

受賞者総説

魚貝類アレルギーに関する食品化学的研究

平成 16 年度日本水産学会賞奨励賞受賞

濱田 友貴*

長崎大学水産学部

Food-chemical studies on allergens of fish and shellfish

YUKI HAMADA*

Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

花粉症やアトピー性皮膚炎などと同様食物アレルギーも患者数の増加が指摘されているが、食物アレルギーは生命を維持するために不可欠な食物が原因であるだけでなく、重篤な場合はアナフィラキシーショックによる生命の危険もあるため問題はより深刻である。アレルギー原因食品としては卵、牛乳、小麦、大豆などの農畜産物が世界的に有名であるが、平成 9 年度厚生省（現厚生労働省）食物アレルギー対策検討委員会の報告書によると、わが国における原因食品として魚貝類は重要で、とくに成人では原因食品の第 1 位はエビ・カニ類、第 2 位は魚類が占めている。しかし平成 14 年 4 月に施行されたアレルギー物質を含む食品の表示義務では、その情報量の少なから魚貝類については表示の奨励にとどまっている。

魚貝類中のアレルギーに関するこれまでの研究のほとんどは欧米で行われている。まず、1960 年代から 1980 年代初めにかけて Aas と Elsayed によってタラ類 *Gadus callarias* の主要アレルギー $Gad\ c\ 1$ がパルブアルブミン (PA) として同定され、エピトープ解析も行われた。^{1,2)} その後 1990 年代後半にアトランティックサーモン (*Salmo salar*),³⁾ マアジ⁴⁾ およびコイ⁵⁾ のアレルギーも PA であると証明された。また、イムノブロットによる検索例も多く、いずれも普遍的な主要アレルギーは PA であること示唆している。⁶⁻⁹⁾ イムノブロット分析ではいくつかのマイナーアレルギー⁶⁻⁹⁾ が検出されているが、タラ類からのアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ¹⁰⁾ を除きいずれのタンパク質も詳しい性状は明らかにされていない。また、甲殻類においてはインドエビ *Penaeus indicus*,¹¹⁾ ブラウンシュリンプ *Penaeus aztecus*,¹²⁾ ヨシエビ *Metapenaeus ensis*,¹³⁾ アメリカンロブスター

Homarus americanus,¹⁴⁾ イセエビ *Panulirus stimpsoni*¹⁴⁾ およびカニ類 *Charybdis feriatus*¹⁵⁾ からいずれもトロポミオシンが主要アレルギーとして同定されており、軟体動物ではスルメイカ,¹⁶⁾ マダコ,¹⁷⁾ マガキ,¹⁸⁻²⁰⁾ サザエ,²¹⁾ アワビ類 *Haliotis diversicolor*²²⁾ など甲殻類同様トロポミオシンが主要アレルギーとして報告されている。

このように魚類では PA、甲殻類・軟体動物ではトロポミオシンが主要アレルギーとして同定されているが、わが国では欧米よりはるかに多種多様な魚貝類を摂取している、すなわち感作される魚貝類の種類が多様であるので、欧米での知見がそのまま適応できるかどうかは疑問であり、独自の取り組みが必要であると考えられる。ここでは、これまでに重点的に取り組んできた魚類アレルギーと一部加工食品のアレルギー性に関する研究の成果を紹介する。

1. 魚類の新規アレルギー (コラーゲン) に関する研究²³⁻²⁵⁾

魚貝類アレルギーに関するこれまでの研究は抽出液のイムノブロット分析または RAST によるものが主流であり、精製アレルギーを用いて比較検討することは皆無に等しかった。そこでウナギとメバチのアレルギー精製を目的に、加熱抽出液をゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-75) に供して魚類アレルギー患者血清を用いた ELISA によってアレルギーの挙動を調べた。その結果、分子量の異なる 2 種類のアレルギーの存在を認めた。低分子アレルギーはその後逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) に供して精製を行い、その部分アミノ酸配列、SDS-PAGE による分子量測定および市

* Tel/Fax : 81-95-819-2854. Email : yuhamada@net.nagasaki-u.ac.jp

販の抗 PA モノクローナル抗体との反応性より従来の報告通り PA と同定した。すなわち、ウナギおよびメバチにおいても PA がアレルゲンとなることが証明された。²³⁾

一方、高分子アレルゲン画分には、各種クロマトグラフィーにおいて挙動の類似した多数の成分が検出されたので、加熱抽出液からの精製を断念し、魚筋肉から常法により各筋肉画分にわけてアレルゲン性の評価を行った。その結果、この高分子アレルゲンは筋基質タンパク質画分に存在するこれまでに報告例のないコラーゲンであることを究明した。上述の高分子アレルゲン画分に認められた多数の成分は、加熱抽出液調製中のコラーゲンの断片化により生成したと判断された。しかし同時に、加熱してもコラーゲンのアレルゲン性が低下することがほとんどないことも明らかになった。

さらに、精製 PA とコラーゲンをを用いて 20 名の魚類アレルギー患者血清との反応性を検討したところ、12 名が PA のみに陽性、4 名がコラーゲンのみに陽性、3 名が両方に陽性、1 名が両方に陰性であり、コラーゲンはわが国の魚類アレルギー患者の約 1/3 が認識し、PA に次いで重要な魚類アレルゲンであると考えられる。なお、各種魚類コラーゲンはお互いに高い抗原交差性を示したが、哺乳類由来のコラーゲンとの交差性はみられなかった。

現在ニジマスコラーゲンの $\alpha 2$ 鎖について IgE 結合エピトープの検索を行っているが、アテロコラーゲンの c 末端領域に患者血清との反応性を認めている。

コラーゲンは低温下では水に不溶で、加熱条件によっては分解を受けるので、これまでのイムノプロットによる研究では見落とされてきたと思われる。そこで、PA とコラーゲンをイムノプロットで同時検出する方法を検討した結果、魚肉を 80°C、20 分間加熱して抽出液を調製することが最適であることをみいだした。本抽出法は、イムノプロットのみならず魚類アレルギーの診断に一般的に用いられている RAST などの診断用抗原の調製にも有効であると考えられる。

2. 魚類の主要アレルゲン (PA) に関する研究

各種魚類から PA を精製し、複数の患者血清を用いた ELISA によってアレルゲン性²³⁾および抗原交差性を確認した。²⁶⁾しかし、その反応性は患者および魚種により差があり、エピトープの違いあるいは含量の差が示唆された。エピトープ解析には一次構造の情報が必須であるので、マサバ、マアジなど数種魚類の PA の一次構造を cDNA クローニング法で解析し、いずれも β type の PA であることを明らかにした。²⁶⁾ PA は Ca^{2+} 結合能を持つタンパク質であるが、 Ca^{2+} 非存在下でのアレルゲン性の低下はわずかで、主要な IgE 結合エピトープは

一次構造にあると判断した。そこでマサバ PA について、一次構造をもとに全長をカバーするオーバーラップペプチドを合成し、阻害 ELISA により主要な IgE 結合エピトープを含む領域を推定した。その結果、Gad c 1 で推定されている IgE エピトープとは異なる領域にもエピトープが存在することが示唆された。さらに、魚類アレルギーの診断・治療における標準抗原の安定供給を目的としてマサバ PA を大腸菌で発現し、リコンビナント PA を得た。²⁷⁾ このアレルゲン性は精製 PA と同等であり、標準抗原として適応できると判断した。

さらに、普通筋中の PA 含量は各魚種で大きく異なり、アレルゲン性の評価にはエピトープと含量の両要素を考慮しなければならないと考えられた。そのほか、普通筋と一緒に摂取される魚類の血筋中の PA は普通筋と同じアミノ酸配列であるが、含量が著しく低くアレルゲン性が弱いことも明らかになった。このことから、魚類アレルギー研究においては、これまで同様普通筋を用いて問題ないと判断した。

一方、PA は魚類筋肉中だけでなく両生類の筋肉にも多量に含まれている。食用ガエルは中華やフランス料理の食材として世界中で食用とされ、その摂取によるアレルギー発症例が知られているうえ、ごく最近、アレルゲンとして PA が報告されている。^{28,29)} そこで魚類アレルギー患者とわが国で食用とされているウシガエル (*Rana catesbeiana*) PA との反応性を確認するために、ウシガエルから PA を精製し、 α type と β type のアイソマーを得た。³⁰⁾ 魚類アレルギー患者の血清のほとんどはカエル PA、特に β type の PA と高い陽性反応を示し、抗原交差性があることも明らかにした。よって、魚類アレルギー患者はカエルの摂取にも十分気をつける必要があるといえる。

3. 水産加工食品のアレルゲン性に関する研究

低アレルゲン化水産加工食品の開発を視野に入れ、魚肉練り製品および魚貝類エキスのアレルゲン性を検討した。魚肉練り製品 (かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつまあげ、つみれ、魚肉ソーセージ) とその主原料であるスケトウダラ洋上すり身 SA 級、陸上すり身 C 級の場合、PA を認識する魚類アレルギー患者に対して、イワシ肉が主原料であった“つみれ”を除きアレルゲン性をほとんど示さなかった。³¹⁾ PA は水溶性のタンパク質であるため、すり身製造工程の水さらしによって除去されるためであると考えられた。そこで、スケトウダラからすり身を実験室レベルで調製し、水さらし工程中の PA の移行状況を検討したところ、魚肉重量に対し 10 倍量の水を用いる場合、3 回の水さらしによって魚肉中の PA は ELISA の検出限界以下になることを実証した。一方、コラーゲンは水さらしでほとんど除去できず、そ

の低減化は今後の検討課題である。

エキスは各種食品に幅広く使用され、気付かずに摂取して発症する危険性もあるため、そのアレルギー性の評価は重要である。市販のエキスでは製造会社やロットによってアレルギー性に差が認められた。魚肉エキスの場合 IgE 結合エピトープを含むコラーゲン断片が残存しており、SDS-PAGE での検出は不可能であるが ELISA によって反応性が確認された。また、甲殻類エキスではトロポミオシンまたは IgE 結合エピトープを含むトロポミオシン断片が残存していた。³²⁾ なお、いずれも酵素処理によって低減化が可能であることを見だしている。

4. おわりに

水産食品の安全・安心が見直されている現在、魚貝類アレルギー問題も無視できない。より正確な診断・治療・予防を行うためにも、さらに多くの情報が必要であろう。今後、各種魚貝類のアレルギー性評価、アレルギーの一次構造解析、エピトープ解析、食品表示に対応した微量アレルギーの迅速検出法、低アレルギー化食品の開発などの課題に取り組み、水産食品の安全性の確保の一環として魚貝類アレルギー解決への情報提供に努めたいと考えている。

謝 辞

本研究のきっかけとなった研究テーマを与えていただき、さらに終始懇切なご助言とご指導を賜りました東京海洋大学 塩見一雄先生に深く感謝いたします。また本研究の遂行に際し、貴重なご助言を数多く頂きました東京海洋大学 長島裕二先生、嶋倉邦嘉先生、共同研究を通じて多くのご助言とご指導を賜りました東京海洋大学 石崎松一郎先生、潮秀樹先生、石田真巳先生、東京大学農学部 八村敏志先生、患者血清の提供にご協力を頂いた千葉大学医学部 河野陽一先生、下条直樹先生、横浜市立大学医学部 池澤善郎先生、大砂博之先生、国立療養所南福岡病院 西間三馨先生、柴田瑠美子先生に厚くお礼申し上げます。また、本研究では東京海洋大学食品衛生化学研究室の多くの卒業生および学生にご協力いただきました。紙面をお借りしてお礼申し上げます。

文 献

- Elsayed S, Aas K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1971; **40**: 428-438.
- Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand. J. Immunol.* 1975; **4**: 203-208.
- Lindström CDV, van Dô T, Hordvik I, Endresen C, Elsayed S. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand. J. Immunol.* 1996; **44**: 335-344.
- Shiomi K, Hayashi S, Ishikawa M, Shimakura K, Nagashima Y. Identification of parvalbumin as an allergen in horse mackerel muscle. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 300-304.
- Bugajska-Schretter A, Pastore A, Vangelista L, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. Molecular and immunological characterization of carp parvalbumin, a major fish allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999; **118**: 306-308.
- Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM, Sampson HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; **89**: 730-737.
- Pascual C, Esteban MM, Crespo JF. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J. Pediatr.* 1992; **121**: S29-S34.
- Hansen TK, Bindslev-Jensen C, Skov PS, Poulsen LK. Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1997; **78**: 187-194.
- James JM, Helm RM, Burks AW, Lehrer SB. Comparison of pediatric and adult IgE antibody binding to fish proteins. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1997; **79**: 131-137.
- Das Dores S, Chopin C, Romano A, Galland-Irmouli AV, Quarantino D, Pascual C, Fleurence J, Gueant JL. IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allergen of codfish. *Allergy* 2002; **57**: 84-87.
- Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Subba Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. Immunol.* 1993; **151**: 5354-5363.
- Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994; **105**: 49-55.
- Leung PSC, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, Nagy SM, Gershwin ME. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; **94**: 882-890.
- Leung PSC, Chen YS, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin, as a seafood allergen. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1998; **7**: 12-20.
- Leung PSC, Chen YS, Gershwin ME, Wong SH, Kwan HS, Nagy SM, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998; **102**: 847-852.
- Miyazawa H, Fukamachi H, Inagaki Y, Reese G, Daul CB, Lehrer SB, Inoue S, Sakaguchi M. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; **98**: 948-953.
- Ishikawa M, Suzuki F, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of tropomyosin as a major allergen of the octopus *Octopus vulgaris* and elucidation of its IgE-binding epitopes. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 934-942.
- Ishikawa M, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Isolation and properties of allergenic proteins in the oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 610-614.
- Ishikawa M, Ishida M, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Tropomyosin, the major oyster *Crassostrea gigas* allergen and its IgE-binding epitopes. *J. Food Sci.* 1998; **63**: 44-47.
- Ishikawa M, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of the

- oyster allergen Cra g 2 as tropomyosin. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 854-855.
- 21) Ishikawa M, Ishida M, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Purification and IgE-binding epitopes of a major allergen in the gastropod *Turbo cornutus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; **62**: 1337-1343.
- 22) Chu KH, Wong SH, Leung PS. Tropomyosin is the major mollusk allergen: reverse transcriptase polymerase chain reaction, expression and IgE reactivity. *Mar. Biotechnol.* 2000; **2**: 499-509.
- 23) 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.* 1999; **65**: 592-595.
- 24) Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of collagen as new fish allergen. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2001; **65**: 285-291.
- 25) Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K, Shimojo N, Kohno Y, Shibata R, Nishima S, Ohsuna H, Ikezawa Z. Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. *Allergol. Int.* 2003; **52**: 139-147.
- 26) Hamada Y, Tanaka H, Ishizaki S, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen mackerels. *Food. Chem. Toxicol.* 2003; **41**: 1149-1156.
- 27) Hamada Y, Tanaka H, Sato A, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Expression and evolution of IgE-binding capacity of recombinant pacific mackerel parvalbumin. *Allergol. Int.* 2004; **53**: 271-278.
- 28) Romano C, Ferrara AM, Cislighi C, Falagiani P. Food Allergy to frog. *Allergy* 2000; **55**: 584-585.
- 29) Hilger C, Grigioni F, Thill L, Mertens L, Hentges F. Severe IgE-mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs: definition of α -parvalbumin as the allergen in cause. *Allergy* 2002; **57**: 1053-1058.
- 30) Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Reactivity of IgE in fish-allergic patients to α - and β - parvalbumins purified from the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Fish. Sci.* 2004; **70**: 1137-1143.
- 31) 濱田友貴, 源河えりな, 大平倫敬, 長島裕二, 塩見一雄. 魚肉ねり製品及びスケトウダラすり身のアレルゲン性. *食衛誌* 2001; **41**: 38-43.
- 32) Shimakura K, Tonomura Y, Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion. *Food. Chem.* 2005; **91**: 247-253.