

## 食物アレルギーの原因食品として問題になっている 甲殻類原材料を検出するキットの開発

(株) マルハニチロホールディングス中央研究所第1研究チーム 清木 興介<sup>1</sup>

### アレルギーとは

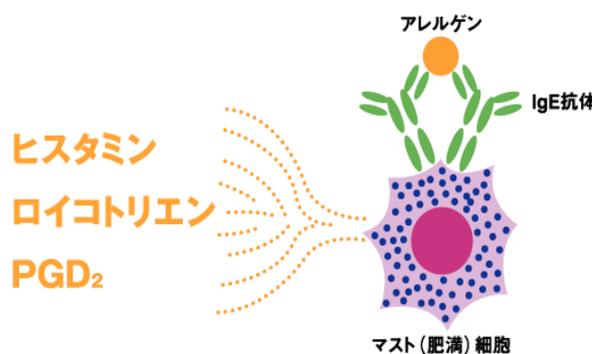
アレルギーとは、ダニ、花粉、あるいは、いろいろな食材の中に含まれているアレルギー原因物質——主にたんぱく質で、アレルゲンと総称します——が体内に入ることにより、人を守るための免疫機構が逆に人に弊害をもたらすように過剰反応することを行います。皮膚がかゆい、目がかゆくて涙がとまらない、おなかが痛い、咳がとまらない、重症の場合は死に至るということで、非常に問題になってきております。アレルギーの基本的なメカニズムは、体内に存在するマスト細胞にIgE抗体がついており、そこにアレルゲンが架橋すると、その刺激によってヒスタミン、ロイコトリエン、PGD<sub>2</sub>といったケミカルメディエーターが放出され、これがさまざまな症状を引き起こすというものです。

食品中の主なアレルゲン成分をここに挙げました。卵ですとオвалブミン、オボムコイドなどがあります。甲殻類の主なアレルゲンとしてはトロポミオシンという筋肉たんぱく質が知られています。

### アレルギー物質の表示

日本は世界に先駆けて食品中のアレルギー物質の表示に取り組み、平成13年4月に省令等公布、平成14年4月に完全施行となりました。卵、牛乳、小麦、そば、落花生という特定原材料5品目がこの時点で義務化されております。また過去に一定の頻度で発症報告さ

### アレルギーのメカニズム



### 食品中の主なアレルゲン成分

卵	オвалブミン、オボムコイド、 鶏卵リゾチームなど
牛乳	β-ラクトグロブリン、αs1-カゼインなど
小麦	グルテン、グリアジンなど
そば	複数存在し特定されていない
ピーナッツ	Ara h 1、Ara h 2
大豆	Glym Bd 30 k
甲殻類	<b>トロポミオシン</b>
魚	パルプアルブミン

<sup>1</sup>清木 興介 (せいき こうすけ)

[略歴] 1987年 大洋漁業株式会社入社 (増養殖事業部に配属)

1991年 マルハ株式会社 中央研究所 (現 (株) マルハニチロホールディングス中央研究所) に異動～現在に至る

[研究履歴]

- ・魚類ウイルスのワクチン開発
- ・ELISA法による糖尿病性腎症早期検出法の開発
- ・ELISA法による食品中アレルゲン検出技術の開発

れたものとして、2008年5月時点では、えび・かにを含む20品目が表示推奨品目として指定されていました。

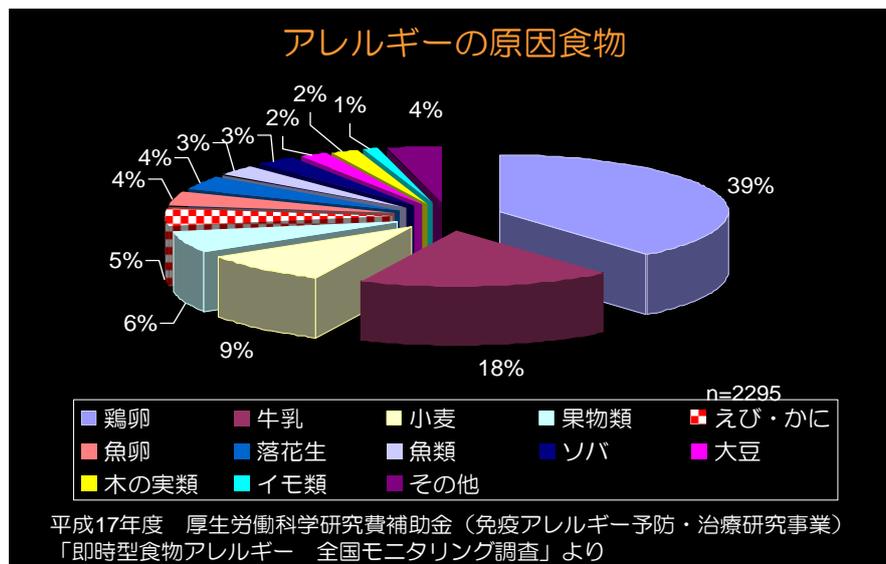
### 表示が必要となった原材料

(~2008.5)

規定	特定原材料等の名称	理由	表示の義務
法令	卵、乳、小麦	発症件数が多い	表示義務
	そば、落花生	症状が重篤	
省令	あわび、いか、いくら、えび、かに、さけ、さば、牛肉、鶏肉、豚肉、ゼラチン、キウイ、もも、バナナ、りんご、オレンジ、くるみ、大豆、やまいも、まつたけ	過去に一定の頻度で発症件数が報告されたもの	表示を推奨 (任意表示)

### えび・かにの表示義務化

平成17年度の厚生労働省の調査によると、アレルギーの原因物質としては卵、牛乳、小麦の三大アレルゲンが多く、バナナやキウイを含む果物類が次にきますが、単品では、えび・かにが三大アレルゲンに次ぐ原因食物になっています。また、初めてアレルギーを起こした原因食物は、乳幼児では卵、乳製品、魚卵、小麦、ピーナツなどがメインですが、年齢を重ねるにつれてえび・かにが上位に来て、成人では最も多くなっています。



### 初発症例の原因食物

n = 1356

	0歳	1歳	2,3歳	4-6歳	7-19歳	20歳以上
No.1	鶏卵 59%	鶏卵 40%	鶏卵 22%	鶏卵 16%	えび・かに 21%	えび・かに 20%
No.2	乳製品 24%	魚卵 14%	魚卵 13%	果実類 14%	果実類 18%	小麦 18%
No.3	小麦 7%	乳製品 11%	乳製品 11%	そば 12%	鶏卵 16%	果実類 15%
No.4		ピーナツ 9%	ピーナツ 10%	魚卵 10%	そば 9%	魚類 11%
No.5		魚類 7%	そば 8%	えび・かに 8%	魚類 7%	鶏卵 7%
小計	90%	81%	64%	60%	71%	71%

食品の表示に関する共同会議（平成19年3月23日）資料5-5より抜粋

このように、えび・かには単品としては三大アレルゲンに次ぐ原因食物であり、特に成人の初発の原因食物として第1位であることに加え、えび・かにのアレルギーは重篤化しやすい、特に摂食後の運動によりショック症状を起こしやすいといわれています。このようなことから、今年6月3日の食品衛生法施行規則の改正により、えび・かには義務表示となりました。2年間の経過措置期間が設けられておりますが、えび・かにをメインの食材として扱う水産会社としては、短いというのが実感でございます。

義務表示の対象範囲は、日本標準商品分類の「7133えび類」(クルマエビ、甘エビなど)、「7134いせえび、うちわえび、ざりがに類」、「7135かに類」とされており、動物分類学上では、十脚目が該当します。

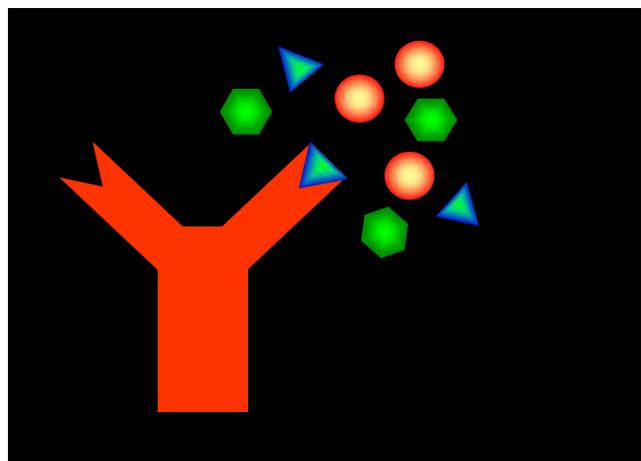
### えび・かにの表示の範囲

系統学的分類				日本標準商品分類		代表種	
節足動物	甲殻綱	フジツボ下綱	フジツボ目		7136 その他の 甲殻類	71369 他に分類されない甲殻類	フジツボ カメノテ
			シャコ目			71361 シャコ類	シャコ
		エビ下綱	アミ目			71362 あみ類	アミ
			オキアミ目			71363 おきあみ類	オキアミ
		本エビ上目	十脚目	根鰓亜目	クルマエビ下目	7133 えび類 (いせえび・ざりがに類を除く)	ブラックタイガー
				抱卵亜目	コエビ下目		アマエビ
					イセエビ下目	7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類	イセエビ
					ザリガニ下目		ロブスター
					異尾下目	7135 かに類	タラバガニ

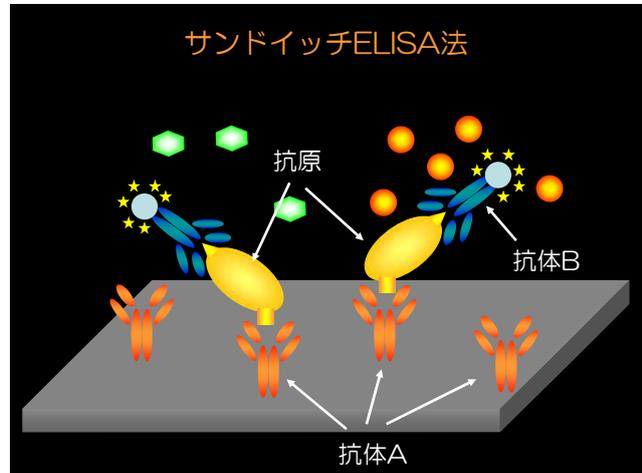
### 甲殻類アレルゲン検出キットの基本的仕組み

適切な表示のためには、きちんと検出できるキットがどうしても必要ということで、厚生労働省が3年前「食品中に含まれるアレルギー物質の検査方法の開発に関する研究」を立ち上げ、私どもはこれに参加して開発を進めてまいりました。

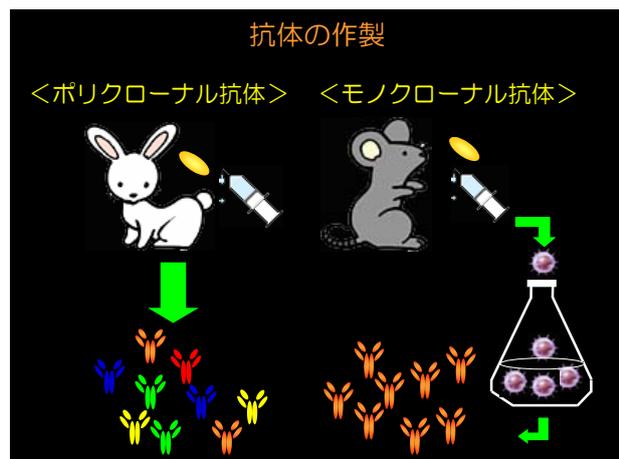
本キットは、**抗原抗体反応**を基本原理としております。赤のYで示しているのが抗体の模式図ですが、このY字に別れた先端の部分でたんぱく質を認識するわけです。1つの抗体は、青三角形で示したたんぱく質としか反応いたしません。赤丸形とか緑六角形とかいろいろな形のたんぱく質が存在しておりますけれども、こういったものが来てもくっつきません。Y字の先端にぴたっとはまる青三角形のたんぱく質だけをきちんとつかまえます。このように抗体は選択性が非常に高いという特徴を備えております。



この抗体をつかって抗原を検出する手法のひとつが今回のキットで用いた**サンドイッチELISA法**です。ターゲットとするたんぱく質（抗原）と特異的に結合する抗体Aを試験管など（図では平板）にくっつけておき、そこにいろいろな検体を振りかけると、ターゲット以外のたんぱく質は形が一致しないので結合しませんが、抗原だけはしっかりと捕まえる。ただ、実際は透明な水にしかみえません。そこで、この抗原の別の部位を認識して特異的に反応する別の抗体Bに色をつけて抗原と結合させます。抗原抗体結合体が多ければ色は濃く、少なければ薄くなります。目的とする物質を抗体でサンドイッチのように挟み込んで検出することから、サンドイッチELISA法と呼んでおります。

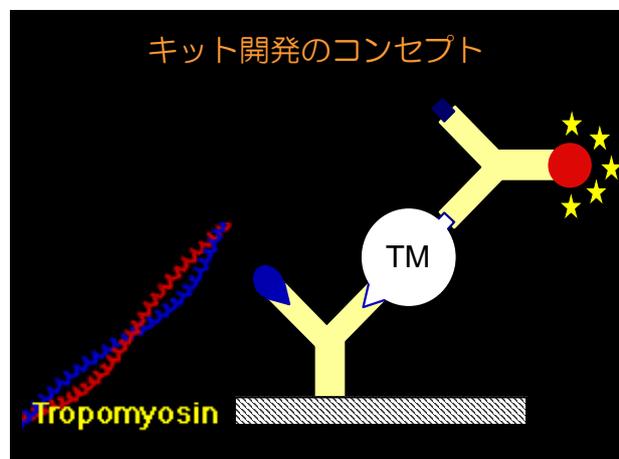


抗体の作成方法ですが、動物に目的のたんぱく質（抗原）を接種すると、抗原にいくつつかある認識部位、エピトープに対応していろいろな抗体が血液中に出てきます。これを回収して使う方法が一つです。いろいろな抗体を含むのでポリクローナル抗体と呼びます。もう1つは、目的のたんぱく質（抗原）で動物を免疫し、その抗体を作る細胞を1個取り出して試験管の中で培養し、培養液中に放出される抗体を回収する方法です。1つの細胞から作りますので、できる抗体も1種類のみです。これをモノクローナル抗体と呼びます。



### ターゲットはトロポミオシン（TM）

えび・かにのアレルゲンとしてはトロポミオシンが一番重要であり、そのほかにアルギニンカイネースなど幾つかのマイナーなアレルゲンがありますが、今回はトロポミオシンをターゲットとして選択し、それに特異的に反応する抗体を作成して、サンドイッチELISA法で検出することを検出キット開発の基本コンセプトとしたわけです。ただ、各種甲殻類のトロポミオシンには概ね90%以上のア

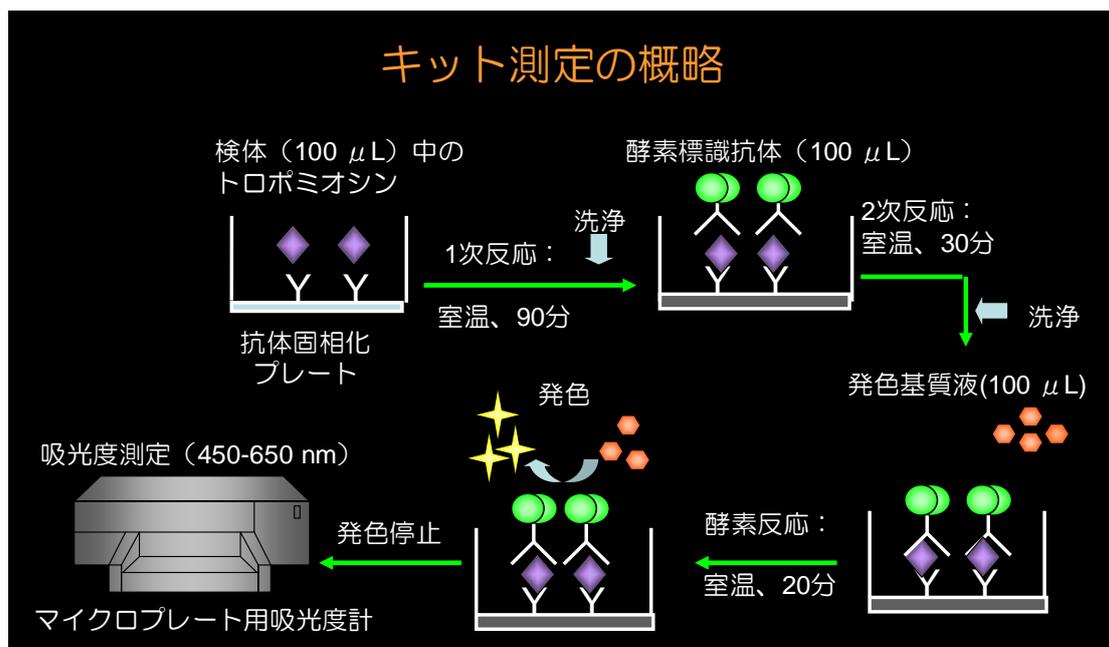
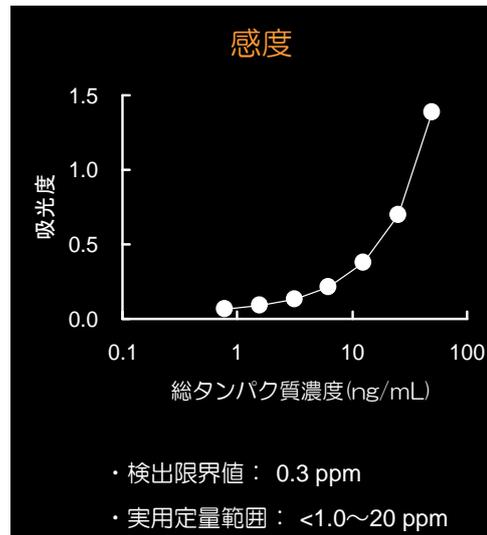


ミノ酸配列の相同性があり、甲殻類のトロポミオシンと軟体動物のトロポミオシンの類似度は60%位ということが分かり、エビとカニを見分けるのは難しいので一緒に検出してしまおう、でも軟体動物は引っかけないようにしよう、というコンセプトで抗体を選び、キットを構築いたしました。

## 甲殻類検出キット「マルハ」の特性

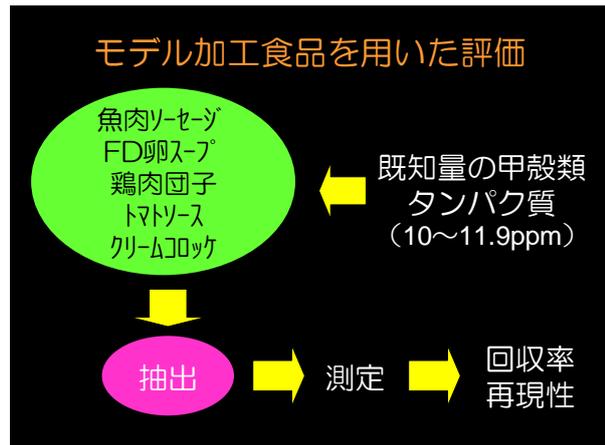
この4月、高感度、迅速な測定、信頼性、特異性という特徴を備えた甲殻類キット「マルハ」の販売を開始しました。まず**高感度**ですが、このグラフが標準曲線です。検出限界値0.3ppmということで、食品中にえび・かきが入っていれば0.3ppmぐらいからわかります。実用的定量範囲は1 ppmからで、30トンのザトウクジラの胃に、30グラムのクルマエビが1匹入っている場合でも、ザトウクジラを全部つぶして検査するとクルマエビを検出できるという感度です。

次に**迅速な測定**です。キットの測定の概略を図で示しております。先ほど試験管に抗体をくっつけておくと言いましたが、96ウェルのマイクロプレートの底面に抗体を固相化しております。そこにターゲットとなる物質を入れて、まず一次反応を行います。続いて、酵素標識をつけた抗体を二次反応でくっつけ、最後、酵素反応で発色させ、プレートリーダーで測定します。測定時間は約2時間20分です。



ただ、サンプルの調製に時間がかかります。食品サンプルをフードプロセッサーなどで均一に粉砕し、この調製試料からターゲットとなるたんぱく質を抽出いたします。抽出液には界面活性剤としてSDSを、還元剤としてメルカプトエタノールを添加しており、これを使って約15時間、一昼夜かけてやっと抽出できるわけです。この抽出法は森永生科研さんが改良を重ねて開発されたもので、アレルギー検査キット全てに共通のプロトコルになっております。イメージとしては、前の晩にこういったものを仕込んでおいて、朝一で測定を始めてお昼に終わるという作業フローになろうかと思えます。

3つ目に**信頼性**です。既知量、大体10～11.9ppmの甲殻類たんぱく質を入れたモデル加工食品として、魚肉ソーセージ、フリーズドライの卵スープ、鶏肉団子、トマトソース、クリームコロッケの5種類を作りまして、先ほど説明した抽出・測定を行って、実際に入れた量に対してどれだけ返ってくるかという回収率と、これを何施設かにやっていただいた際の測定値のばらつき、再現性を検証しました。



回収率は大体80～100%と良好です。室間再現性——施設間のデータのばらつき——は相対標準偏差で20%ぐらいとやや高めですが、これは2年前のデータで、製品はもうちょっと改善されております。厚生労働省のアレルギー検査ガイドラインで示されている回収率が50～150%、室間再現性が25%以下ですから、これをクリアしております。

#### 多施設評価試験

試料	機関数	平均 (ng/mL)	回収率 (%)	併行再現性 (%)	室間再現性 (%)
魚肉ソーセージ	10	10.28	102.8	4.9	20.5
FD卵スープ	9	11.52	96.8	3.6	17.6
トマトソース	10	9.58	95.8	9.3	17.6
クリームコロッケ	10	8.21	82.1	9.9	18.8
鶏肉団子	10	10.00	100.0	6.1	19.2

4つ目は**特異性**です。まず甲殻類について、今回の義務表示の対象となっている十脚目に属するものと、その他の甲殻類について調べました。表に示したように、その他の甲殻類に比べて十脚目の反応性が非常に高く、特異性が高いことを示しています。ちょっと心配していた軟体動物との反応性は、代表的な頭足類、二枚貝類、腹足類を測ってみました。が、いずれも定量限界未満になっております。ただ、これ以外の品目で思

#### 甲殻類との反応性

<十脚目>		<その他の甲殻類>	
種名	反応性(%)	種名	反応性(%)
ブラックタイガー	100	シャコ	7.6
ホコアカビ	66	オキアミ	1.2
イセエビ	114	アミ	0.1
キューパロワスター	106	フジツボ	< 0.1
タラバガニ	39	カメノテ	< 0.1
ガザミ	29		

わぬ反応性を示すものがあるかもしれません。その他の原材料についても特に目立った反応性を示すものはございませんでした。特異性に関しましては、とりあえず今回調べた範囲では、甲殻類は検出される、甲殻類以外は検出されないということで、ある程度特異性の高いキットに仕上がったかなと思っております。

### 交差反応性をチェックした軟体動物・その他原材料

<b>軟体動物</b>	
頭足類	マダコ ミズダコ イイダコ スルメイカ ヤリイカ* モンコウイカ*
二枚貝類	ホタテガイ マガキ アカガイ イガイ アサリ シジミ ハマグリ ホッキガイ
腹足類	サザエ、アワビ*、ツブガイ
<b>その他原材料</b>	
肉・卵・乳製品	鶏肉* 豚肉* 牛肉* 鶏レバー 豚レバー 牛乳** 鶏卵** ウズラ卵 ゼラチン
穀類・豆	米 小麦** そば** ごま 大豆* 小豆 コーヒー
果実・ナッツ	バナナ* リンゴ* キウイ* オレンジ* モモ* 落花生** クルミ* アーモンド カシューナッツ
スパイス	コショウ(黒) わさび
野菜・キノコ・芋	カボチャ ナス タマネギ タケノコ ショウガ ニンニク シイタケ マツタケ* ヤマイモ* ジャガイモ サツマイモ
魚介類・藻類	サケ* サバ* タラ スケトウダラ PW イトヨリ タチウオ グチ ホッケ アジ エソ トビウオ イワシ イクラ* タラコ コンブ ワカメ 寒天

\*\*は表示義務品目、\*は表示推奨品目、

### 市販加工食品を測ってみると

実際に市販加工食品を測ってみました。缶詰22品目、冷凍食品16品目、デザート4品目、レトルト食品9品目、漬物・調味料・菓子・即席麺13品目の合計64品目を対象にしましたが、加熱のきついレトルト食品を含め、「かに」「かにエキス」「えび」など甲殻類含有表示のある23品目は全て検出されましたが、表示のない品目はいずれも検出されませんでした。

ただ、この64品目以外で思わぬ反応性を示すケースがありました。のりや魚肉ソーセージ、ちくわなどの練製品では、えび・かにを使っていないのに検出されることがあります。厚生労働省や弊社同様にえび・かにキットを販売しておられるニッスイさんと検討し、えび・かにを使用したつもりがなくても、次の2つが原因となり、最終製品に混入することがあり得るのではないかとということになりました。

#### 思わぬ反応性を示すケース

品名	検出例
<練り製品>	
魚肉ソーセージ	1.5~2.5 ppm
ちくわ	3.5~9.6 ppm
<のり>	
味付海苔・焼海苔	8.1~15.3 ppm

- ①当該原材料がえび、かにを補食していること。
- ②原材料である魚介類を網で無分別に採取する際に混獲すること。

魚肉ソーセージやちくわなどの練製品の原料はすり身です。すり身は、原魚の頭や内臓をとり、よく洗ってフィレにし、それをすり潰して砂糖などの凍結変性防止剤を加えて凍結したものです。最初、原魚に何か原因があるのかなと、3枚におろして測ったのですが、全く反応しません。すり身という特異的なたんぱく構造が、うちのキットだけに何かしらの擬陽性を示させるのではないかとということになり、実際にすり身をつくり測

ってみました、これも全く反応しません。

原魚における反応性 (ppm)				自家製すり身における反応性	
魚種	測定値	魚種	測定値	魚種	測定値(ppm)
スケトウダラ	<1.0	ホッケ	<1.0	スケトウダラ	<1.0
PW	<1.0	アジ	<1.0	タチウオ	<1.0
イトヨリ	<1.0	エソ	<1.0	グチ	<1.0
タチウオ	<1.0	トビウオ	<1.0	ホッケ	<1.0
グチ	<1.0	イワシ	<1.0	エソ	<1.0

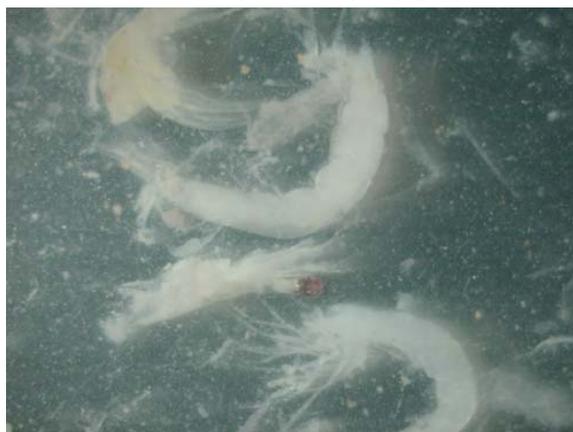
PW: パシフィックホワイトティング

わけがわからなくなり、えいと思って腹の中をみました。パシフィックホワイトの胃袋の中身を実体顕微鏡で観察すると、何か見覚えのあるものが入っているのです。専門の先生の判断はえびでした。スケトウダラの胃内容物をみたらえびが丸ごと入っています。雑に加工して、胃の中に入っていた甲殻類が漏れ出して、それがすり身の中にまじり、検出の原因になったと推測されます。

**PW胃内容物**



**スケトウダラ胃内容物**



各種のすり身を片端から測り、検出された例を一覧にしたのがこの表です。タチウオとかシログチのすり身が高い値を示しています。

**すり身からの甲殻類検出例**

魚種名	検出例(ppm)	魚種名	検出例(ppm)	魚種名	検出例(ppm)
スケトウダラ	<1.0~3.7	タチウオ	5.3~27.0	アジ	<1.0~7.7
PW	1.1~4.7	エソ	1.3	ヒメジ	2.0
南ダラ	<1.0	シログチ	<1.0~54.6	トビウオ	<1.0
イトヨリ	1.3~7.6	ホッケ	2.7~11.3		

あくまでも推測ですが、スケトウダラ、パシフィックホワイトティング、南ダラというのは非常に大きな魚で、機械で内臓をきっちり除きますから胃内容物が流出することはないのですが、イトヨリ、タチウオ、シログチなどは、大きいものは食卓に供され、非常に小さな魚しかすり身になりません。丁寧に魚肉だけを取り出すのはやめて、頭だけ

落としてすり身にすると、胃の中のものが出て、こんな値になるのではないかと思います。こういうすり身を原料とする練製品からも検出されてしまうことがあります。タコは、非常にえび・かにの好きな生物で、塩辛みたいに足も頭も内臓も一緒に加工してしまうようなものは、やはり胃内容物が出てきて、検出されてしまうことがあります。

#### 練製品等からの検出例(捕食)

品名	検出例
<練り製品>	
魚肉ソーセージ	1.5~2.5 ppm
ちくわ	3.5~9.6 ppm
かまぼこ	2.3~5.5 ppm
<タコ>	
塩辛	1.5 ppm

2つ目の可能性の混獲です。パック詰めのだしシラスを閲覧になると、えび、たこ、イカなどの赤ちゃんが入っているのが分かると思いますが、目に見えるものを除いても、測ったら数十 ppm検出されました。実体顕微鏡でその中身を観察しますと、糸くずみたいなえびが沢山入っています。ジャコでも検出されます。あとノリなのですが、のりの養殖場所には小さなえび・かにが沢山すみついています。ノリの収穫は、バキュームポンプみたいなもので一気に吸い取りますから、小さいえび・かにも一緒に入ってきてしまいます。目にみえる大きさのものは取り除いて商品化するのですが、どうしても100%取り除くことは難しいということで、8~15ppmぐらい検出される例があります。エビ等級ノリは2級品扱いで出ているものですが、その表面には明らかにエビの残渣がたくさんくっついておりまして、これを測ると550ppmという値が出てくるときもあります。

#### 釜揚げシラス中の微小甲殻類



#### のり・シラス等からの検出例(混獲)

品名	検出例
<のり>	
味付け海苔・焼き海苔	8.1~15.3 ppm
エビ等級のり	70~550 ppm
<じゃこ・しらす>	
しらす(未分別)	78.5 ppm
じゃこ	1.5 ppm

原魚による捕食や混獲によるえび・かにのコンタミネーションについて、国立衛研、ニッスイさんと共同で実態調査を行った結果をまとめると、0.3mg/gという検出限界以上のものがかなりあります。10ppmというのが行政検査上陽性と判定される値になっていますが、これ以上検出されるものも、多いもので50%ぐらい、その他で数%程度出てきます。

#### コンタミネーションの実態調査

	検体数	0.3 mg/g	10 mg/g
		以上検出	以上検出
のり製品	85	27 (31.8%)	4 (4.7%)
いわし稚魚製品 (しらす、ちりめんじゃこ等)	52	48 (92.3%)	26 (50.0%)
すり身	132	59 (44.7%)	11 (8.3%)
二枚貝	36	3 (8.3%)	3 (8.3%)

S. Sakai et al. *Jap. J. Food Chem.*, 15, 12-17 (2008)

こういった実態調査を受け、予期せぬコンタミネーションの表示に関しての厚生労働省のコメントが出ております。基本的には、入っているかもしれないという可能性表示は認められない、使った覚えはないがコンタミネーションの可能性が想定できる場合には明確に注意喚起して下さいということで、注意喚起の例も示されています。

#### コンタミネーションの表示に関して

コンタミネーションしてしまう場合には、原材料表示欄外にその旨注意喚起をすることが望ましいです。

ただし、原材料表示欄外であっても、特定原材料等に関して「入っているかもしれない」などの可能性表示は認められませんので（C-1参照）、同一製造ラインを使用することや原材料の採取方法等により、ときにある特定原材料等が入ってしまうことが想定できる場合には、明確に**注意喚起**をしてください。

#### ＜注意喚起の例＞

##### ○原材料の採取方法によるコンタミネーション

「本製品で使用しているしらすは、かに（特定原材料等の名称）が混ざる漁法で採取しています。」

##### ○えび、かにを捕食していることによるコンタミネーション

「本製品（かまぼこ）で使用しているイトヨリダイは、えび（特定原材料等の名称）を食べています。」

平成20年6月3日付食安基発第0603001号、食安監発第0603001号「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」別添2アレルギー物質を含む食品に関する表示Q&Aより抜粋

コンタミの心配な商品すべてに厚生労働省が示すような注意喚起を書き添えてしまえば解決してしまう問題なのですが、そうすると、えび・かにのアレルギーをもつ患者さんやご家族の方の食品選択の幅を非常に狭めることとなりますので、こういったことは極力避け、できればしっかりと検査した上で、しっかりとしたサイエンティフィックな根拠のもとに表示を進めていきたいと思っております。

#### ————— 質疑応答 —————

Q（福山大 倉掛）のりや練製品にエビ成分が含まれる場合があるということですが、のりや練製品を食べてえびアレルギーになった例はあるのでしょうか。

A キット開発の過程で初めてののりや練製品に甲殻類たんぱくが含まれることがあるということが明らかになったわけで、報告はありません。国と一緒に調査を進めていきたいと考えているのが現状です。

Q（文教大 中島）えび・かにのアレルギーは年齢が高くなってから発症するというのはどのような理由でしょうか。

A 良くわかっておらず、食べる機会が多くなるからかもしれないぐらいしか考えられません。宿題にさせてください。似た話で、イクラのアレルギーを1～2歳の子が発症するケースが最近増えています。離乳食に混じっていると考えるのが一つ考えられますが、良くわかりません。