穂山浩、手島玲子、特定原材料えび・かこの表示と検査法について. 食品衛生研究 59(4), 7-14 (2009)
- 8) 穂山浩、安達玲子、手島玲子、アレルギー検査法の新たな開発状況. 臨床免疫・アレルギー科 51(4), 363-370 (2009)
- 9) Taguchi H, Watanabe S, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Sakata K, Urisu A, Teshima R, Differential detection of shrimp and crab for food labeling using polymerase chain reaction. J. Agric. Food Chem. 59, 3510-9 (2011)
- 10) Akiyama H, Imai T, Ebisawa M, Japan Food Allergen Labeling Regulation – History and Evaluation, Advances in Food & Nutrition Research, 62,139-71 (2011).
- 11) Sakai Y., Ishihata K., Nakano S., Yamada T., Yano T., Uchida K., Nakao Y., Urisu A., Adachi R., Teshima R., Akiyama H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, J Agric Food Chem., 58, 8145-8151 (2010)
- 12) Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B, Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M, Wehling P, Taylor S.L, Poms R.E, Delahaut P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, J.AOAC Int., 93, 442-450 (2010)
- 13) 中村厚, 酒井信夫, 川浦知子, 小林政人, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子, すり身およびその加工食品中に自然混入する甲殻類の実態調査, 日本食品化学学会誌, 17, 213-220 (2010)
- 14) 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)
- 15) 安達玲子, アレルギー物質を含む食品の検査法, 食品衛生学雑誌, 51, J-359-361 (2010)
- 16) 穂山浩, 安達玲子, 手島玲子, アレルゲン解析と検知法, ぶんせき, 8, 397-404 (2010)
- 17) 穂山浩, 未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究, 食品衛生学雑誌, 51, J-411-414 (2010)
- 18) 穂山浩, 食物アレルギー解析の進歩, 小児科診療, 63, 2423-2432 (2010)
- 19) Watanabe S, Taguchi H, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Urisu A, Teshima R, Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. J.

Agric. Food Chem., in press.

20) 安達玲子、穉山浩、手島玲子、アレルギー物質を含む食品の表示制度と検査法 保健の科学 53, 777-80 (2011)

21) Sakai Y, Kotoura S, Yano T, Kurihara T, Uchida K, Miyake K, Akiyama H, and Tanabe S, Quantification of Pork, Chicken and Beef using a Novel Reference Molecule. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 1639-43 (2011).

22) Suzuki A, Nguyen HPD, Nakamura K, Akiyama H\*, Kasahara Y, Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. Jpn. J. Food Chem. Safety 18, 18-24 (2011)

#### 学会発表

1) Adachi R, Sakai S, Akiyama H, Teshima R, Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Urisu A. Interlaboratory validation of PCR methods for the detection of shrimp and crab in processed foods. 123rd AOAC Annual Meeting and Exposition (2009. 9)

2) Taguchi H, Watanabe S, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Teshima R. PCR methods for differential detection of allergenic shrimp and crab. 123rd AOAC Annual Meeting and Exposition (2009. 9)

3) 安達玲子、酒井信夫、穉山浩、手島玲子、田口大夢、渡辺聡、平尾宜司、特定原材料えび・かきを検知する特異的定性 PCR 法の妥当性確認 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009. 5)

4) 伊東花織、小山由利子、渡邊恵理子、鶴間理恵子、山本貴之、加藤正俊、本庄勉、安達玲子、穉山浩、手島玲子、新抽出液を用いた特定原材料タンパク質の測定 第97回日本食品衛生学会学術講演会 (2009. 5)

5) 鶴間理恵子、渡邊恵理子、伊東花織、小山由利子、山本貴之、加藤正俊、本庄勉、安達玲子、穉山浩、手島玲子、イムノクロマト法を用いた加熱加工食品中の特定原材料タンパク質測定について 第 15 回日本食品化学学会総会・学術大会(2009.5)

6) 酒井信夫、安達玲子、穉山浩、手島玲子、いわゆる健康食品中に含まれる甲殻類タンパク質の実態調査 第 15 回日本食品化学学会総会・学術大会 (2009.5)

7) 秋田涼子、小泉大輔、織田浩司、清木興介、酒

井信夫、安達玲子、穉山浩、手島玲子、イムノクロマト法による甲殻類原材料検出キットの開発 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009. 10)

8) 小泉大輔、清木興介、織田浩司、中村健人、酒井信夫、穉山浩、安達玲子、手島玲子、加工食品中に混入する甲殻類タンパク質について 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009. 10)

9) 安達玲子、酒井信夫、中村厚、穉山浩、手島玲子、魚肉すり身を原材料とする加工食品に含まれる甲殻類の実態調査 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会(2009.11)

10) 橋本博之、中西希代子、眞壁祐樹、宮本文夫、長谷川康行、安達玲子、穉山浩、手島玲子、特定原材料検査における海苔製品からの DNA 抽出法の検討 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会 (2009.11)

11) 中村厚、佐藤里絵、安達玲子、手島玲子、ソバ 16kDa アレルゲンに対するサンドイッチ ELISA 系の構築 日本薬学会第 130 年会(2010.3)

12) 安達玲子、アレルギー物質を含む食品の表示と検査法について 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会シンポジウム(2009.11)

13) 安達玲子、アレルギー表示の検査法 日本食品衛生学会第 12 回特別シンポジウム(2010.1)

14) 澤田絵理奈、近藤武晴、矢野えりか、森山達哉、河村幸雄「リンゴのアレルゲンレベルの品種間差違の検討:低含有品種の探索」 2009 年度(第 48 回)日本栄養・食糧学会近畿支部大会(京都)(2009.9)

15) Akiyama H., The Regulatory Situation in Japan—Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food—, Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies (2010.5)

16) 中村厚、酒井信夫、川浦知子、安達玲子、穉山浩、手島玲子、魚肉すり身およびその加工食品に含まれる甲殻類の実態調査 日本食品化学学会第 16 回総会・学術集会(2010. 6)

17) 田口大夢、渡辺聡、平尾宜司、酒井信夫、中村厚、安達玲子、穉山浩、手島玲子 エビおよびカニの識別検出 PCR 法の特異性について 日本食品化学学会第 16 回総会・学術集会(2010. 6)

18) 安達玲子、アレルギー物質を含む食品の検査法について 生物化学的測定研究会第 15 回学術集会(2010. 6)

19) 平尾宜司、田口大夢、渡辺聡、天明裕介、穉山浩、酒井信夫、安達玲子、渡邊敬浩、松田りえ子、手島玲子、PCR 法による食物アレルゲン検出技術



日本食品工学会第 11 回大会 (2010. 8)

20) 安達玲子, アレルギー食品の表示制度と通知検査法/「えび・かに」の実態調査 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会技術研修会 (2010. 9)

21) Ito K, Yamamoto T, Doi H, Shoji M, Kato M, Akiyama H, Adachi R, Novel ELISA for determine food allergen in processed food. 124th AOAC Annual Meeting and Exposition (2010. 9)

22) 安達玲子, アレルギー物質を含む食品の検査法と表示制度の動向について 日本水産学会水産利用懇話会平成 22 年度第 2 回講演会 (2011.2)

23) 岡崎史子、山口友貴絵、土井香苗、安達玲子、成田宏史、モモアレルゲン表示に用いる免疫学的評価系の確立 第 65 回日本栄養・食糧学会大会 (2011.5)

24) 橋本博之、本郷猛、中西希代子、宮本文夫、石井俊靖、安達玲子、穠山浩、手島玲子、特定原材料検査における海苔製品中のえび・かに DNA 検出法の検討 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会 (2011.5)

25) Adachi R, Akiyama H, Teshim R, Reference materials for food allergens used in ELISA kits in Japan. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011. 9)

26) Adachi R, Sakai S, Nakamura A, Akiyama H, Urisu A, Teshima R, A novel protein extraction method for ELISA to determine food allergens in processed foods. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011. 9)

27) 岡崎史子、山口友貴絵、安達玲子、成田宏史、モモアレルギー表示に向けた免疫学的評価系の確立 —Lipid Transfer Protein をターゲットとして— 第 50 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (2011.10)

28) 橋本博之、本郷猛、中西希代子、宮本文夫、石井俊靖、安達玲子、穠山浩、手島玲子、特定原材料検査における海苔製品中のえび・かに DNA 検出法の検討(第 2 報) 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11)

29) 穠山浩, 食物アレルギーについて, 第6回健康長寿長野研究会シンポジウム, (2012.1)

30) Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. America Chemical Society National Meeting & Exposition (2012.3)

## H.知的財産権の出願・登録状況

特許：特許第 4841494 号 (特願 2007-101121) 清木興介、織田浩司、吉岡久史、穠山浩、米谷民雄  
「食品中タンパク質の高感度検出法」

(別紙)

## アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン(案)

試験室間バリデーションによりその性能が評価され、通知に示す基準を満たすことが示されている定量検査法(あるいはこれと同等と認められた方法)(従来法)に改良を加えた定量検査法(新検査法)については、単一試験室での検討において以下のような性能を評価し、従来法と同等であることを示した場合には、従来法と同様にアレルギー物質を含む食品の検査方法として使用することが認められるものとする。

### (1) 検量線

新検査法の検量線の濃度範囲および定量性が従来法と同等であることを示す。

### (2) 従来法との相関

複数の試料について、従来法と新検査法を用いて定量し、新検査法が従来法と同等であることを示す。

具体的には、X軸に従来法による定量値、Y軸に新検査法による定量値をとり、その相関をプロットする。このプロットについて、Y切片をゼロとする近似直線( $Y=aX$ )を算出し、その傾きが0.75-1.25の範囲であること、相関係数が0.9以上であることを示す。

検査方法1種類につき、定量値が数 $\mu\text{g/g}$ から10,000  $\mu\text{g/g}$ 程度の範囲に偏ることなく分布する試料(但し対象濃度範囲における試料確保が困難な場合には10,000  $\mu\text{g/g}$ を超える試料を含んでもよい)について10種以上の検討を行い、従来法と新検査法との相関をプロットするものとする。また、特に数 $\mu\text{g/g}$ -数10 $\mu\text{g/g}$ の範囲については、改めて偏ることなく分布する10種以上の試料の定量値をプロットし(但し対象濃度範囲における試料確保が困難な場合には高濃度試料を希釈して測定した際の測定値を使用してよい)、上記基準を満たす相関が見られることを確認する。

試料としては、市販加工食品、食品材料に特定原材料タンパク質を添加して調製したモデル加工食品、特定原材料を含有する加工食品と特定原材料を含有しない同様の加工食品を混合し、特定原材料タンパク質濃度を調製したもの、あるいは特定原材料を含有しない加工食品に特定原材料タンパク質を添加したもの等を使用する。また、動物性の食品、植物性の食品、加工度の高いもの、酸性を示す食品等、種々の特性を持つ食品を試料として使用することが望ましい。

上記の近似直線の傾きが0.8以下あるいは1.2以上の場合は、上記検討に加えて、3種類以上の試料(ただし、試料に含まれる特定原材料タンパク質濃度レベルには10  $\mu\text{g/g}$ 程度を含むこと)を用いて回収率を検討し、50%以上150%以下の回収率となることを示すことが望ましい。試料としては、食品材料に特定原材料タンパク質を添加して調製したモデル加工食品、特定原材料を含有する加工食品と特定原材料を含有しない同様の加工食品を混合し、特定原材料タンパク質濃度を調製したもの、あるいは特定原材料を含有しない加工食品に特定原材料タンパク質を添加したもの等を使用する。

### (3) 精度

1-20  $\mu\text{g/g}$ 程度の特定原材料タンパク質を含有する試料(試料数2-3程度)を使用し、併行精度(試行回数は5回以上)及び日差変動(3-5日間程度)について検討する。F検定を行い、従来法と新検査法との間でこれらの精度及び変動が同等であること、また同等でない場合には新検査法の方の精度が高いことを示す。また、その他、日内変動、分析者間変動、機器間変動等についても検討することが望ましい。

### (4) 検出限界、定量限界

これらの値が従来法と同等またはより小さい値であることを示す。

### (5) 特異性

偽陽性、偽陰性を示す食品について検討し、従来法との一致点・相違点を明確に示す。

表 1. 亜硫酸ナトリウム含有抽出液により調製した標準品原液のタンパク定量結果

	2-ME (mg/ml)	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (mg/ml)	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> /2-ME (%)
Lot1	5.48 ± 0.08	5.19 ± 3.08	95.1
Lot2	5.48 ± 0.08	5.58 ± 3.18	101.5
牛乳	3.30 ± 0.01	3.39 ± 3.07	102.7
小麦	5.01 ± 0.13	5.00 ± 3.03	99.8
そば	3.72 ± 0.12	3.22 ± 3.03	83.8
落花生	4.40 ± 0.15	3.97 ± 3.12	90.2
甲殻類	4.03 ± 0.04	4.04 ± 3.03	103.2

(n = 3)                      (n = 3)

表 2. 魚肉すり身製品に含まれる甲殻類の実態調査結果

ちくわ

試料No.	ELISA (µg protein / g)		PCR			魚肉原材料表示
	Mキット	Nキット	えび	かに	動物	
C-1	N.D.	0.65	+ / +	- / -	+ / +	
C-2	N.D.	N.D.	+ / +	- / -	+ / +	たら、ぐち(9%)
C-3	0.98	1.13	+ / +	- / -	+ / +	たら、その他
C-4	1.56	0.93	+ / +	- / -	+ / +	
C-5	1.04	2.70	+ / +	- / -	+ / +	
C-6	N.D.	0.65	+ / +	- / -	+ / +	
C-7	1.67	1.56	+ / +	- / -	+ / +	いとよりだい、たら、えそ、れんこだい(10%)
C-8	0.67	0.96	+ / +	- / -	+ / +	たら、ほっけ
C-9	0.45	0.60	+ / +	- / -	+ / +	たら、ぐち(13%)、いとよりだい、その他
C-10	N.D.	0.53	- / +	- / -	+ / +	たら、その他
C-11	0.67	1.15	+ / +	- / -	+ / +	たら、ほっけ
C-12	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	すけとうだら、たい、きす、こち

はんぺん

試料No.	ELISA (µg protein / g)		PCR			魚肉原材料表示
	Mキット	Nキット	えび	かに	動物	
H-1	N.D.	0.73	- / -	- / -	+ / +	
H-2	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	さめ、たら
H-3	0.39	0.62	+ / +	- / -	+ / +	
H-4	N.D.	N.D.	+ / -	- / -	+ / +	さめ、いとより
H-5	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	さめ
H-6	N.D.	N.D.	+ / +	- / -	+ / +	
H-7	1.20	0.69	+ / +	- / -	+ / +	
H-8	0.55	N.D.	- / -	- / -	+ / +	よしきりざめ、あおざめ
H-9	0.33	0.57	+ / +	- / -	+ / +	
H-10	N.D.	0.74	- / +	- / -	+ / +	
H-11	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	さめ、たら
H-12	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	たら、さめ、黒皮かじき

表 2. 魚肉すり身製品に含まれる甲殻類の実態調査結果(続き)

かまぼこ

試料No.	ELISA		PCR			魚肉原材料表示
	(μg protein / g)		えび	かに	動物	
	Mキット	Nキット				
K-1	N.D.	0.66	+ / +	- / -	+ / +	たら、いとより、きんときだい、その他
K-2	N.D.	0.64	+ / +	- / -	+ / +	たら、ぐち、その他
K-3	3.61	3.63	+ / +	- / -	+ / +	
K-4	0.62	1.15	+ / +	- / -	+ / +	たら、ぐち、いとよりだい
K-5	N.D.	N.D.	- / +	- / -	+ / +	たら、その他
K-6	N.D.	0.43	+ / -	- / -	+ / +	
K-7	1.68	1.28	+ / +	- / -	+ / +	たら、ちだい、いとより、その他
K-8	3.34	4.91	+ / +	- / -	+ / +	ぐち、たら
K-9	0.63	0.81	+ / +	- / -	+ / +	たら、ぐち、たい
K-10	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	たら
K-11	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	たら、いとよりだい、ぐち、その他
K-12	0.93	1.19	+ / +	- / -	+ / +	ぐち、いとよりだい、たら

さつま揚げ

試料No.	ELISA		PCR			魚肉原材料表示
	(μg protein / g)		えび	かに	動物	
	Mキット	Nキット				
S-1	2.70	2.12	+ / +	- / -	+ / +	にしん、たら、あじ、ぐち、その他
S-2	2.94	1.68	+ / +	- / -	+ / +	
S-3	11.74	9.22	+ / +	- / -	+ / +	
S-4	0.60	0.45	- / -	+ / +	+ / +	
S-5	1.57	1.19	+ / +	- / -	+ / +	
S-6	1.13	0.88	- / +	- / -	+ / +	
S-7	3.64	5.09	+ / +	- / -*	+ / +	
S-8	0.55	0.75	+ / -	- / -	+ / +	ほっけ
S-9	0.92	1.21	- / -	- / -	+ / +	にしん、たら、あじ、ぐち、その他
S-10	1.54	2.06	+ / +	- / -	+ / +	
S-11	N.D.	N.D.	- / -	- / -	+ / +	
S-12	N.D.	0.37	- / -	- / -	+ / +	