

報 文

イムノクロマト法による食品中の魚類タンパク質の検出

(平成25年12月3日受理)

柴原裕亮^{1,*} 猪井俊敬¹ 汪 俊² 山田彰一² 塩見一雄³

Detection of Fish Protein in Food Products by Lateral Flow Immunoassay

Yusuke SHIBAHARA^{1,*}, Toshihiro Ii¹, Jun WANG², Shoichi YAMADA² and Kazuo SHIOMI³¹ Research Division, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.: 1075-2 Hokunanmoro, Yuki-shi, Ibaraki 307-0036, Japan;² Food Safety Research Center, Nippon Suisan Kaisha, Ltd.: 1-32-3 Nanakuni, Hachioji, Tokyo 192-0991, Japan;³ Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology:
4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan;

* Corresponding author

The major fish allergen is parvalbumin, a sarcoplasmic protein. In this study, a novel lateral flow immunoassay for the detection of fish protein in food products was developed using a polyclonal antibody raised against Pacific mackerel *Scomber japonicus* parvalbumin. The proposed lateral flow immunoassay showed high reactivity to various fish parvalbumins, but the reactivity to bullfrog parvalbumin was very low. The detection limit of the immunoassay for fish parvalbumin was estimated to be 2.0 µg protein/g, which matches the sensitivity required in the current Japanese food labeling system. Furthermore, the lateral flow immunoassay could detect fish parvalbumin without being affected by food matrices and was applicable even to heat-denatured parvalbumin. These results showed that the lateral flow immunoassay developed in this study is specific to fish parvalbumin, and should be useful as a rapid detection method for fish protein in processed food products.

(Received December 3, 2013)

Key words: 食物アレルギー food allergy; 魚類 fish; パルブアルブミン parvalbumin; イムノクロマト法 lateral flow immunoassay

緒 言

2001~2002年に行われた即時型食物アレルギーの調査において、魚類は全年齢で第6位のアレルギー原因食物となっている¹⁾。さらに20歳以上の中では、甲殻類、小麦、果実類に次ぐ第4位で、特に成人で多いことが魚類アレルギーの特徴である。このようなことから、魚類の中でアレルギー症例の多い「さけ」と「さば」が、2002年より本格的に開始されたアレルギー物質を含む食品に関する表示制度において、表示奨励品目に指定された¹⁾。海外においても、古くから症例の多いタラアレルギーをはじめとして、北欧で魚類アレルギーが問題となっている。ただし日本とは違い、多くの諸外国では魚類全般をアレルギー表示制度の対象としている²⁾。日本において「さけ」と「さば」と

いった特定の魚種のみを表示対象に指定しているのは、臨床現場では魚類アレルギー患者によっては食べることができる魚があることを考慮したためであると言われている。すなわち、諸外国との食文化の違いにより日本では非常に多様な魚種が流通しているので、魚類と表示することによって食品選択の幅を狭めないように配慮したと言われている。

魚類の主要アレルギーがパルブアルブミンであることは、北欧産タラ類 *Gadus callarias* の研究で初めて明らかにされた^{3), 4)}。その後、ウナギ⁵⁾、サケ⁶⁾、マアジ⁷⁾、チダイ⁸⁾、サバ類⁹⁾、メバチ⁵⁾ など多くの魚種においても、パルブアルブミンが主要アレルギーとして単離同定されている。パルブアルブミンは12 kDaの筋形質タンパク質（水溶性タンパク質）の1種で、熱安定性が高くカルシウム結合能をもっている¹⁰⁾。脊椎動物特有のタンパク質で、魚類と両生類の筋肉に特に多く含まれている¹¹⁾。各種魚類およびカエル類に含まれるパルブアルブミンのアミノ酸配列の相同性は70~80%と高く、各種魚類間だけでなく魚類とカエル類の間でも抗原交差性を示すことが明らかにされている¹²⁾。アレルギーの発症にかかわるIgE結合エピトープについては、Ca²⁺除去によって高次構造が変化するだけでな

* 連絡先 y-shibahara@nissui-pharm.jp

¹ 日水製菓株式会社 研究部: 〒307-0036 茨城県結城市北南茂呂1075-2² 日本水産株式会社 食品分析センター: 〒192-0991 東京都八王子市七国1-32-3³ 東京海洋大学食品生産科学科: 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

く患者血清との反応性が著しく低下することから、エビトープには Ca^{2+} との結合によって保持されている高次構造が重要であると考えられている^{13), 14)}。しかしながら、食品の加工処理で行われる加熱やpHの影響を受けにくい¹⁵⁾ことから、パルプアルブミンは魚類検知法の対象タンパク質として好ましいと考えられ、筆者らはマサバパルプアルブミンに対するポリクローナル抗体を用いて魚類タンパク質を検知するELISA法（以下、魚類ELISA法）を構築した¹⁶⁾。食物アレルギーを誘発する物質の検査において、ELISA法は高感度、定量可能など優れた方法であるが、製造ラインを介した食物アレルギー物質のコンタミネーションなどを回避するためには現場レベルのより簡便・迅速な検査方法が望まれる。このような需要に応える検査方法としてイムノクロマト法があり、卵、牛乳、甲殻類などの自主検査として広く利用されているが^{17), 18)}、これまでのところ、魚類タンパク質を検知するイムノクロマト法は開発されていない。そこで本研究では、魚類ELISA法と同一のポリクローナル抗体を利用して魚類タンパク質を検知するイムノクロマト法の開発を試みた。

実験方法

1. 試料

試料に用いた75種類の食品原料（Table 2, 3および本文を参照）および18種類の市販加工食品（Table 4参照）は、スーパーマーケットならびに築地市場で購入した。

2. パルプアルブミンの精製

魚類5種（ウナギ、マアジ、チダイ、マサバ、メバチ）および両生類1種（ウシガエル）のパルプアルブミンについては、既報に従って、Sephadex G-75カラム（GE Healthcare社製）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（東ソー（株）製）を用いた逆相HPLCにより精製した^{5), 7)~9), 12)}。これら魚類およびウシガエルでは少なくとも2種類のパルプアルブミンアイソフォームが認められたが、本稿ではそれぞれの主成分（ウナギのAng j 1⁵⁾、マアジのTra j 1⁷⁾、チダイのPA II⁸⁾、マサバのSco j 1⁹⁾、メバチのThu o 1⁵⁾、ウシガエルのPA 2¹²⁾）を用いた。これらパルプアルブミンのほかに、魚類3種（マイワシ、カツオ、ヒラメ）のパルプアルブミンも同様の方法で精製した。いずれの魚種にもやはりアイソフォームの存在が認められたが、主成分のみを実験に供した。

3. 標準溶液の調製

標準溶液は、魚類ELISA法で報告した方法¹⁶⁾に準じて調製した。すなわち、魚類標準粉末（マアジ筋肉の凍結乾燥粉末）0.1 gを、0.5 mol/L NaCl, 0.5% SDS, 2% 2-メルカプトエタノール, 5 mmol/L EDTA, 1% Protease Inhibitor Cocktail Kit（Thermo Fisher Scientific社製）を含む0.05 mol/L トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）20 mLと混合して一晩振とう抽出（16時間）を行い、遠心分離により回収した上清をマイクロフィルターでろ過後、沸騰浴で10分間加熱して標準溶液原液を得た。タンパク質濃度は2-D Quant

kit（GE Healthcare社製）を用いて測定した。さらに、検体希釈液（0.15 mol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl_2 , 0.1% BSA, 0.01% Triton X-100, 0.1% ProClin 300を含む0.02 mol/L トリス塩酸緩衝液, pH 7.4）にて適宜希釈し、イムノクロマト法の感度試験に用いた。

4. モデル加工食品の作製

魚類標準粉末を10 μg タンパク質/gの濃度で添加した5種類のモデル加工食品（野菜チキンスープ、豚肉シウマイ、鶏肉団子、クリームコロッケ、白がゆ）を作製した。各加工食品の原材料および作製方法は既報¹⁶⁾と同じである。なお、対照として、魚類標準粉末を含まない加工食品も作製した。

5. 試料溶液の調製

ホモジナイザーで均一化した試料（食品原材料、市販加工食品、モデル加工食品）2 g、抽出液（4%尿素, 0.1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.05% Triton X-100, 5 mmol/L EDTA, 0.05% ProClin 300を含む0.06 mol/L MOPS緩衝液, pH 7.4）38 mLを別のホモジナイザーカップに量り採ってホモジナイズ（30秒間を3回）した。ホモジネートを3,000 $\times g$ で20分間遠心分離し、得られた上清を試料抽出液として用いた。

6. イムノクロマト法

マサバパルプアルブミンを免疫原に用いて作製したウサギ抗血清より、HiTrap Protein G HP（GE Healthcare社製）で精製してポリクローナル抗体を得た¹⁶⁾。ポリクローナル抗体作製における動物実験は、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和55年3月総理府告示第6号）」を遵守し、日本製薬株式会社の内規に基づいて実施した。次に、Okuらの方法¹⁹⁾に従って、イムノクロマト用のテストプレートを下のように作製した。

ポリクローナル抗体4 μg を金コロイド（BBI International社製, OD 530 nm = 1）1 mLと混合し、静電的な結合により金コロイド結合抗体を調製した。オリゴヌクレオチドI結合抗体は、マレイミド法¹⁹⁾を用いてポリクローナル抗体にオリゴヌクレオチドI（（株）日本バイオテスト研究所製）を架橋して調製した。金コロイド結合抗体（0.2 μg /テスト）、オリゴヌクレオチドI結合抗体（0.1 μg /テスト）および金コロイド結合タンパク質（BBI International, 0.02 μg /テスト）をグラスファイバー（PALL社製）に浸漬し凍結乾燥を行うことでコンジュゲートパッドを作製した。次に、ニトロセルロースメンブレン（Advanced Microdevices社製）の対照部に金コロイド結合タンパク質に対する抗体（375 ng/テスト）を、試験部に上述と同様の方法で調製したオリゴヌクレオチドI結合タンパク質（375 ng/テスト；オリゴヌクレオチドIはオリゴヌクレオチドIと相補的な配列）をBioDot XYZ 3000（BioDot社製）を用いて塗布し、室温で16時間乾燥することで固定化した。調製したニトロセルロースメンブレンにコンジュゲートパッド、サンプルパッドおよび吸水パッド（共にAdvanced Microdevices社製）をFig. 1のように貼り付け、ギロチンカッター（Bio-

Dot社製)を用いて5 mm幅に切断してクロマトストリップを作製した。さらに、クロマトストリップをイムノクロマトハウジングに組み込んでテストプレートを作製した。

上記のように作製したテストプレートの試料添加部 (Fig. 2) に試料液 100 μ L を添加し、20 分間の静置後に目視で陰性または陽性の判定を行った。測定原理は、抗原と金コロイド結合抗体およびオリゴヌクレオチドI結合抗体との免疫反応、試験部に固相化されているオリゴヌクレオチドI'結合タンパク質とオリゴヌクレオチドI結合抗体とのDNA-DNAの相互反応を組み合わせたイムノクロマト法である (Fig. 1)。すなわち、試料中に魚類パルブアルブミンが存在すると金コロイド結合抗体およびオリゴヌクレオチドI結合抗体と複合体を形成し、試験部でオリゴヌクレオチドI'結合タンパク質と結合して金コロイドの着色 (赤紫色ライン) を呈する。また、金コロイド結合タンパク質は対照部で金コロイド結合タンパク質に対する抗体と反応するので、対照部にも赤紫色のラインが認められる。一方、試料中に魚類パルブアルブミンが存在しない場合は対照部のみに赤紫色のラインが見られる (Fig. 2)。

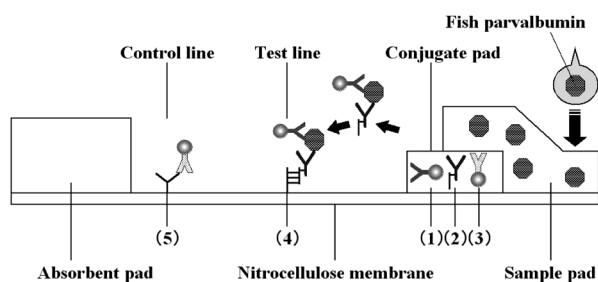


Fig. 1. Principle of the lateral flow immunoassay

(1), Colloidal gold-labeled antibody (anti-Pacific mackerel parvalbumin); (2), Oligonucleotide-labeled antibody (anti-Pacific mackerel parvalbumin); (3), Colloidal gold-labeled antibody for control line; (4), Complementary oligonucleotide labeled protein immobilized on nitrocellulose membrane; (5), Antigen for control line immobilized on nitrocellulose

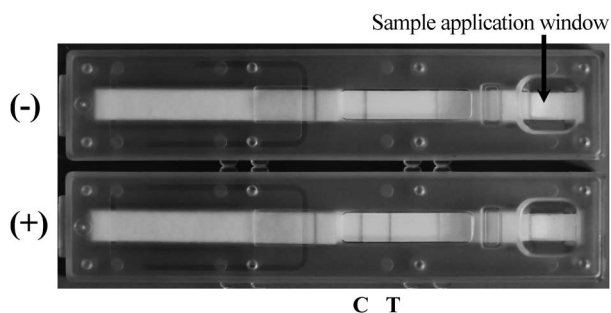


Fig. 2. Example of detection of fish protein by lateral flow immunoassay

(+): Positive result (sample containing 10 μ g protein/g fish standard protein solution); (-): Negative result (dilution buffer); C, line for reference; T, line for detection of fish protein

7. 魚類ELISA法

既報の魚類ELISA法¹⁶⁾に準じて行った。

結果および考察

1. 検出限界および再現性

標準溶液を検体希釈液で希釈し、魚類タンパク質濃度として1, 2, 4, 8 μ g/gの溶液を調製した。各溶液について、イムノクロマト法に供して二重測定による感度試験を行った結果、1 μ g/g以下は陰性となり、2 μ g/g以上の検出が可能であった (Table 1)。また、0および2 μ g/gの標準溶液を用いた同時再現性試験 (五重測定) の結果、0 μ g/gはすべて陰性、2 μ g/gはすべて陽性で、再現性も良好であった (Table 1)。本イムノクロマト法の検出感度は、原材料や製造ラインにおける検査ですでに広く用いられている卵、牛乳、甲殻類などの食物アレルギー物質のイムノクロマト法における検出感度 (1~5 μ g/g)^{17), 18)}と同等である。なお、検出限界が0.24 μ g/gである魚類ELISA法¹⁶⁾と比較するとやや劣るものの、表示の必要性は総タンパク質で10 μ g/gで判断される¹⁾ことから、本研究で開発した魚類イムノクロマト法の感度は実用性の点で十分であると考えられた。

2. 交差反応性

精製パルブアルブミンに対する反応性を評価するために、検体希釈液を用いて各種パルブアルブミンの段階的2倍希釈液 (0.5~400 ng/mL) を調製してイムノクロマト法に供し、陰性となった濃度を検出限界として比較した。その結果、マサバパルブアルブミンの検出限界 (1 ng/mL) と比較して、マアジ、カツオおよびメバチのパルブアルブミンは同等であったが、ウナギ、マイワシおよびチダイのパルブアルブミンは2倍、ヒラメパルブアルブミンは4倍の感度差が認められた (Table 2)。魚類ELISA法ではマサバパルブアルブミンとの反応性を100%として各魚種のパルブアルブミンの反応率が求められている¹⁶⁾が、イムノクロマト法においてマサバパルブアルブミンと同等の感度を示した3種のパルブアルブミンの反応率は66.2~99.0%、2倍差の3種のパルブアルブミンは32.9~57.9%、4倍差のヒラメパルブアルブミンは22.6%で、反応率が高い魚種ほどイムノクロマト法では検出限界が低い傾向を示した。なお、魚類ELISA法ではウシガエルパルブアルブミンとの反応率はわずか1.2%であったが、イムノクロマト法に

Table 1. Reactivity of fish protein standard solution in the lateral flow immunoassay

Fish protein concentration (μ g protein/g)	Sensitivity		Repeatability				
	1	2	1	2	3	4	5
0	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	N.T. ^{a)}				
2	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	N.T. ^{a)}				
8	+	+	N.T. ^{a)}				

^{a)} N.T.: Not tested.

Table 2. Detection limits of various parvalbumin samples in the lateral flow immunoassay

Sample	Detection limit (ng/mL)
Fish	
Pacific mackerel <i>Scomber japonicus</i> (Masaba) ^{a)}	1
Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> (Unagi)	2
Sardine <i>Sardinops melanostictus</i> (Maiwashi)	2
Horse mackerel <i>Trachurus japonicus</i> (Maaji)	1
Crimson sea bream <i>Evynnis japonica</i> (Chidai)	2
Skipjack <i>Katsuwonus pelamis</i> (Katsuo)	1
Bigeye tuna <i>Thunnus obesus</i> (Mebachi)	1
Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (Hirame)	4
Amphibia	
Bullfrog <i>Rana catesbeiana</i> (Ushigaeru)	100

^{a)} Japanese name is given in parenthesis.

においてもマサバパルブアルブミンとは100倍もの感度差が認められた。

次に、72種類の食品原材料からの抽出液をイムノクロマト法で分析した。Table 3に示すように、魚類18種はすべて陽性であったが、頭足類6種のうち1種（ヤナギダコ）および魚卵2種のうち1種（イクラ）では偽陽性反応が認められた。しかし、残りの頭足類5種と魚卵1種、さらにTable 3には示していない棘皮動物1種（マナマコ）、甲殻類5種（ウシエビ、サクラエビ、イセエビ、ズワイガニ、タラバガニ）、巻貝2種（アカアワビ、サザエ）、二枚貝5種（ムラサキイガイ、シジミ、ウバガイ、バカガイ、ナミガイ）、海藻4種（ワカメ、コンブ、ヒジキ、モズク）、肉類2種（鶏肉、子羊肉）、穀類4種（小麦、大麦、米、ソバ）、野菜類2種（ホウレンソウ、ニンニク）、キノコ類2種（シイタケ、マッシュルーム）、豆類1種（アズキ）、種実類3種（アーモンド、カシューナッツ、ゴマ）、茶類4種（紅茶、緑茶、ウーロン茶、コーヒー）、香辛料7種（カレー粉、クミン、ローズマリー、パプリカ、シナモン、ナツメグ、タイム）、増粘多糖類4種（カラギーナン、グアーガム、キサンタンガム、ゲランガム）の合計52種はすべて陰性であった。

上述のように、イムノクロマト試験において魚類18種はすべて検出可能であった。18種のうち15種については本研究と同じ検体を魚類ELISA法で分析し、14~46,100 µg/g¹⁶⁾という測定値を得ている。数万µg/gのような高値の検体においても本研究で開発したイムノクロマト法では陽性反応を確認できたことから、イムノクロマト法で懸念される抗原過剰状態におけるプロゾーン現象^{17), 18)}も起こりにくいと考えられた。

魚類以外の食品原材料54種の中では、偽陽性が認められたのは頭足類1種（ヤナギダコ）および魚卵1種（イクラ）のわずか2種であった。魚類ELISA法においても偽陽性は頭足類と魚卵だけに確認されている¹⁶⁾が、イムノクロマト法ではELISA法と同じポリクローナル抗体を用いているので類似の偽陽性反応が見られたといえる。しかしながら、魚類ELISA法では今回の試験に用いた頭足類6種のうち4種（ヤナギダコ、ヤリイカ、アオリイカ、ヨーロッパコウ

Table 3. Reactivity of fish, cephalopod and fish roe samples in the lateral flow immunoassay

Sample	Reactivity
Fish	
Conger eel <i>Conger myriaster</i> (Maanago) ^{a)}	+
Sardine <i>Sardinops melanostictus</i> (Maiwashi)	+
Pacific herring <i>Clupea pallasii</i> (Nishin)	+
Capelin <i>Mallotus villosus</i> (Karafuto-shishamo)	+
Red salmon <i>Oncorhynchus nerka</i> (Benizake)	+
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i> (Taiseiyosake)	+
Pacific cod <i>Gadus macrocephalus</i> (Madara)	+
Pacific saury <i>Cololabis saira</i> (Sanma)	+
Yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i> (Buri)	+
Horse mackerel <i>Trachurus japonicus</i> (Maaji)	+
Red sea bream <i>Pagrus major</i> (Madai)	+
Sailfin sandfish <i>Arctoscopus japonicus</i> (Hatahata)	+
Pacific mackerel <i>Scomber japonicus</i> (Masaba)	+
Skipjack <i>Katsuwonus pelamis</i> (Katsuo)	+
Bigeye tuna <i>Thunnus obesus</i> (Mebachi)	+
Southern bluefin tuna <i>Thunnus maccoyii</i> (Minami-maguro)	+
Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (Hirame)	+
Rock sole <i>Pleuronectes mochigarei</i> (Asabagarei)	+
Cephalopod	
Common octopus <i>Octopus vulgaris</i> (Madako)	—
Chestnut octopus <i>Octopus conispadiceus</i> (Yanagidako)	+
Japanese flying squid <i>Todarodes pacificus</i> (Surumeika)	—
Spear squid <i>Loligo bleekeri</i> (Yariika)	—
Big fin reef squid <i>Sepioteuthis lessoniana</i> (Aoriika)	—
Common cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> (Yoroppakouika)	—
Fish roe	
Cod roe (Tarako)	—
Salmon roe (Ikura)	+

^{a)} Japanese name is given in parenthesis.

イカ）および魚卵2種の両方（タラコ、イクラ）に偽陽性が報告されている¹⁶⁾。偽陽性の測定値は1.2~3.8 µg/gとイムノクロマト法の検出限界以下も含まれていることから、魚類ELISA法との偽陽性数の乖離は感度差に起因していると考えられた。このように、イムノクロマト法による偽陽性は頭足類と魚卵の一部に限られ、しかも感度がやや劣ることが幸いして偽陽性の頻度は魚類ELISA法よりも少なかった。よって、本法は魚類パルブアルブミンの検出に対して十分な特異性があると判断した。

3. 加工食品の測定

加工食品に含まれる微量の魚類タンパク質をイムノクロマト法で検出可能であるかどうかを、5種類のモデル加工食品の抽出液を用いて検討した。魚類標準粉末を表示が必要な濃度の10 µg/gとなるように添加した試料および未添加の試料を測定した結果、添加試料はすべて陽性、未添加試料はすべて陰性を示した。加熱処理を行った野菜チキンスープ、豚肉シュウマイや鶏肉団子のようなタンパク質の含有量が高いと思われる食品、クリームコロッケのような脂質が高い食品、白がゆのような粘性の高い食品においても展開不良や反応阻害は認められず、偽陽性も見られなかったことから、イムノクロマト法による検出は加熱や食品成分の影響を受けにくいと考えられた。

加工の影響をさらに検討するために、市販加工食品18

Table 4. Analyses of fish protein in various commercial processed foods by the lateral flow immunoassay and sandwich ELISA method

Sample	Reactivity in IC ^{a)}	Fish protein concentration determined by ELISA ($\mu\text{g protein/g}$)	Label of fish or fish product
Fish sauce 1	—	<1.0	Fish extract
Fish sauce 2	+	11.2	Fish
Shuto (salted tuna guts)	—	<1.0	Tuna
Gelatin	—	<1.0	Fish skin
Seafood noodle	+	5.3	Fish meat, seafood extract
Kamaboko (steamed fish paste)	+	605	Fish meat (cod, threadfin bream, red bigeye)
Base of soup	+	4.9	Dried skipjack flake powder
Snack food (fish)	+	522	Filefish
Canned fish	+	7.8	Skipjack
Pasta sauce (tuna)	—	1.9	Boiled tuna
Rice gruel	+	108	Red salmon, salmon extract
Fried food (shrimp)	—	N.T. ^{b)}	Non-labeled
Snack food (shrimp)	—	N.T.	Non-labeled
Worcester sauce	—	N.T.	Non-labeled
Tomato sauce	—	N.T.	Non-labeled
Hamburger steak	—	N.T.	Non-labeled
Base of kimchi	—	N.T.	Non-labeled
Biscuit	—	N.T.	Non-labeled

^{a)} IC: Lateral flow immunoassay.

^{b)} N.T.: Not tested.

種類についてはイムノクロマト法による分析と合わせて、魚類ELISA法により魚類タンパク質濃度も測定した (Table 4)。イムノクロマト法では、魚類の表示がある11種類のうち、7種類は陽性、4種類 (魚醤油1, 酒盗: カツオの内臓で作った塩辛, ゼラチン, ツナ入りパスタソース) は陰性と判定された。陽性であった7種類の魚類タンパク質濃度は魚類ELISA法で5.3~605 $\mu\text{g/g}$ と測定され、イムノクロマト法の検出限界以上であった。それに対して、陰性の4種類のうち3種類については魚類ELISA法では魚類タンパク質は検出されず、1種類 (ツナ入りパスタソース) についてもイムノクロマト法の検出限界付近のわずか1.9 $\mu\text{g/g}$ であった。このように、魚類の表示がある11種類の加工食品で得られたイムノクロマト試験結果 (陽性数7) は、魚類ELISA法による魚類タンパク質の定量結果 (陽性数8) とよく一致していた。一方、魚類の表示がない7種類の加工食品の場合、イムノクロマト法ではすべて陰性で偽陽性は認められず、食品原材料における試験結果と同様に良好な特異性であった。本稿ではこれら加工食品を魚類ELISA法に供していない。しかしながら、各種加工食品を魚類ELISA法で分析した以前の結果を考慮すると、頭足類や魚卵などの偽陽性の原因となる食品が含まれていないことから、魚類タンパク質含量はすべて1.0 $\mu\text{g/g}$ 未満と推定される。

魚類の表示がある11種類の加工食品について、イムノクロマト試験結果を以下に考察しておきたい。パルプアルブミンは耐熱性タンパク質で加熱変性の影響を受けにくい¹⁵⁾といわれている。このことに対応して、4種類の加熱加工食品 (シーフードヌードル, かまぼこ, スープの素, カワハギのおつまみ) はイムノクロマト試験においてすべて陽

性であった。一方、加圧・加熱処理 (レトルト処理) された魚肉缶詰では、パルプアルブミンの分解によりアレルゲン性が低下するという報告²¹⁾があるが、カツオの缶詰およびレトルトのサケがゆにおいては十分に検出可能であった。もう1種類のレトルト食品であるツナ入りパスタソースは陰性であったが、原材料のマグロはパルプアルブミンの含有量が少ない魚種である²⁰⁾ ことに加え、マグロの下ゆで過程において水溶性⁹⁾であるパルプアルブミンが煮汁に多量に溶出したためと考えられる。ツナ入りパスタソースのほかに陰性であったのは、2種類の発酵食品 (魚醤油2, 酒盗) とゼラチンである。発酵食品の場合、発酵中に微生物の酵素作用を受けてパルプアルブミンのほとんどがアミノ酸レベルまで分解された結果であり、ゼラチンの場合、製造過程においてパルプアルブミンを含むほかの魚類タンパク質が十分に除去された結果であると思われる。なお、酒盗の原材料であるカツオの内臓 (幽門垂, 胃, 腸), ゼラチンの原材料である魚の皮は、いずれもパルプアルブミン含量が非常に少ないと推測^{22), 23)}され、このことも陰性結果の原因になっている可能性が高い。

本研究では、マサバパルプアルブミンに対するポリクローナル抗体を用いた魚類タンパク質を検知するイムノクロマト法を開発した。本法は、表示の判断に十分な感度を有すること、魚類以外の食品とは交差反応が少ないこと、加熱加工食品および加圧・加熱加工食品の検出が可能なることから、食品中に含まれる魚類を簡便・迅速に検知する方法として有用と考えられた。

文 献

- 1) Akiyama, H., Imai, T., Ebisawa, M. Japan food allergen labeling regulation-history and evaluation. *Adv. Food Nutr. Res.*, **62**, 139-171 (2011).
- 2) Futo, S. Food allergens: current topics of labeling system and testing methods. *Shokuhin To Kaihatsu (Food Processing and Ingredients)*, **40**, 11-13 (2005).
- 3) Elsayed, S., Aas, K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **40**, 428-438 (1971).
- 4) Elsayed, S., Bennich, H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand. J. Immunol.*, **4**, 203-208 (1975).
- 5) Shiomi, K., Hamada, Y., Sekiguchi, K., Shimakura, K., Nagashima, Y. Two classes of allergens, parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel and bigeye tuna. *Fish. Sci.*, **65**, 943-948 (1999).
- 6) Lindström, C. D. V., van Dô, T., Hordvik, I., Endresen, C., and Elsayed, S. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand. J. Immunol.*, **44**, 335-344 (1996).
- 7) Shiomi, K., Hayashi, S., Ishikawa, M., Shimakura, K., Nagashima, Y. Identification of parbalbumin as an allergen in horse mackerel muscle. *Fish. Sci.*, **64**, 300-304 (1998).
- 8) Guo, F. F., Kubota, H., Shiomi, K. Purification, immunological properties and molecular cloning of two allergenic parvalbumins from the crimson sea bream *Erythrinus japonicus*. *Food Chem.*, **132**, 835-840 (2012).
- 9) Hamada, Y., Tanaka, H., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1149-1156 (2003).
- 10) Elsayed, S., Aas, K. Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. *J. Allergy*, **47**, 283-291 (1971).
- 11) Kretsinger, R. H., Nockolds, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313-3326 (1973).
- 12) Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K. Reactivity of serum immunoglobulin E to bullfrog *Rana catesbeiana* parvalbumins in fish allergic patients. *Fish. Sci.*, **70**, 1137-1143 (2004).
- 13) Swoboda, I., Bugajska-Schretter, A., Verdino, P., Keller, W., Sperr, W. R., Valent, P., Valenta, R., Spitzauer, S. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J. Immunol.*, **168**, 4576-4584 (2002).
- 14) Tomura, S., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shiomi, K. Reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by mutation at Ca²⁺-binding sites. *Fish. Sci.*, **74**, 411-417 (2008).
- 15) Aas K., Elsayed, S. Physico-chemical properties and specific activity of a purified allergen (codfish). *Dev. Biol. Stand.*, **29**, 90-98 (1975).
- 16) Shibahara, Y., Uesaka, Y., Wang, J., Yamada, S., Shiomi, K. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fish protein in processed foods. *Food Chem.*, **136**, 675-681 (2013).
- 17) Nonaka, I., Takahata, Y. Food allergen screening test kit. *Allergy No Rinsho (The Allergy in Practice)*, **24**, 43-48 (2004).
- 18) Shibahara, Y. Development of detection methods for crustacean. *Food Chemical*, **2**, 29-32 (2009).
- 19) Oku, Y., Kamiya, K., Kamiya, H., Shibahara, Y., Ii, T., Uesaka, Y. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection. *J. Immunol. Methods*, **258**, 73-84 (2001).
- 20) Kuehn, A., Scheuermann, T., Hilger, C., Hentges, F. Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **153**, 359-366 (2010).
- 21) Bernhisel-Broadbent, J., Strause, D., Sampson, H. A. Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 622-629 (1992).
- 22) Baron, G., Demaille, J., Dutruge, E. The distribution of parvalbumins in muscle and tissues. *Febs Letters*, **56**, 156-160 (1975).
- 23) Weber, P., Steinhart, H., Paschke, A. Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from various fish species in food grade fish gelatins and isinglass with PARV-19 anti-parvalbumin antibodies. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 11328-11334 (2009).