

博士学位論文

魚類アレルギーにおける主要アレルゲンの
アレルゲン性および低アレルゲン化手法の有効性に関する検討

東京薬科大学

2019 年度

栗栖（倉田） 香織

目次

緒論.....	1
第1章 魚種による魚肉中に含まれる PA の IgG 反応性の違いに関する検討.....	6
1-1. 序論.....	6
1-2. 材料および方法.....	8
1-2-1. 試料.....	8
1. 検討に用いた魚種.....	8
2. 評価用の魚肉抽出液の調製.....	8
3. クロマグロの市販ブロックを用いた検討.....	8
4. IgE 反応性の評価用血清.....	8
1-2-2. マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による IgG 反応性の評価.....	9
1-2-3. 患者血清を用いた ELISA 法による IgE 反応性の評価.....	9
1-2-4. タンパク質定量.....	10
1-2-5. SDS-PAGE.....	10
1-2-6. 魚肉可食部からの PA の精製.....	10
1-2-7. 精製 PA を用いた ELISA 法による PA 定量.....	11
1-2-8. 統計解析.....	11
1-2-9. 倫理的配慮.....	11
1-3. 結果.....	12
1-3-1. サケ科に属する 12 魚種の IgG 反応性および IgE 反応性に関する検討.....	12
1-3-2. 大型魚類の頭部から尾部にかけての IgG 反応性の変化.....	12
1-3-3. 日本で食されている 124 魚種の IgG 反応性の比較検討.....	27
1. 軟骨魚綱に属する 3 種の評価結果.....	27
2. 硬骨魚綱に属する 121 種の評価結果.....	27
1-3-4. シロザケ, シシヤモ, シログチの魚肉中の PA 含有量の測定.....	28
1-4. 考察.....	31
1-4-1. サケ科 12 魚種の IgG 反応性および IgE 反応性の比較.....	31
1-4-2. 食品表示制度に残る問題点.....	31
1-4-3. 大型魚類の頭部から尾部にかけての IgG 反応性における部位依存的な変化.....	31
1-4-4. 日本で食されている 124 魚種の比較.....	32
1-4-5. 魚種による PA 含有量の違いと水晒しによる低アレルゲン化効果.....	33
1-5. 小括.....	34
第2章 カタクチイワシ魚肉に含まれる PA およびコラーゲンの 酵素処理による IgE 反応性の	

低減化に関する検討.....	35
2-1. 序論.....	35
2-2. 材料および方法.....	37
2-2-1. 試料.....	37
2-2-2. 魚肉の酵素処理による評価用エキス試料の調製.....	38
2-2-3. カタクチイワシ PA の精製.....	38
2-2-4. IgG 反応性の評価のための ELISA 測定.....	39
2-2-5. IgE 反応性の評価のための ELISA 測定.....	39
2-2-6. IgE 反応性の評価のための阻害 ELISA 測定.....	40
2-2-7. SDS-PAGE と等電点電気泳動 (Isoelectric focusing, IEF).....	40
2-2-8. GPC.....	41
2-2-9. 官能性評価.....	41
2-2-10. ヒスタミン定量.....	41
2-2-11. 統計解析.....	41
2-2-12. 倫理的配慮.....	41
2-3. 結果.....	42
2-3-1. カタクチイワシ PA の精製とアイソフォーム評価.....	42
2-3-2. 酵素処理した評価用エキス試料の風味の確認とヒスタミン量および分子量の測定.....	44
2-3-3. 魚肉の酵素消化による PA とコラーゲンの IgG 反応性の低減化効果.....	44
2-3-4. 魚肉の酵素消化による PA とコラーゲンの IgE 反応性の低減化効果.....	44
2-3-5. 魚肉の酵素消化による PA とコラーゲンの IgE 反応性の低減化効果の再評価... ..	49
2-3-6. 患者血清による IgE 反応性の違い.....	49
2-4. 考察.....	51
2-4-1. カタクチイワシ PA の性質.....	51
2-4-2. 食品製造加工用酵素を用いた低アレルギー化エキスの調製手法の確立.....	51
2-4-3. 酵素処理した評価用エキス試料の IgE 反応性低減化効果.....	51
2-4-4. 酵素処理した評価用エキス試料の今後の検討課題.....	52
2-5. 小括.....	53
第 3 章 水晒し・肉挽き・KCl 水溶液による魚肉中の PA およびコラーゲンの 除去効果を活用した低アレルギー化かまぼこの調製.....	54
3-1. 序論.....	54
3-2. 材料および方法.....	56
3-2-1. 試料.....	56
3-2-2. かまぼこ製品および原料魚肉の蛍光 ELISA 法による IgE 反応性の評価.....	56
3-2-3. 水晒し処理.....	57

3-2-4. 肉挽き処理.....	57
3-2-5. 中性塩水溶液を用いた AM 画分の調製.....	57
3-2-6. SDS-PAGE.....	58
3-2-7. 水産練り製品の各製造工程における ELISA 法による IgG 反応性の評価.....	58
3-2-8. 蛍光 ELISA 法による水産練り製品の各製造工程における IgE 反応性の評価....	58
3-2-9. すり身を原料とした低アレルゲン化かまぼこの調理加工.....	58
3-2-10. ゲル強度および水分量の測定.....	59
3-2-11. 統計解析.....	59
3-2-12. 倫理的配慮.....	59
3-3. 結果.....	60
3-3-1. 市販かまぼこ製品の IgE 反応性の評価.....	60
3-3-2. 水晒し回数による PA 含有量の減少効果.....	60
3-3-3. 肉挽きによるコラーゲン含有量の減少効果.....	60
3-3-4. 溶解性の差を利用したコラーゲンの除去効果.....	63
3-3-5. 各工程における低アレルゲン化効果.....	64
3-3-6. 市販の冷凍すり身を原料とした低アレルゲン化かまぼこの調製.....	66
3-3-7. すり身 AM 画分から調製したかまぼこの物性評価.....	66
3-4. 考察.....	67
3-4-1. 水産練り製品の IgE 反応性.....	67
3-4-2. 水産練り製品の各製造工程における IgG/IgE 反応性の低減化効果.....	67
3-4-3. PA およびコラーゲンが除去された低アレルゲン化かまぼこの開発.....	68
3-5. 小括.....	70
4 章 食物アレルギー歴の聞き取りで想定される患者発話に関する意識・実態調査.....	71
4-1. 序論.....	71
4-2. 調査方法.....	73
4-2-1. Web アンケートの実施と基本回答者群の作成.....	73
4-2-2. FA の症状およびアレルゲンを含む食品に関する認知率の検討.....	73
4-2-3. 自発的発話の言語量の検討.....	73
4-2-4. 情報充足率の検討.....	74
4-2-5. 再質問による回答の不一致の検討.....	74
4-2-6. 言語解析ソフトウェアを用いた FA 情報に関する要望分析.....	74
1. 要望カテゴリの作成.....	74
2. 手本の作成.....	75
3. 手本を用いた分類の学習.....	75
4. 大量データの取得と自動分類.....	75
4-2-7. 倫理的配慮.....	75

4-3. 結果.....	76
4-3-1. Web アンケートの回答者属性	76
4-3-2. FA 症状の認知率	78
4-3-3. アレルゲンを含む食品に関する認知率.....	78
4-3-4. 自発的な発話の言語量.....	83
4-3-5. 自発的発話における情報充足率.....	85
4-3-6. FA 症状に関する聞き方を変えた時の自由記述回答	85
4-3-7. FA 関連情報に対する要望分析	86
4-4. 考察.....	90
4-4-1. FA の情報に関する認知率	90
4-4-2. FA の知識が患者発話に与える影響	90
4-4-3. FA に関する正しい情報の普及	91
4-5. 小括.....	93
結論.....	94
謝辞.....	97
参考文献.....	98
研究結果の掲載誌.....	106

略語表

本文では、以下の略語を使用する。

AIC: Anion exchange chromatography, 陰イオン交換クロマトグラフィー

AM: Actmyosin, アクトミオシン

BSA: Bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン

CBB: Coomassie brilliant blue, クーマシーブリリアントブルー

DIW: Deionized water, 脱イオン水

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline, ダルベッコ生理食塩水

DTT: Dithiothreitol, ジチオトレイトール

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合免疫吸着法

FA: Food allergy, 食物アレルギー

GPC: Gel permeation chromatography, ゲル浸透クロマトグラフィー

HRP: Horseradish peroxidase, 西洋ワサビペルオキシダーゼ

IEF: Isoelectric focusing, 等電点電気泳動

OFC: Oral food challenge, 食物経口負荷試験

OD: Optical density, 光学密度

One-way ANOVA: One-way analysis of variance, 一元配置分散分析

PA: Parvalbumin, パルブアルブミン

PB: Phosphate buffer, リン酸緩衝液

PBS: Phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水

RPC: Reverse phase chromatography, 逆相クロマトグラフィー

SD: Standard deviation, 標準偏差

SDS: Sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, ポリアクリルアミド電気泳動

TFA: Trifluoroacetic acid, トリフルオロ酢酸

TMB: Tetramethylbenzidine, テトラメチルベンジジン

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane, トリスヒドロキシメチルアミノメタン

緒論

食物アレルギー (Food allergy, FA) は「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義される (日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会, 2018). FA に苦しむ患者の数は年々増加しており (Sampson, 2004; Seheila *et al.*, 2006), 卵や牛乳, 米, 大豆, ピーナッツ, 果物, 魚介などで誘発される FA を克服するための研究が急務である. 日本では, 魚介類は主菜の一つであり, 動物性タンパク質の 40% が水産加工品から摂取されている. 魚類や甲殻類の摂取で誘発される魚介アレルギーの発症頻度は, 日本や東南アジア, 北ヨーロッパ, スペイン, イタリアのように, 食餌における魚介類の摂取量が多い地域ほど高い (Schiere, 2011; Hajab & Seamat, 2012). 魚介アレルギーは, 魚肉によるものの他に, 魚肉に存在する寄生虫によるもの (Daschner *et al.*, 2000), 魚卵によるもの, 甲殻類によるもの, 軟体類によるもの, 貝類によるものに分類される (Ruethers *et al.*, 2018).

魚肉により引き起こされる魚類アレルギーの主要アレルゲンは, パルブアルブミン (Parvalbumin, PA) とコラーゲンである (Ruethers *et al.*, 2018). 魚類アレルギーの発症頻度は, β' -コンポーネント (ビテロジェニン由来) を主要アレルゲンとする魚卵や (Kondo, 2005; Shimizu, 2009, 2014), トロポミオシンを主要アレルゲンとする甲殻類アレルギー (Motomiya, 2007; Ribeiro *et al.*, 2018) よりも低い, 食用とされている魚種が多岐にわたることから, 広範な魚類の摂食制限による患者の栄養状態の悪化が懸念されている (Saarinen & Kajosaari, 1980; Crespo *et al.*, 1995; Rance *et al.*, 2005; Aldámiz-Echevarría *et al.*, 2008; Mehta *et al.*, 2013).

FA 患者は, アレルギー症状の発症のリスクを避けるために原因食品 (アレルゲン) に関する正確な診断を受けることが重要である. FA により惹起されるアナフィラキシーショックは重篤で, 生命にかかわるため, 原因食品の除去は最も確実な「患者の安全を守る」手段となる. しかし, 過剰な食品の除去は, 栄養の不足や偏りを招くだけでなく, 患者と家族の QOL の低下を引き起こす. 特に, 低年齢の患者では, 過剰な原因食品の除去による栄養の不足や偏りを招かぬよう, FA を熟知した専門家による的確な指導が必要となる.

卵や牛乳, 小麦アレルギーの乳児期発症は耐性を獲得しやすい. その一方で, 魚類アレルギーは乳児期発症であっても耐性を獲得することが一般的に困難である (Imai, 2018). そのため, 乳児期に魚類アレルギーを発症すると, 成長の過程で魚類や魚介類を十分に摂取することができない恐れがある. 特に, 成長に必須で, 魚類に豊富に含まれている n-3 系多価不飽和脂肪酸の欠乏は大きな問題となる. n-3 系多価不飽和脂肪酸の欠乏は, 生体内脂肪酸の組成やエイコサノイドの代謝に影響し, アレルギー反応性の亢進につながる (Shimizu, 2012). 成人でも, 魚肉の摂取頻度が低いと心筋梗塞を発症しやすいことや (Fu *et al.*, 2002), 血液中の n-3 系多価不飽和脂肪酸濃度が低いと突然死の割合が上昇することが報告されている (Albert *et al.*, 2002). 魚肉タンパク質は, 畜肉と同様に必須アミノ酸をすべて含み, 白米で不足するリジンやヒスチジンを

補うことができる重要な栄養源でもある。同時に、魚は、キノコや卵と同じくビタミン D の重要な供給源でもある。卵と魚へのアレルギーを示す乳幼児において、ビタミン D 欠乏が原因と考えられる「くる病」が発症した症例や、牛乳と魚へのアレルギーを示す乳幼児で成長障害が発症した症例が報告されている (Ueno *et al.*, 2016)。

かつて FA の診療は、アレルギーを誘発する疑いのある食品を画一的に避けることを中心とした。卵や牛乳、小麦に関する一連のアレルゲン研究の進展により、FA の診療は、アレルゲンを特定し、必要最小限の除去を目指す「食べることを指導する」ものへと大きく方向転換している (Ebisawa, 2018b)。2000 年以降の日本では、FA やアナフィラキシーへの社会的な対応が大きく進んだことが影響したものと見える。2002 年には、加工品に対するアレルギー物質を含む食品表示制度が世界に先駆けて開始され、「表示義務品目」として特定原材料 7 品目、「表示推奨品目」として特定原材料に準ずる 20 品目が制定された。現在、本表示制度は、食品摂取における安全性と食品選択の機会を確保することを目的に 2015 年に制定された食品表示法において施行されている。2016 年には、アレルギー疾患を有する患者がその予防と症状軽減のための知識を得て、等しくアレルギー疾患医療を受けられるよう、アレルギー疾患対策基本法が施行された。

魚類アレルギー研究は 1970 年代に北ヨーロッパで始まった。半数以上の患者が反応する原因タンパク質、すなわち主要アレルゲンである PA は、水溶性が極めて高い球形の筋形質タンパク質である (Aas & Elsayed, 1975)。ヒトを含む全ての脊椎動物の筋小胞体に含まれており (Muntener *et al.*, 1995)、特に、魚類や両生類の筋小胞体に多く含まれている (Hamoir *et al.*, 1980; Gerday, 1982)。PA は Ca^{2+} 結合タンパク質であり、AB、CD および EF と名付けられた 3 つのドメイン構造を有する (Arif, 2009)。そのうち、CD および EF ドメインが Ca^{2+} の結合サイトで、これらのドメインの 3 次元構造は魚類アレルギーの IgE エピトープ (抗原決定基) の一つと考えられている (Elsayed & Aas, 1971; Elsayed & Bennich, 1975; Elsayed & Apold, 1983; Swoboda *et al.*, 2007; Tomura *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2014)。

タラ (Elsayed & Aas, 1971)、サケ (Lindstrom *et al.*, 1996)、マアジ (Shiomi *et al.*, 1998)、コイ (Bugajska-Schretter *et al.*, 1999) およびスケトウダラ (Van *et al.*, 2004) などで、これまでに単離された主要アレルゲンタンパク質は全て 12 kDa の PA で、魚種によるアミノ酸配列やその立体構造の差異が小さく、高い交差抗原性が示されている (Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1992a,b; Pascual *et al.*, 1992; Hilger *et al.*, 2004; Van *et al.*, 2004, 2005)。魚肉中の PA 含有量は魚種により異なり、魚体の部位によっても大きく異なることが報告されている (Faeste & Plassen, 2008; Kobayashi *et al.*, 2016)。

PA に加え、コラーゲン (240 kDa) とアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (41 kDa) も魚類アレルゲンとして知られている (Gallnd *et al.*, 1998; Shiomi *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 2001; Dores *et al.*, 2002)。コラーゲンは、120 kDa の α 鎖と 240 kDa の β 鎖から構成される筋基質タンパク質である。コラーゲンは冷水には溶解しないものの、酢酸水溶液あるいは熱水には比較的容易に溶解する。このコラーゲンは分解されるとゼラチンになるが、食用ゼラチンとして提供さ

れている牛骨由来のそれとは交差反応を起こさない。コラーゲン α 鎖の941-960位のアミノ酸配列がIgEエピトープとして同定されている (Shiomi *et al.*, 2010)。

世界の海には4万種以上の魚類が生息しており、そのアレルゲン性について分子レベルで解析された魚種は全体のわずか0.5%にすぎない (Sharp & Lopata, 2014)。魚類アレルギーの研究は卵や牛乳アレルギーと比較して少なく、その中で、小山らにより行われた43魚種のアレルゲン性の比較研究は大きなインパクトを与えた (Koyama *et al.*, 2006)。

FAの診断は、「特定の食物摂取によりアレルギー症状が誘発され、それが特異的IgE抗体など免疫学的機序を介する可能性を確認すること」で行われる (日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会, 2018)。原因食品 (アレルゲン) の正確な診断は、必要最小限の原因食品の除去、安全性の確保、栄養面への配慮、患者と家族のQOLの維持を目的とする栄養指導の最も重要な前提である。日本では食用とされている魚類は種類が非常に多く、魚類アレルゲンタンパク質は魚種間における交差抗原性が高い (Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1992a, b; Pascual *et al.*, 1992; Hilger *et al.*, 2004; Van *et al.*, 2004)。特定の魚種による魚類アレルギーであることを診断することはできるが、多くの場合、摂取可能な魚を見極めることは困難である。アレルギーを起こしにくい魚種や部位、あるいは、アレルゲン性に影響を与える属性を明らかにすることができれば、魚類アレルギー患者でも「食べることを指導する」ことにつながると期待できる。

タンパク質は加圧や加熱、酸、酵素の作用によりその構造が変化 (変性) し、消化酵素の働きでペプチド結合が切断され、消化される。アレルゲンタンパク質中のエピトープでの変性や消化は、IgE抗体の結合能を低下させることから、アレルギー症状の発現を抑えることができると考えられている。これを低アレルゲン化という (Watanabe *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1998)。アレルゲンに対して特異的IgE抗体が産生される感作により、一連のアレルギー症状が誘発される。リンパ球で産生された食物アレルゲン特異的IgE抗体は、皮膚や粘膜のマスト細胞や血液中の好塩基球の表面に結合する。この特異的IgE抗体にアレルゲンが結合するとヒスタミンやロイコトリエンなどが放出されてアレルギー反応が惹起される。食物アレルゲン特異的IgE抗体は、アレルゲンタンパク質中に存在するエピトープと呼ばれる特定の amino acid sequence を認識し、結合する。通常、エピトープは6-10個程度の amino acid sequence で決定される。エピトープは必ずしも連続的な配列 (連続性エピトープ, linear epitope) ではなく、amino acid の立体配置により形成される構造的エピトープ (conformational epitope) も存在する。構造的エピトープは、連続性エピトープよりも、熱変性や酵素による消化の影響を受けやすい。

伝統的に製造されてきた水産加工品の中には、経験的にアレルギー症状を起こしにくいものが知られており、魚類アレルギー患者の栄養指導に活用されている。いりこだしやかつおだし、かまぼこなどの練り製品、缶詰製品のアレルゲン性評価 (Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1992a, b; Hamada *et al.*, 2000) に加え、ペプシンやトリプシンといった消化酵素による低アレルゲン化が評価されてきた (Unstersmyr *et al.*, 2005, 2007)。しかし、卵や乳アレルギー患者を対象に調製された低アレルゲン化食品はすでに市販化されているが (Watanabe & Tanabe, 2007)、魚類ア

アレルギー患者を対象にした低アレルギー化あるいは最小限にアレルギーを除去した水産加工品の開発には至っていない。

魚類アレルギーは耐性が得られにくく、極少量のアレルギーがアレルギー症状を誘発するリスクがある。したがって、魚類アレルギー患者の食生活の支援には、アレルギーを起こしにくい魚種の情報を集積し、低アレルギー化食品を開発するだけでは十分ではない。

第一に、患者支援における最も重要な前提は、アレルギータンパク質の正確な診断にあり、正確な診断の重要性を再認識することが重要である。FAの臨床において、血中抗原特異的IgE抗体価の測定は広く普及している。しかし、サケやサバの粗抽出液（粗抗原）を用いた特異的IgE抗体価検査の結果では、アレルギータンパク質を特定することができない。アレルギータンパク質の正確な診断に寄与するものとして、食物アレルギーコンポーネント特異的IgE検査、食物経口負荷試験（Oral food challenge, OFC）、および、プロバビリティカーブが活用されている。精製アレルギータンパク質を用いる食物アレルギーコンポーネント特異的IgE検査は、保険適応となっており、卵白ではGal d 1（オボムコイド）が、牛乳ではBos d 4（ α ラクトアルブミン）、小麦ではTri a 19（ ω -5 グリアジン）、大豆ではGly m 4、ピーナッツではAra h 2が精製抗原として用いられている。一方、魚肉中のPAやコラーゲンを用いた食物アレルギーコンポーネント特異的IgE検査は実施されておらず、現状では研究者を介した測定に頼っている。

OFCは原因食品と疑われる食品を実際に食する試験であり、常にアナフィラキシーなどの危険が伴う。特異的IgE抗体価とOFC陽性率の関係を表すプロバビリティカーブを利用することができる卵白や牛乳、小麦、大豆、ピーナッツ、そば、いくらアレルギーでは、95%以上の確率で症状を呈する抗体価があらかじめ予測できるようになり、OFCにおけるアナフィラキシーなどのリスクを最小限に抑えられるようになってきた（Sampson, 2001）。しかし、魚類アレルギーでは抗体価の高さと症状誘発の関連性が低く（Koyama *et al.*, 2006; Schulkes *et al.*, 2014）、有用なプロバビリティカーブが得られていない。したがって、魚類アレルギー患者の臨床では、保険適用があるサケやサバの粗抽出液（粗抗原）を用いた特異的IgE抗体価検査の結果のみで、それ以外の魚種も含めたOFCが実施される。そのため、症状誘発リスクの予測精度が低く、安全性の確保において問題を抱えている。

このような状況の中で、原因アレルギータンパク質を同定するための問診は非常に重要な役割を果たしている。それゆえ、患者やその家族が診察時間以外に起きたアレルギー症状を観察することができなければ、有意義な問診にはならない。非医療関係者が「アレルギー」という言葉から想定する事柄は多岐にわたる。医療関係者が日常的に使用するアレルギー症状に関する言葉やアレルギーに対する説明は、患者にとっては「データ」であり、どのようにそのデータを「情報」とするかは、患者自身が持つ「知識」に左右される（Hartley, 1928）。

第二に、アレルギー専門医だけではなく、医師、薬剤師、栄養士、学校教諭に対しても正しい情報が普及することが重要である。2005年には「食物アレルギーの診療の手引き 2005」および「食物アレルギー診療ガイドライン 2005」が策定され、これらの手引きや診療ガイドラインは、アナフィラキシーに対するアドレナリン自己注射薬エピペンの適応拡大（2005年、2011年）や食物経

口負荷試験の診療報酬化（入院患者 2006 年，外来患者 2008 年）などの社会的変化を受けて，現在まで数回の改訂が行われている（Ebisawa, 2018a）．学校現場での支援を実現するために，2008 年に日本学校保健会が「学校のアレルギー疾患に対する取り組みガイドライン」を，2011 年に厚生労働省が「保育所におけるアレルギー対応ガイドライン」を，2015 年に文部科学省が「学校給食における食物アレルギー対応指針」を出し，現在では生活管理指導表を基にした組織対応が行われている．魚類アレルギー患者の多くが学童期に発症するため（Imai, 2018），学校現場において適切な対応や情報提供を行うことができれば，アレルギー児を育てる上で大きな支援となる．

魚類アレルギーは，成長に伴う耐性の獲得が起こりにくく，乳児期の発症は魚介類の摂取不足による成長障害を二次的に引き起こす可能性がある．魚類アレルギーの問題点は，食用の魚種の多様さゆえに，アレルゲンコンポーネントが特定されているにも関わらず，アレルギーの発症状況が多様であり，正確な診断と的確な栄養指導が困難なことにある．加えて，患者およびその周囲の人の不正確な知識も，正確な診断と的確な栄養指導の妨げになる．このような背景から，本研究は魚類アレルギー患者への対策・支援のために，多様な魚種のアレルゲンに関する情報のデータベース化と低アレルゲン化手法の確立のための基礎的な検討に加え，FA に関わる適切な情報提供のあり方の検討を目的とする．

本論文は，以下に示す 4 つの章から構成される．

第 1 章では，魚類アレルギー患者が安全に食することができる魚種を探索する際に有用なアレルゲン性に関する情報を集積するため，日本全国で食用とされている 128 魚種の魚肉中に含まれる PA の含有量および IgG 反応性の魚種による違いを酵素結合免疫吸着法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 法）により評価した．

第 2 章では，プロテアーゼを用いた低アレルゲン化の有効性を明らかにするため，カタクチイワシの魚肉を食品製造加工用の 7 種の酵素で処理し，得られた魚肉エキス中の PA およびコラーゲンの IgE 反応性の低減化効果について阻害 ELISA 法により評価した．

第 3 章では，水晒し，肉挽き，KCl 水溶液によるアレルゲンタンパク質の除去の有用性を明らかにするため，魚肉を原料とした水産加工品の IgE 反応性の評価を ELISA 法により行うとともに，スケトウダラすり身からの低アレルゲン化加工食品の調製法の検討を行なった．

第 4 章では，非医療関係者の FA の症状やアレルゲンに対する知識に関する特徴を明らかにし，正確な診断に不可欠な正しい情報を普及することを目的として，インターネットモニターによる Web アンケート調査とインターネット上で公開されている質問投稿サイトの投稿文の解析を行った．

第1章 魚種による魚肉中に含まれる PA の IgG 反応性の違いに関する検討

1-1. 序論

第1章では、魚類アレルギーの主要アレルゲンである PA に着目し、魚類アレルギー患者が安全に食することができる魚種を探索する際に有用な IgG 反応性に関する情報を集積することを目的とした。日本全国で食用とされている 128 魚種の魚肉中に含まれる PA 量、PA の IgG 反応性の魚種による違いを、市販抗体を用いる ELISA 法で評価した。

日本人は魚食国民であり、単にその消費量が多いだけではなく、食用とする魚介類の多様さは世界でも類をみない (Nagasaki, 2000; Nagashima, 2000)。ヨーロッパにも魚を食する国は多いが、その消費はタラあるいはカレイなどの特定の魚種に限られる。日本における魚類アレルギーの有症率の報告はないが、即時型 FA 症状の調査では、2.1%を占めると報告されている (日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会, 2018)。

魚類アレルゲンタンパク質としてこれまでに単離されたものには、Sal s 1 (タイセイヨウサケ, Lindstrom *et al.*, 1996), Cyp c 1 (コイ, Bugajska-Schretter *et al.*, 1999), Tra j 1 (マアジ, Shiomi *et al.*, 1998), Ang j 1 (ニホンウナギ, Shiomi *et al.*, 1999), Thu o 1 (メバチ, Shiomi *et al.*, 1999), Sco j 1 (マサバ, Hamada *et al.*, 2003) および The c 1 (スケトウダラ, Van *et al.*, 2004) などがあり、これらは後に 12 kDa の PA であると同定されている。PA は高度の交差抗原性を示し、魚類アレルギーにおけるパンアレルゲンと認識されている (Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1992a,b; Pascual *et al.*, 1992; Hilger *et al.*, 2004; Van *et al.*, 2004, 2005)。PA の他にもコラーゲンやアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼが魚類アレルギーのアレルゲンタンパク質として知られているが (Ruethers *et al.*, 2018)、PA の研究が最も精力的に進められている。

世界の海には 4 万種以上の魚類が生息するとされ、FishBase データベースには、34,000 種が登録されている。そのうち約 500 種が食用とされ、前述したように、その消費には地域特性がある。多くの魚種が食用とされていながら、そのアレルゲン性について分子レベルで解析された魚種は全体のわずか 0.5%にすぎない (Sharp & Lopata, 2014)。臨床において、実施されている血中特異的 IgE 抗体検査は、サバ、アジ、イワシ、マグロ、サケ、タラ、カレイの粗抽出液を抗原としたものに限られる。OFC では一般的に、サケやタラなどの水産加工品の原材料となりやすいもの、地域でよく食されるもの、給食に使用されるものなどを優先して用いて実施されている。しかし、魚種の生物学的な分類と感作とは必ずしも一致しないとされ (Koyama *et al.*, 2006)、特定の魚種でアレルギーを経験した患者に対して、症状誘発のリスクが低いその他の魚種を選定するための指標が求められている。

魚類は硬骨魚綱と軟骨魚綱に大別され、食用とされる魚種の多くが硬骨魚綱に属している。硬骨魚綱はリンネ体系では 45 目に分類され、代表的なものとして Clupeiformes (ニシン目, ニシンやイワシ), Salmoniformes (サケ目, サケやマス), Cypriniformes (コイ目, コイやフナ), Gadiformes (タラ目, マダラやスケトウダラ), Perciformes (スズキ目, スズキ, サバやマグロ) などが食用とされている (Sharp & Lopata, 2014)。軟骨魚綱の魚種は、硬骨魚綱のそれよりも少ないが、

エイやサメが代表的なものとして食用とされている。

FAの原因アレルゲンの診断や栄養指導に、生物学的な分類が活用し難い理由は、日常生活で使用される魚類の名称の多様性が一因となっている。例えば、「さけ」はアレルギー表示制度における表示推奨品目であるが、Salmoniformesに含まれる Salmonidae (サケ科)には、「マス」も含まれている。英語で「blackthroat seaperch」と呼ばれている魚は、日本では「赤ムツ」や「ノドグロ」となる。このような呼び名の違いは地域による違いである。さらに「赤ムツ」と「ムツ」はいずれも Perciformes の魚であるが、赤ムツは Acropomatidae (ホタルジャコ科)、ムツは Scombroptidae (ムツ科)に分類されている。「タイ」や「アジ」といったステムは、食味のよい魚に対して使用される、文化に基づく名称であり、生物学的な分類とは無関係である。さらに日本固有の文化に基づく名称として、出世魚も混乱の一端を担っている。

魚類には、種の生存と繁殖のために生息域を移動する回遊行動が見られる (Ueda, 2004)。海水と淡水を往来する通し回遊と、海水あるいは淡水域のみを移動する非通し回遊がある。底生魚の多くは南北の移動をせず、海の深部から浅部へ季節的に移動する非通し回遊魚であり、このような魚種を食用とすることは地域性や季節性を反映するものとなる。通し回遊行動が知られている最も代表的な魚種がサケである。サケは、淡水域で孵化し、海水域で成長する遡河性回遊魚である。回遊行動に伴い海に移動するものを降海型と呼ぶ。遡河性回遊魚であるサケの中には、生まれた環境からの移動がないヒメマスなどが含まれ、陸封型と呼ばれる。ヒメマスとベニザケは生物学的には同じ種であるが、陸封型のヒメマスの方が、降海型のベニザケよりもアレルギー性が高いという報告があり、生育史によってもアレルギー性が異なることが示唆されている (Kondo *et al.*, 2009)。

第1章における研究の目的は、特定の魚種に対してアレルギーを有するFA患者が、安全に食することのできる魚種を探索することである。日本には300種を超える魚種が食用として供給されている (Itagaki, 2011)。これらの中から、PA含有量が低い、あるいはアレルギー性が弱い魚種を見出すことができれば、症状の出現を予測しながらOFCを行うことや、軽度のアレルギー患者がそれを食することが可能となる。さらに、経口免疫療法に応用することも期待される。

本研究では、市販されているマウス抗カエルPAモノクローナル抗体を用い、128魚種の魚肉抽出液に対するIgG反応性の検討を行うことで、その情報を集積した。まず、Salmonidaeに属する魚種のIgG反応性を、その回遊行動で比較検討し、加工食品のアレルギー表示との関係性について評価した。次に、魚の部位によるIgG反応性の差異を評価した。さらに、市販されている124魚種の魚肉抽出液を用いてELISA法によるスクリーニング評価を行なった。最後に、水産加工品の原料として汎用されているシログチ、シロザケ、トキシラズ、シシャモの魚肉中に含まれるPAを精製し、その精製PAを用いてPA含有量の定量を行った。

1-2. 材料および方法

1-2-1. 試料

1. 検討に用いた魚種

本研究では128魚種を検討に用いた。IgG反応性およびIgE反応性を検討したSalminidae（サケ科）12魚種は、イトウ、ニジマス、サーモントラウト、ヒメマス、ヤマメ、イワナ、マスノスケ、ベニザケ、サクラマス、シロザケ、トキシラズ、カラフトマスであった。頭部から尾部にかけてのIgG反応性の違いを検討した7魚種は、クロマグロ、マスノスケ、シロザケ、ヒラメ、銀タラ、ハモ、ナマズであった。スクリーニングを行った124魚種の生物学的分類および名称をTable 1に示す。なお、ニジマス、マスノスケ、トキシラズ、銀タラはスクリーニングを行なった124魚種には含まれていない。

ポリアクリルアミド電気泳動(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)による検討を行なった23魚種は、ヨシキリザメ、マカスベ、カワヤツメ、シラウオ、ホテイウオ、ノロゲンゲ、キハダ、カマスサワラ、ハタハタ、シロサバフグ、マンボウ、マカジカ、ノレソレ、ニシン、ワカサギ、シシヤモ、アユ、コマイ、スケトウダラ、ホッケ、ハッカク、クロガシラカレイ、カレイであった。

2. 評価用の魚肉抽出液の調製

128種の魚は釧路の水産会社より購入し、可食部を -20°C で保管したものを使用した。解凍後、頭部から尾部にかけて8等分にし、各部位から10gずつ切り出して混合し、細切した後、5倍量の10 mmol/Lリン酸緩衝液(Phosphate buffer, PB, pH 7.0)を加えて1分間ホモジナイズした。混合液を 4°C で終夜静置後に遠心分離($20,000\times g$, 4°C , 30分間)し、懸濁物を除去した。得られた上清をシリンジフィルター(5 μm)を用いてろ過し、試料となる魚肉抽出液を得た。

部位別依存性評価用の魚肉抽出液は、可食部を頭部から尾部にかけて8等分(頭部から順にA, B, C, D, E, F, G, H)し、それぞれの部位から得られた魚肉と5倍量のPB(pH 7.0)を用いて調製した。

3. クロマグロの市販ブロックを用いた検討

クロマグロは、背カミ、背ナカ、背シモ、腹カミ、腹ナカ、腹シモ、尾の身と呼ばれて取引されている7ブロックを購入した。各ブロックを5つの部位(尾の身のみ3つの部位)に切り分けて、それぞれの部位の魚肉抽出液を調製した。ブロックの比較では、それぞれの部位から調製した魚肉抽出液の等量混合液を用いて、タンパク質量およびIgG反応性を評価した。

4. IgE反応性の評価用血清

血清を用いたIgE反応性の評価には、魚類アレルギー患者より提供された血清をインフォームドコンセントを得た上で用いた。患者はサケ(粗抽出液抗原)に対する血中抗原特異的IgE抗体価が高く、アジの干物や卵を食した際のアレルギーの経験を有していた。精製したシロザケPAに反応性を示すが、シロザケコラーゲンには反応しないことを確認した。コントロール血清にはア

レルギーを有していない健常成人の血清を用いた。

1-2-2. マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による IgG 反応性の評価

市販抗体を用いた ELISA 法により魚肉抽出液の IgG 反応性を評価した。コーティング液には炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を、ブロッキング液には 1% ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) を含むダルベッコ生理食塩水 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) を、抗体希釈液には 1% BSA および 0.05% Tween20 を含む DPBS を、洗浄液には 0.15 mol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mmol/L PB (pH 7.0) をそれぞれ用いた。1 次抗体にはマウス抗カエル PA モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) を、2 次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase, HRP) 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc., CA, USA) を用いた。

コーティング液を用いて 800 倍あるいは 1,600 倍に希釈した魚肉抽出液を 96 穴マイクロプレート (Maxisorp; Nalge Nunc International, NY, USA) の各ウェルに 50 μ L 添加し、インキュベーターを用いて 37°C にて 1 時間インキュベートした。その後、プレートウォッシャーを用い、上記の洗浄液にて 3 回洗浄した。続いて、各ウェルにブロッキング液を 300 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、1 次抗体を抗体希釈液で 4,000 倍に希釈した溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体を抗体希釈液で 4,000 倍に希釈した溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、テトラメチルベンジジン (Tetramethylbenzidine, TMB, Pierce Biotechnology Inc., IL, USA) を 50 μ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。反応停止液である 1 mol/L 硫酸を 50 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) を用い、波長 450 nm での光学密度 (Optical density, OD) を測定した。

1-2-3. 患者血清を用いた ELISA 法による IgE 反応性の評価

患者血清を用いた ELISA 法により魚肉抽出液のアレルゲン性を評価した。コーティング液には炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を、ブロッキング液には Starting Block (PBS) Blocking Buffer (Pierce Biotechnology Inc.) を、抗体希釈液には 5% ブロッキング液を含む 0.15 mol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mM PB (pH 7.0) を、洗浄液には 0.15 mol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mM PB (pH 7.0) をそれぞれ用いた。1 次抗体には血清を、2 次抗体には HRP 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。

コーティング液を用いて 1,000 倍に希釈した魚肉抽出液を 96 穴マイクロプレート (Maxisorp; Nalge Nunc International) の各ウェルに 50 μ L 添加し、インキュベーターを用いて 37°C にて 2 時間インキュベートした。その後、プレートウォッシャーを用い、上記の洗浄液にて 5 回洗浄した。続いて、各ウェルにブロッキング液を 300 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、血清を抗体希釈液で 50 倍に希釈した溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間、その後 4°C で一晩インキュベートした。洗浄後、2 次抗体を抗体希釈液で 10,000 倍に希釈した溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、SuperSignal Chemiluminescent (Pierce

Biotechnology Inc.) を 50 μ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用い、波長 125 nm で相対発光強度 (relative light units) を測定した。

1-2-4. タンパク質定量

BSA を標準物質とし、Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) 用い、タンパク質の定量を行なった。BSA の希釈列 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/mL) および魚肉抽出液を 10 倍あるいは 20 倍に脱イオン水 (Deionized water, DIW) で希釈した試料を用意した。希釈した試料を各 25 μ L 試験管に分注し、Reagent A 液 125 μ L, Reagent B 液 1 mL を添加し、攪拌後 5 分間静置した。分光光度計 SmartSpec Plus (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用い、750 nm で OD を測定した。得られた OD から検量線を用い、魚肉 1 g あたりのタンパク質量を算出した。

1-2-5. SDS-PAGE

魚肉抽出液を、タンパク質濃度が 1 g/mL になるように、4% ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS) および 2-メルカプトエタノールを加えた 125 mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris) -HCl 緩衝液 (pH 6.8) に溶解し、4°C で終夜静置して SDS 化した。SDS 化された試料を、15% e-PAGEL ポリアクリルアミドゲル (ATTO, Tokyo, Japan) に各レーン 10 μ L をアプライした。分子量マーカーには Pre-stained SDS-PAGE broad range standards (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いた。泳動装置には pageRun (ATTO) を用い、20 mA/gel の条件下で 85 分間の泳動を行った。染色液にはクーマシーブリアントブルー (Coomassie brilliant blue, CBB) R-250 を用いた。

1-2-6. 魚肉可食部からの PA の精製

シログチ、シロザケ、トキシラズ、シシャモの可食部からの PA の精製は、①粗抽出液の調製、②ゲル浸透クロマトグラフィー (Gel permeation chromatography, GPC) による粗精製、③逆相クロマトグラフィー (Reverse phase chromatography, RPC) による精製、④GPC による精製の順に行なった。

粗抽出液は、4 倍量の PB (pH7.0) を用いて調製した。魚肉に 4 倍量の 10 mmol/L PB (pH 7.0) を加えてホモジナイズした後、4°C で 3 時間静置した。懸濁物を遠心分離 (20,000 \times g, 4°C, 40 分間) により除去した。得られた上清をシリンジフィルター (5 μ m) を用いてろ過し、粗抽出液を得た。

粗抽出液を Sephacryl-S-100 HR カラム (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA; 2.6 \times 100 cm) を用いた GPC で粗精製した。溶離液には 10 mmol/L リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.0) を用い、カラム温度 4°C, 流速 20-30 mL/h で通液し、6.0 mL ずつ分画した。クロマトグラフィーによる分画後、マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA により PA の溶出画分を確認した。PA 溶出画分の確認のための ELISA 法は、前述 1-2-2. のマウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による抗原性評価で述べた通りとし

た。PA 溶出画分は、透析膜 (Spectra/Por 3 Dialysis Membrane MWC0 3,500, Spectrum Lab., USA) を用いて、蒸留水中で一晩透析した後、凍結乾燥して濃縮し、次の工程に用いた。

GPCによる粗精製の次に、Source 15RPC (GE Healthcare Life Sciences; 4.6×100 mm) カラムを用いた RPC により精製を行なった。カラムの平衡化には 0.1% トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) を含む 70% アセトニトリルを流速 1.0 mL/min で通液し、1.0 mL ずつ分画した。その後、流速 2.0 mL/min で 0-100% でのグラジエントをかけ、0.5 mL ずつ分画した。

次に、Superdex 75 (GE Healthcare Life Sciences; 1.0×30 cm) カラムを用いた GPC により最終精製を行なった。溶離液には 10 mmol/L PBS (pH 7.0) を用い、流速 1.0 mL/min で通液し、1.0 mL ずつ分画した。

1-2-7. 精製 PA を用いた ELISA 法による PA 定量

精製した PA を用いて検量線を作成し、マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法により定量を行なった。炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を用いて、魚肉抽出液を 800 倍、1,600 倍、3,200 倍に希釈した。続く工程は、前述 1-2-2. でのマウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による IgG 反応性の評価で述べた通りとした。得られた OD から検量線を用いて、魚肉 1 g あたりの PA 含有量を算出した。

1-2-8. 統計解析

ELISA 測定は、IgG 反応性の評価においては triplicate, IgE 反応性の評価においては duplicate で行い、結果を平均±標準偏差 (Standard deviation, SD) で表した。サケ科 12 魚種の比較におけるシロザケ魚肉抽出液との IgG 反応性の差の検定は、有意水準 0.05 とする一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で行い、多重検定には Bonferroni 法を用いた。

1-2-9. 倫理的配慮

本研究の実施にあたり、神奈川県衛生研究所にて以下の倫理審査を受けた。平成 17 年 No. 5, 食物アレルギーの原因食物中に含まれるアレルゲンの検出と低アレルゲン化に関する検討 (平成 17 年 10 月 1 日～平成 20 年 3 月 31 日), 平成 18 年 No. 5, 食物アレルギーの原因食物中に含まれるアレルゲンの検出と低アレルゲン化に関する検討: 水産食品の低アレルゲン化に関する研究およびアレルゲン性を指標とした食情報のデータベース化と食教育への活用に関する基盤研究 (平成 18 年 9 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日), 平成 20 年 No. 3, 食物アレルゲンの解析とその応用に関する検討 (平成 20 年 9 月 1 日～平成 23 年 3 月 31 日)。

1-3. 結果

1-3-1. サケ科に属する 12 魚種の IgG 反応性および IgE 反応性に関する検討

魚類アレルギーの主要アレルゲンである PA について、Salmonidae (サケ科) に属する 12 魚種の IgG 反応性と IgE 反応性を、降海型と陸封型での生活史の差異に基づき比較した (Fig. 1).

マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 解析の結果、サケ科 12 魚種の IgG 反応性には魚種による差が見られた (Fig. 1a). イトウ[1 (Fig. 1における魚種番号を示す)], ニジマス[2], サーモントラウト[3]の順に抗体への反応性が高かった. ニジマスとサーモントラウトは生物学的には同じ魚種で、ニジマスと呼ばれる陸封型の方が IgG 反応性が高かった. ヒメマス[4], ヤマメ[5], イワナ[6]といった陸封型の魚種はいずれも高い IgG 反応性を示した. ヒメマスおよびヤマメに対応するベニザケ[8], サクラマス[9]といった降海型の魚種は、これらに準ずる結果となった. 一方、シロザケ[12], トキシラズ[10], カラフトマス[11]は IgG 反応性が低く、これらの魚種の間では IgG 反応性に関する有意差が見られなかった. その他の魚種については、シロザケよりも有意に高い IgG 反応性が見られた.

サケアレルギー患者の血清を用いた特異的 IgE 抗体による反応性の比較結果を Fig. 1b に示す. 血清はサケ科 12 魚種全てに IgE 反応性を示し、ヒメマスで最も高く、カラフトマスで最も低かった. IgG 反応性が高い魚種は高い IgE 反応性を示し、IgG 反応性が低い魚種は低い IgE 反応性を示した.

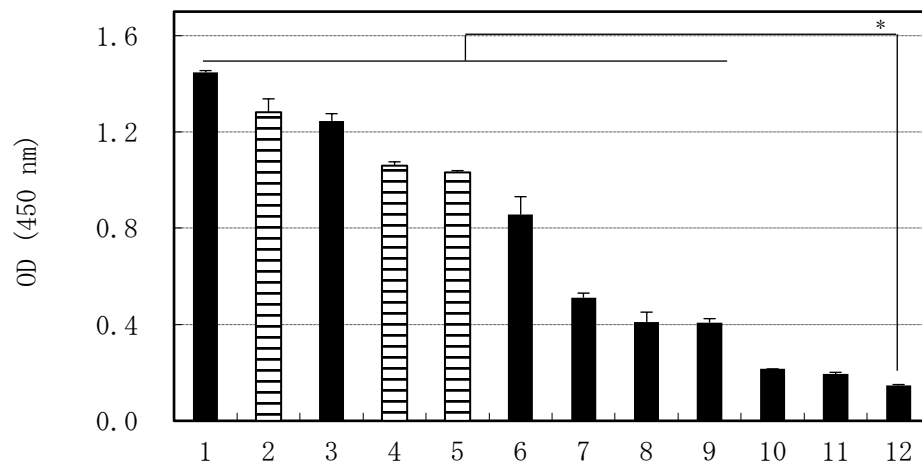
1-3-2. 大型魚類の頭部から尾部にかけての IgG 反応性の変化

頭部 (A) から尾部 (H) にかけての IgG 反応性の変化を検討した 7 魚種はいずれも、タンパク質量あたりの IgG 反応性が頭部で高く、尾部で低かった (Fig. 2). 部位依存的な変化は、魚種により異なっており、クロマグロ (Fig. 2a) の IgG 反応性は頭部から 3/8 のあたりで最大となり、それよりも尾部側は低かった. マスノスケ (Fig. 2b), シロザケ (Fig. 2c), ヒラメ (Fig. 2d) は頭部が高く、尾部にかけて連続的に低下した. 銀タラ (Fig. 2f) の IgG 反応性は頭部 A でのみ高く、ハモ (Fig. 2g), ナマズ (Fig. 2h) の IgG 反応性は頭部から尾部にかけて、いずれの部位も同様の値となり、変化が見られなかった. マスノスケとヒラメは、背側と腹側でそれぞれ検討したが、反応性に違いは見られなかった.

クロマグロの 7 つのブロックを用いた IgG 反応性の ELISA による評価では、腹カミが最も反応性が高く、背カミ、背ナカで IgG 反応性が見られたが、腹ナカ、背シモ、尾の身では IgG 反応性は見られなかった (Fig. 3).

タンパク質量は、頭部よりも尾に近いブロックの方が多かった (Fig. 4). 各ブロック内では、骨に近い血合いや血合いぎしはタンパク質量が多くなり、腹腔や皮に近い、いわゆるトロの部分では少なかった. 腹カミの中で IgG 反応性が高かったのは、大トロ部位にあたる部位 1 と部位 2 で、血合いぎしにあたる部位 3 では低く、血合いや天端にあたる赤身 (部位 4-5) では反応性は見られなかった (Fig. 5). シログチ精製 PA を用いて作成した検量線による定量的結果は、腹カミブロックの部位 1 で 0.9 mg/g, 部位 2 で 1.3 mg/g, 部位 3 で 0.2 mg/g であり、部位 4 および部位 5 では検出限界以下となった.

(a) IgG reactivity



(b) IgE reactivity

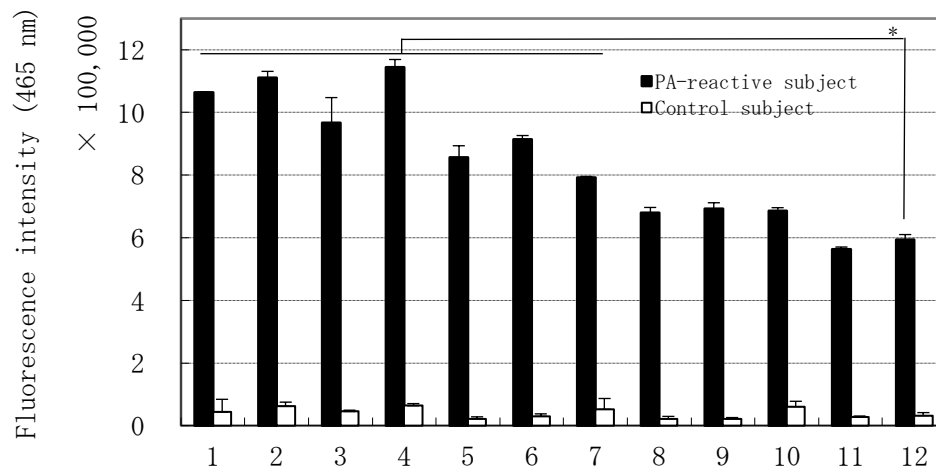


Figure 1. The reactivities of IgG and IgE against 12 kinds of fish belonging to the *Salmonidae* family by ELISA. (a) IgG reactivity using monoclonal anti-frog PA IgG antibody. The data of the landlocked fish are shown as striped bars. (b) IgE reactivity of serum from a fish allergy patient and serum from an individual with no fish allergy. Bars in a and b: 1, *itou*; 2, *niji-masu* (landlocked form of 3); 3, salmon trout; 4, *hime-masu* (landlocked form of 8); 5, *yamame* (landlocked form of 9); 6, *iwana*; 7, *masunosuke*; 8, *beni-zake*; 9, *sakura-masu*; 10, *toki-shirazu*; 11, *karafuto-masu*; and 12, *shiro-zake*. Asterisks indicate a significant difference when compared to *shiro-zake* [bar 12] by Bonferroni test ($p < 0.0008$, $n=12$).

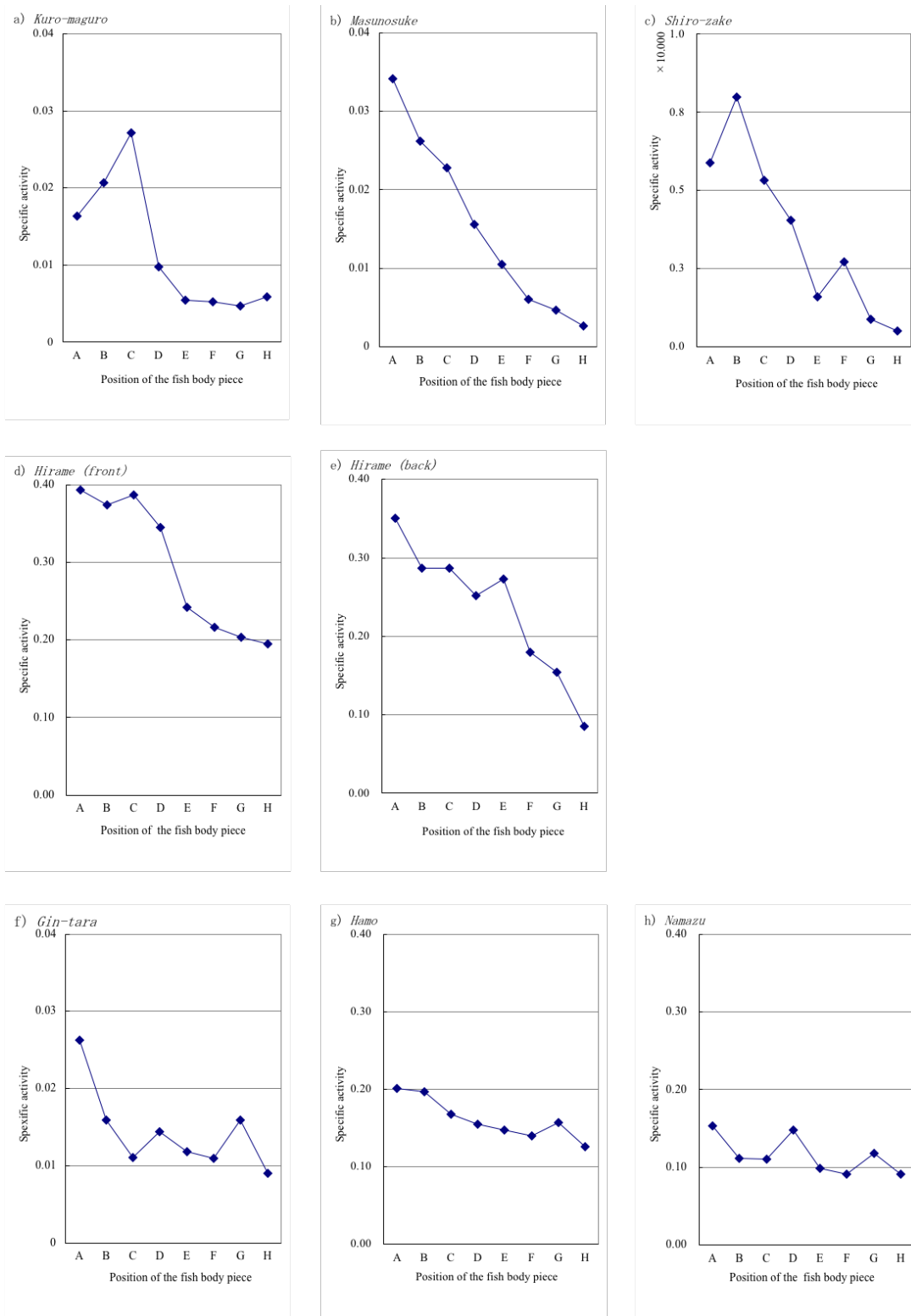


Figure 2. The reactivity for eight kinds of fishes (a-h) using monoclonal anti-frog PA antibody by ELISA. Edible portions that divided into eight from the fish head to the tail are marked with capital letters from A to H.

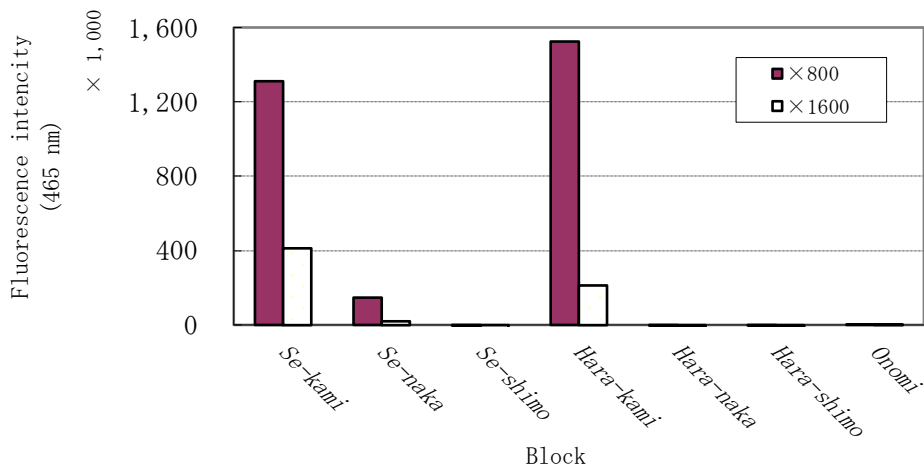


Figure 3. Difference in IgG reactivities among seven blocks of *kuro-maguro* using monoclonal anti-frog PA IgG antibody by ELISA. Red bars indicate the fluorescence intensity for the sample solutions diluted 800 times by coating buffer and white bars for the solution diluted 1600 times.

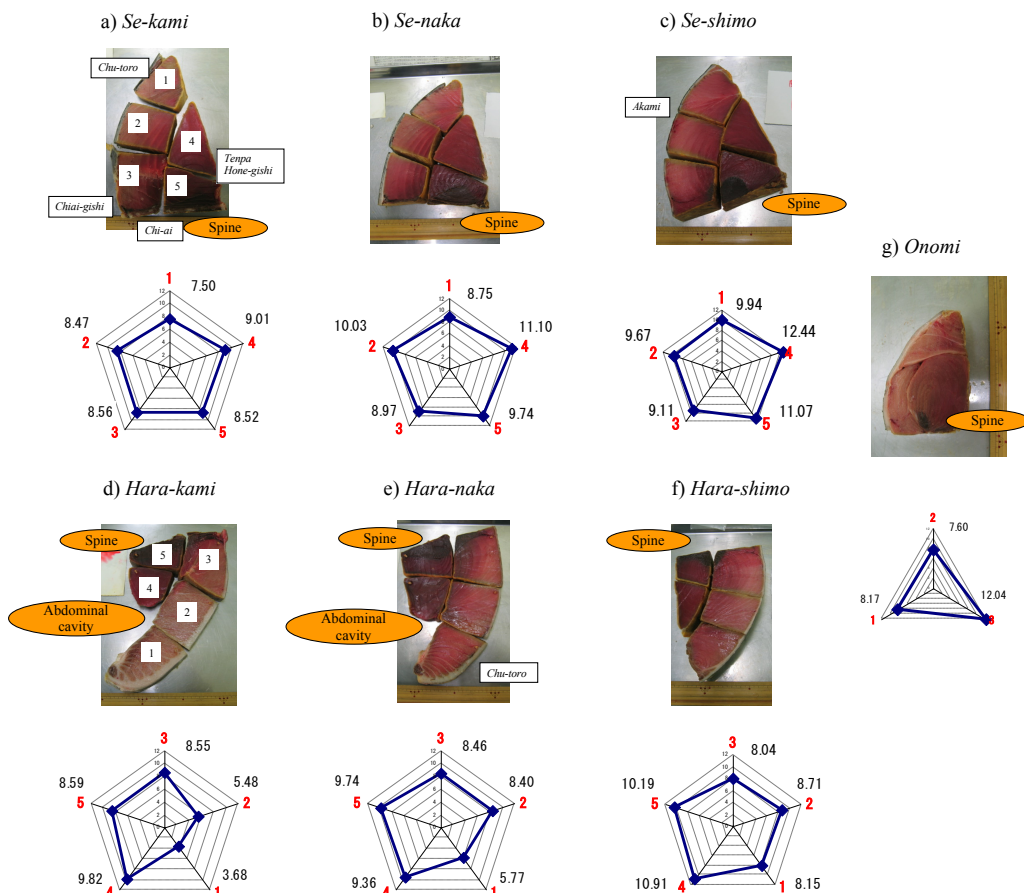


Figure 4. Photographs of seven blocks of *kuro-maguro* and amount of protein contained in each body piece. A red-colored number in the radar chart indicates one of five/three pieces from each blocks and black-colored value indicate protein concentration (mg/mL).

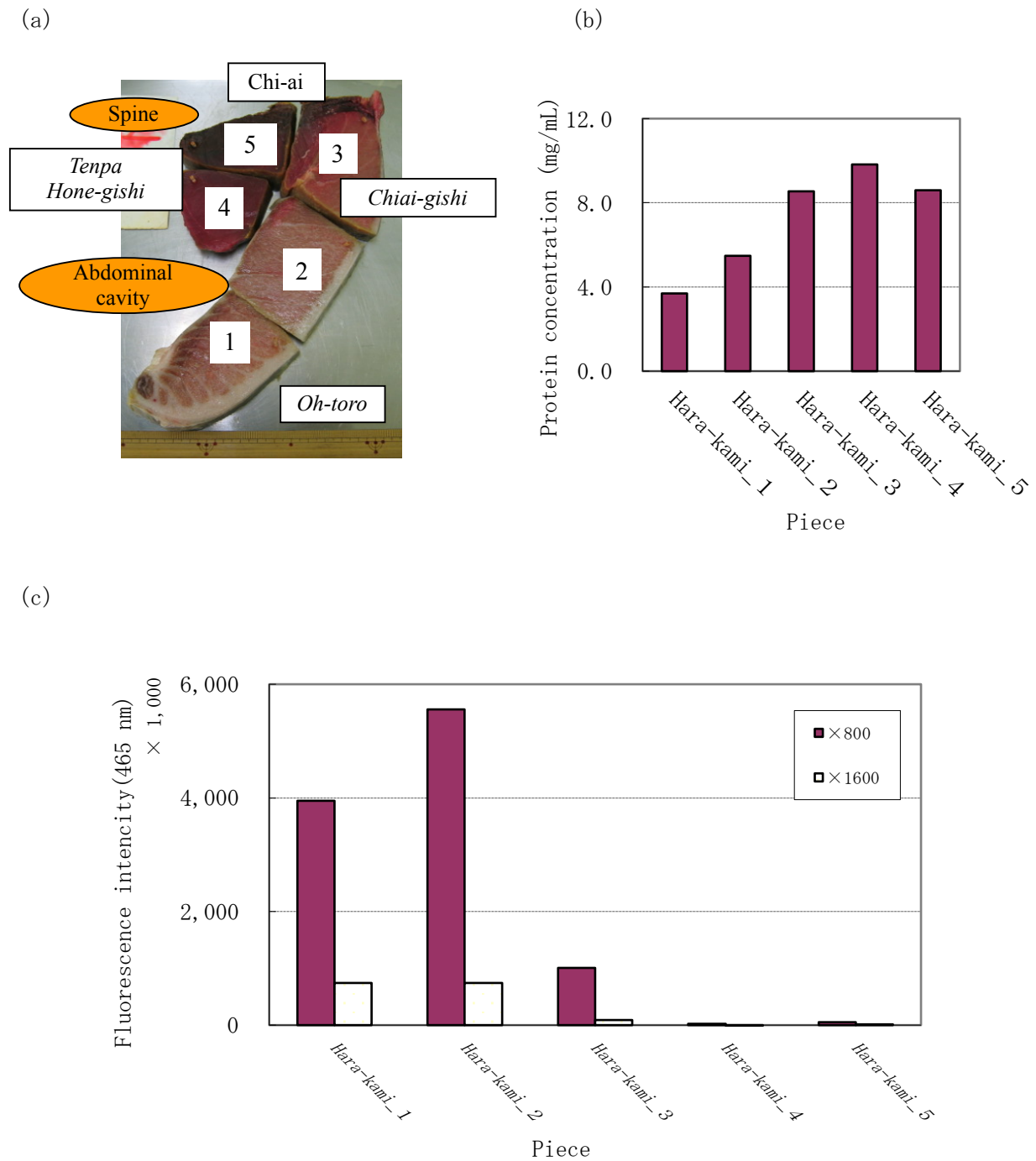


Figure 5. Difference in IgG reactivities among five pieces contained in the original block of *Hara-kami* by ELISA. (a) Photograph of original *Hara-kami* block and those 5 pieces. (b) The result of protein assay (Lowry method). (c) IgG reactivity using monoclonal anti-frog PA IgG antibody. Red bars indicate the fluorescence intensity for the sample solutions diluted 800 times by coating buffer and white bars for the solution diluted 1600 times.

Table 1. Names of fishes used in this study and their Linnaean classifications, protein contents in the fish meats, and PA antigenicity against monoclonal anti-frog PA antibody

I. Chondrichthyes

No	Order of Linnaean classification	Scientific name	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
1	Carcharhiniiformes	<i>Prionace glauca</i>	Blue shark	<i>Yoshikiri-zame</i>	3.8	0.00
2	Rajiiformes	<i>Raja pulchra</i>	Mottled skate	<i>Megane-kasube, Ma-kasube</i>	2.7	0.00
3	Petromyzontiformes	<i>Lampetra japonica</i>	Japanese lamprey	<i>Kawa-yatume, Yatume-unagi</i>	7.3	0.00

II. Anguilliformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
4	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel	<i>Unagi</i>	6.5	1.19
5	Congridae	<i>Conger myriaster</i>	Common Japanese Conger	<i>Anago</i>	5.0	1.93
6		-	Juvenile conger	<i>Nore-sore</i>	1.8	0.04
7	Muraenesocidae	<i>Muraenesox cinereus</i>	Daggetooth pike conger	<i>Hamo</i>	3.9	0.32

III. Clupeiiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
8	Clupeidae	<i>Clupea pallasii</i>	Pacific herring	<i>Nishin</i>	3.5	0.06
9		<i>Sardinops melanostictus</i>	Sardine	<i>Ma-iwashi</i>	4.8	0.91
10		<i>Sardinella zunasi</i>	Big-eye sardine	<i>Mamakari, Sappa</i>	4.7	1.07

(continued on next page)

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
11	Clupeidae	<i>Konosirus punctatus</i>	Threadfin shad	<i>Konoshiro, Kohada</i>	5.4	1.05
12	Engraulidae	<i>Engraulis japonica</i>	Japanese anchovy	<i>Katakuchi-iwashi</i>	8.7	1.31
13		-	Juvenile anchovy	<i>Shirasu</i>	10.5	0.84

IV. Cypriniformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
14	Cyprinidae	<i>Cyprinus Carpio</i>	Carp	<i>Koi</i>	8.1	1.34
15	Cobitidae	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Loach	<i>Dojyo</i>	7.2	1.02

V. Salmoniformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
16	Salmonidae	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Sockeye salmon	<i>Beni-zake</i>	9.0	0.65
17		<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Pink salmon	<i>Karafuto-masu</i>	7.0	0.10
18		<i>Oncorhynchus masou masou</i>	Cherry salmon	<i>Sakura-masu</i>	8.8	0.34
19		<i>Hucho perryi</i>	Japanese huchen	<i>Itou</i>	6.1	1.45
20		<i>Salvelinus leucomaenis pluvius</i>	Whitespotted char	<i>Iwana</i>	5.9	0.59
21		<i>Oncorhynchus nerka</i>	Kokane	<i>Hime-masu</i>	12.8	0.50
22		<i>Oncorhynchus keta</i>	Chum salmon	<i>Shiro-zake</i>	7.4	0.14
23		<i>Oncorhynchus masou maso</i>	Land-locked trout	<i>Yamame</i>	4.7	0.69
24	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Salmon trout	<i>Salmon-trout</i>	7.5	1.10	

VI. Osemeriformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
25	Osmeridae	<i>Hypomesus nipponensis</i>	Japanese smelt	<i>Makasagi</i>	4.5	0.02
26		<i>Spirinchnus lanceolatus</i>	Shishamo smelt	<i>Shisyamo</i>	4.3	0.07
27		<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	Japanese trout	<i>Ayu</i>	5.6	0.03
28		<i>Salangichthys microdon</i>	Icefish	<i>Shira-uo</i>	7.1	0.00

VII. Gadiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
29	Gadidae	<i>Gadus chalcogrammus</i>	Alaska pollack	<i>Suketou-dara</i>	5.5	0.01
30		<i>Gadus macrocephalus</i>	Pacific cod	<i>Ma-dara</i>	3.5	0.20
31		<i>Eleginus gracilis</i>	Saffron cod	<i>Komai</i>	4.3	0.00

VIII. Bericiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
32	Berycidae	<i>Beryx splendens</i>	Splendid alfonsoino	<i>Kimme-dai</i>	7.2	0.40

IX. Belontiiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
33	Scomberesocidae	<i>Cololabis saira</i>	Pacific saury	<i>Sanma</i>	5.5	0.32
34	Exocoetidae	<i>Cypselurus agoo</i>	Japanese flyfish	<i>Tobi-uo</i>	6.3	0.21
35	Hemiramphidae	<i>Hyporhamphus sajori</i>	Japanese halfbeak	<i>Sayori</i>	8.9	1.15
36	Belontiidae	<i>Strongylura anastomella</i>	Japanese needlefish	<i>Datsu</i>	7.5	0.34

X. Scorpaeniformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
37	Cottidae	<i>Myoxocephalus polyacanthocephalus</i>	Great sculpin	<i>Ma-kajika, Toge-kajika</i>	5.8	0.00
38	Scorpaenidae	<i>Sebastes marmoratus</i>	Marbled rockfish	<i>Kasago</i>	6.9	0.67
39		<i>Sebastes schlegelii</i>	Black rockfish	<i>Kuro-soi</i>	5.6	0.47
40		<i>Sebastes kiyomatsui</i>	Kataboshi-red rockfish	<i>Kataboshi-akamebaru</i>	5.6	0.48
41		<i>Sebastes baranuke</i>	Rose-rockfish	<i>Bara-menuke,</i>	5.5	0.44
42		<i>Sebastes macrochir</i>	Thornhead	<i>Kichi-ji, Kinki</i>	3.8	0.56
43		<i>Sebastes scythropus</i>	Sullen rockfish	<i>Ukeguchi-mearu</i>	5.0	0.36
44	Platycephalidae	<i>Platycephalus sp. 2</i>	Bartail flathead	<i>Ma-gochi, Kochi</i>	8.2	0.26
45	Triglidae	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	Bluefin searobin	<i>Hou-bou</i>	7.7	0.57
46	Hexagrammidae	<i>Hexagrammos otakii</i>	Green ling	<i>Ainame</i>	4.7	0.26
47		<i>Pleurogrammus azonus</i>	Atka mackerel	<i>Hokke</i>	5.0	0.03
48	Agonidae	<i>Podothecus sachi</i>	Sailfin poacher	<i>Hakkaku, Tokubire</i>	4.4	0.06
49	Cyclopteridae	<i>Aptocyclus ventricosus</i>	Smooth lump sucker	<i>Hotei-uo, Gokko</i>	2.7	0.00

XI. Mugiliformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
50	Mugilidae	<i>Mugil cephalus cephalus</i>	Flathead gray mullet	<i>Bora</i>	7.4	0.31

XII. Gasteristeiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
51	Fistulariidae	<i>Fistularia petimba</i>	Smooth flutemouth	<i>Aka-yagara</i>	9.5	0.20

XIII. Siluriformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
52	Siluridae	<i>Silurus asotus</i>	Japanese catfish	<i>Namazu</i>	7.3	0.66

XIV. Aulopiiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
53	Synodontidae	<i>Saurida macrolepis</i>	Brushtooth lizardfish	<i>Eso, Ma-eso</i>	4.4	0.85
54	Chlorophthalmidae	<i>Chlorophthalmus albatrossis</i>	Bigeyed greeneye	<i>Mehikari, Aome-eso</i>	5.4	0.08

XV. Zeniiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
55	Zeniiontidae	<i>Zeus faber</i>	John dory	<i>Matou-dai</i>	13.2	1.08

XVI. Perciformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
56	Lateolabracidae	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Japanese seaperch	<i>Suzuki</i>	5.6	0.17
57	Zoarcidae	<i>Bothrocara hollandi</i>	Porous-head eelpout	<i>Noro-genge</i>	2.0	0.00
58	Rachycentridae	<i>Rachycentron Canadum</i>	Cobia, Black kingfish	<i>Sugi</i>	10.3	0.12
59	Kyphosidae	<i>Labracoglossa argentiventris</i>	Yellowstriped butterflyfish	<i>Takabe</i>	7.2	0.98
60	Carangidae	<i>Trachurus japonicus</i>	Japanese horse-mackerel	<i>Ma-aji</i>	4.1	0.81
61		<i>Seriolina nigrofasciata</i>	Blackbanded trevally	<i>Ai-buri</i>	8.6	0.03
62		<i>Seriola dumerili</i>	Greater amberjack	<i>Kanpachi</i>	8.9	0.42
63		<i>Decapterus muroadsi</i>	Amberstripe scad	<i>Muro-aji</i>	7.1	0.64
64		<i>Alectis ciliaris</i>	Giliated threadfish	<i>Itohiki-aji</i>	6.5	0.67
65		<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japanese amberjack	<i>Buri</i>	10.2	0.46
66		<i>Pseudocaranx dentex</i>	White trevally	<i>Shima-aji</i>	9.9	0.05
67		<i>Caranx sexfasciatus</i>	Crevalle jack	<i>Gingame-aji</i>	6.8	0.94
68		<i>Elagatis bipinnulata</i>	Rainbow runner	<i>Tsumu-buri</i>	7.1	0.55
69		<i>Seriola lalandi</i>	Yellowtail amberjack	<i>Hiramasa</i>	7.8	0.10
70		<i>Uraspis helvola</i>	Whitetongue jack	<i>Oki-aji</i>	6.4	0.43

(continued on next page)

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
71	Sparidae	<i>Pagrus major</i>	Red sea-bream	<i>Ma-dai</i>	9.3	0.41
72		<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Blackhead sea-bream	<i>Chinu, Kuro-dai</i>	7.6	1.36
73	Sciaenidae	<i>Pennahia argentata</i>	White croaker	<i>Shiro-guchi</i>	6.5	0.81
74	Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	Common dolphinfish	<i>Shiira, Mahimahi</i>	6.4	0.04
75	Sillaginidae	<i>Sillago japonica</i>	Japanese whiting	<i>Shiro-gisu</i>	6.3	0.72
76	Scombroproidae	<i>Scombrops gilberti</i>	Japanese bluefish	<i>Kuro-mutsu</i>	6.0	1.31
77	Haemulidae	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	Chicken grunt	<i>Isaki</i>	7.4	0.55
78		<i>Plectorhinchus cinctus</i>	Spotted grunt	<i>Koshou-dai</i>	5.1	0.64
79		<i>Diagramma picta</i>	Painted sweetlip	<i>Koro-dai</i>	5.9	0.32
80	Gobiidae	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	Yellowfin goby	<i>Ma-haze</i>	5.5	1.51
81	Serranidae	<i>Epinephelus bruneus</i>	Longtooth grouper	<i>Kue, Ara</i>	5.0	0.65
82		<i>Plectropomus leopardus</i>	Red-spotted rock-cod, Blue spotted grouper	<i>Suji-ara</i>	6.0	0.64
83		<i>Nippon spinosus</i>	Sea-bass, Grouper, Rock-cod	<i>Ara</i>	7.0	0.99
84	Labridae	<i>Choerodon azurio</i>	Tuskfish	<i>Ira</i>	5.2	0.04
85	Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	Chub mackerel	<i>Ma-saba</i>	7.9	0.04
86		<i>Thunnus orientalis</i>	Pacific bluefin tuna	<i>Kuro-maguro</i>	8.8	0.27
87		<i>Katsuwonus pelamis</i>	Striped tuna, Skipjack tuna, Oceanic bonito	<i>Katsuo</i>	10.2	0.63
88		<i>Scomberomorus niphonius</i>	Japanese Spanish mackerel	<i>Sawara</i>	6.3	0.74
89		<i>Thunnus albacares</i>	Yellowfin tuna	<i>Kihada</i>	14.8	0.00

(continued on next page)

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
90	Scombridae	<i>Acanthocybium solandri</i>	Wahoo	<i>Kamasu-sawara</i>	12.3	0.01
91		<i>Euthynnus affinis</i>	Wavyback skipjack	<i>Suma</i>	9.4	0.40
92	Sphyraenidae	<i>Auxis thazard thazard</i>	Frigate tuna	<i>Souda-katsuo</i>	9.2	0.16
93		<i>Sphyraena pinguis</i>	Barracuda	<i>Hon-kamasu</i>	5.6	1.07
94	Girellidae	<i>Girella punctata</i>	Greenfish	<i>Mejina</i>	6.3	1.35
95	Scaridae	<i>Chlorurus microrhinos</i>	Blunt-headed parrotfish	<i>Nanyou-budai</i>	5.6	0.85
96		<i>Scarus rubroviolaceus</i>	Parrotfish	<i>Naga-budai</i>	4.9	0.40
97	Trichiuridae	<i>Trichiurus japonicus</i>	Largehead hairtail	<i>Tachi-uo</i>	4.8	0.48
98	Trichodontidae	<i>Arctoscopus japonicus</i>	Japanese sandfish	<i>Hatahata</i>	2.1	0.00
99	Oplegnathidae	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Barred knifejaw	<i>Ishi-dai</i>	6.5	1.04
100		<i>Oplegnathus punctatus</i>	Parrot-bass	<i>Ishigaki-dai</i>	3.0	0.01
101	Platycephalidae	<i>Suggundus meerdervoortii</i>	Big-eyed flat-head	<i>Megochi</i>	6.7	0.95
102	Nemipteridae	<i>Nemipterus virgatus</i>	Golden threadfin-bream	<i>Itoyori, Itoyori-dai</i>	5.3	0.52
103		<i>Branchiostegus japonicus</i>	Horsehead tilefish	<i>Ama-dai, Aka-ama-dai, Guji</i>	6.1	0.57
104	Acropomatidae	<i>Acropoma japonicum</i>	Lanternbelly	<i>Ho taru-jyako</i>	4.8	1.64
105		<i>Doederleinia berycoides</i>	Blackthroat seaperch	<i>Aka-mutsu, Nodoguro</i>	6.2	0.33
106	Kyphosidae	<i>Kyphosus vaigiensis</i>	Waigeu drummer	<i>Isu-zumi</i>	7.5	1.03
107	Centrolophidae	<i>Psenopsis anomala</i>	Wart parch	<i>Ebo-dai, Ibo-dai</i>	5.4	1.69
108		<i>Hyperoglyphe japonica</i>	Japanese butterflyfish	<i>Me-dai</i>	6.3	0.09
109	Caesionidae	<i>Pterocaesio diagramma</i>	Black-tip fusilier	<i>Takasago</i>	8.0	0.13

(continued on next page)

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
110	Lethrinidae	<i>Gymnocranius euanus</i>	Japanese large-eye bream	<i>Shiro-dai</i>	9.9	1.38
111	Stromateidae	<i>Pampus punctatissimus</i>	Harvest fish	<i>Mana-gatsuo</i>	4.4	0.07
112	Priacanthidae	<i>Cookeolus japonicus</i>	Longfinned bullseye	<i>Chikame-kintoki</i>	6.2	1.53
113	Pholidae	<i>Pholis nebulosa</i>	Blenny	<i>Ginpo</i>	5.1	0.71
114	Gempylidae	<i>Promethichthys prometheus</i>	Snake-mackerel	<i>Kurobisi-kamasu</i>	5.2	0.03

XVII. Pleuronectiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
115	Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Japanese flounder	<i>Hirame</i>	7.6	0.50
116	Pleuronectidae	<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	Righteye flounder	<i>Mako-garei, Karei</i>	6.6	0.00
117		<i>Cleisthenes pinetorum</i>	Souhachi-flounder	<i>Souhachi-garei</i>	6.3	0.06
118	Cynoglossidae	<i>Pseudopleuronectes schrenki</i>	Cresthead flounder	<i>Kurogashira-garei</i>	5.6	0.00
119		<i>Paraplagusia japonica</i>	Tonguefish	<i>Shita-birame, kuro-ushinoshita</i>	6.0	1.62

XVIII. Tetraodontiformes

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
120	Tetraodontidae	<i>Lagocephalus wheeleri</i>	Green rough-backed puffer	<i>Shiro-saba-fugu</i>	7.2	0.00
121	Monacanthidae	<i>Stephanolepis cirrifer</i>	Thread-sail filefish	<i>Kawa-hagi</i>	7.0	0.77

(continued on next page)

No	Family of Linnaean classification	Scientific name of Linnaean classification	Name in English	Name in Japanese	Protein (mg/mL)	OD
122	Monacanthidae	<i>Thamnaconus modestus</i>	Filefish	<i>Umadura-hagi</i>	5.9	1.07
123	Molidae	<i>Mola sp. B</i>	Ocean sunfish	<i>Manbou</i>	2.6	0.00
124	Lophiidae	<i>Lophiomus setigerus</i>	Goosefish	<i>Ankou</i>	2.0	0.07

1-3-3. 日本で食されている 124 魚種の IgG 反応性の比較検討

日本では生物学的分類に基づく硬骨魚 45 目のうち、約 20 目を食用としている。このうち、加工食品のアレルギー表示対象品目に指定されているのはサバ (Perciformes) とサケ (Salmoniformes) のみである。そこで、20 目 71 科に属する 124 魚種の魚肉抽出液を調製し、マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた IgG 反応性のスクリーニング評価を行った。

軟骨魚綱は Agnatha に含まれる 3 目、すなわち Carcharhiniiformes (メジロザメ目, 1 種), Rajiformes (ガンギエイ目, 1 種), Petromyzontiformes (ヤツメウナギ目, 1 種) の計 3 種を評価した。硬骨魚綱は 17 目、すなわち Anguilliformes (ウナギ目, 4 種), Cluperiformes (ニシン目, 6 種), Cypriniformes (コイ目, 2 種), Salmoniformes (サケ目, 9 種), Osmeriformes (キュウリウオ目, 4 種), Gadiformes (タラ目, 3 種), Bericiformes (キンメダイ目, 1 種), Beloniformes (ダツ目, 4 種), Scorpeaniformes (カサゴ目, 13 種), Mugiliformes (ボラ目, 1 種), Gasterosteiformes (トゲウオ目, 1 種), Siluriformes (ナマズ目, 1 種), Aulopiformes (ヒメ目, 2 種), Zeiformes (マトウダイ目, 1 種), Perciformes (スズキ目, 59 種), Pleuronectiformes (カレイ目, 5 種), Tetraodontiformes (フグ目, 5 種) の計 121 種を評価した。これらの評価した 124 魚種の名称, タンパク質量, ELISA 測定で得られた OD を Table 1 に示す。124 魚種の魚肉抽出液の平均タンパク質量は 6.54 ± 2.47 mg/mL となり、いずれも 6 倍抽出液であったことから魚肉 1 g あたりのタンパク質量の平均値を 39.2 ± 14.8 mg/g と算出した。

1. 軟骨魚綱に属する 3 種の評価結果

ヨシキリザメ [1 (Table 1 における魚種番号を示す)], マカスベ [2], カワヤツメ [3] のタンパク質量はそれぞれ 3.8, 2.7, 7.3 mg/mL であり、マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 解析では、いずれも IgG 反応性は検出限界以下となった。

2. 硬骨魚綱に属する 121 種の評価結果

マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 解析の結果を、目ごとに色分けしたものを Fig. 6 に示す。IgG 反応性を示す OD は、同一目、同一科の魚種であっても、魚種による差異が見られた。

OD が 1.5 以上を示した魚種は、6 魚種 (アナゴ [5], マハゼ [80], ホタルジャコ [104], エボダイ [107], チカメキントキ [112], シタバシ [119]) であった。

OD が 1.0 から 1.5 を示した魚種は、18 魚種 (ウナギ [4], ママカリ [10], コノシロ [11], カタクチイワシ [12], コイ [14], ドジョウ [15], イトウ [19], サーモントラウト [24], サヨリ [35], マトウダイ [55], クロダイ [72], クロムツ [76], ホンカマス [93], メジナ [94], イシダイ [99], イスズミ [106], シロダイ [110], ウマヅラハギ [122]) であった。

OD が 0.01 から 0.05 を示した魚種は、12 魚種 (ノレソレ [12], ワカサギ [25], アユ [27], スケトウダラ [29], ホッケ [47], アイブリ [61], シイラ [74], イラ [84], マサバ [85], カマスサワラ [89], イシガキダイ [100], クロビシカマス [114]) であった。

IgG 反応性が検出限界以下であった魚種は、11 魚種(シラウオ[28], コマイ[31], マカジカ[37], ホテイウオ[49], ノロゲンゲ[57], キハダ[89], ハタハタ[98], カレイ[116], クロガシラカレイ[118], シロサバフグ[120], マンボウ[123])であった。

ELISA 法によるスクリーニング評価の結果, IgG 反応性が低かった 23 魚種の SDS-PAGE による泳動図を Fig. 7 に示す. スクリーニング評価の結果, 最も IgG 反応性が高かったアナゴ PA および精製 PA は, 6.6 kDa の分子量マーカー付近のバンドとして見出された. PA は 10-12 kDa の分子量を持つと報告されているが, これらのバンドはウェスタンブロット法により PA であることを確認した. ホテイウオ, ノロゲンゲ, ハタハタ, クロガシラカレイでは, 標準物質であるアナゴ PA と同一の分子量域にバンドが見出された. 軟骨魚綱であるヨシキリザメ, カワヤツメと, 硬骨魚綱であるキハダ, カマスサワラ, シロサバフグ, マンボウには該当する分子量域にバンドは見られなかった.

1-3-4. シロザケ, シシヤモ, シログチの魚肉中の PA 含有量の測定

精製した PA で検量線を作成し, 魚肉 1 g 中の PA 含有量を測定した結果, シログチでは 17.6 mg/g ($R^2=0.97$), シロザケでは 6.1 mg/g ($R^2=0.96$), トキシラズでは 4.9 mg/g ($R^2=0.97$), シシヤモでは 5.9 mg/g ($R^2=0.99$) であった. トキシラズは季節もののシロザケで, その PA 含有量はシロザケのそれよりも低かった.

- Chondrichthyes
- Cypriniformes
- Bericiformes
- Gasterosteiformes
- Perciformes
- Anguilliformes
- Salmoniformes
- Belontiiformes
- Siluriformes
- Pleuronectiformes
- Clupeiformes
- Gadiformes
- Mugiliformes
- Scorpaeniformes
- Aulopiformes
- Tetraodontiformes
- Zeniiformes

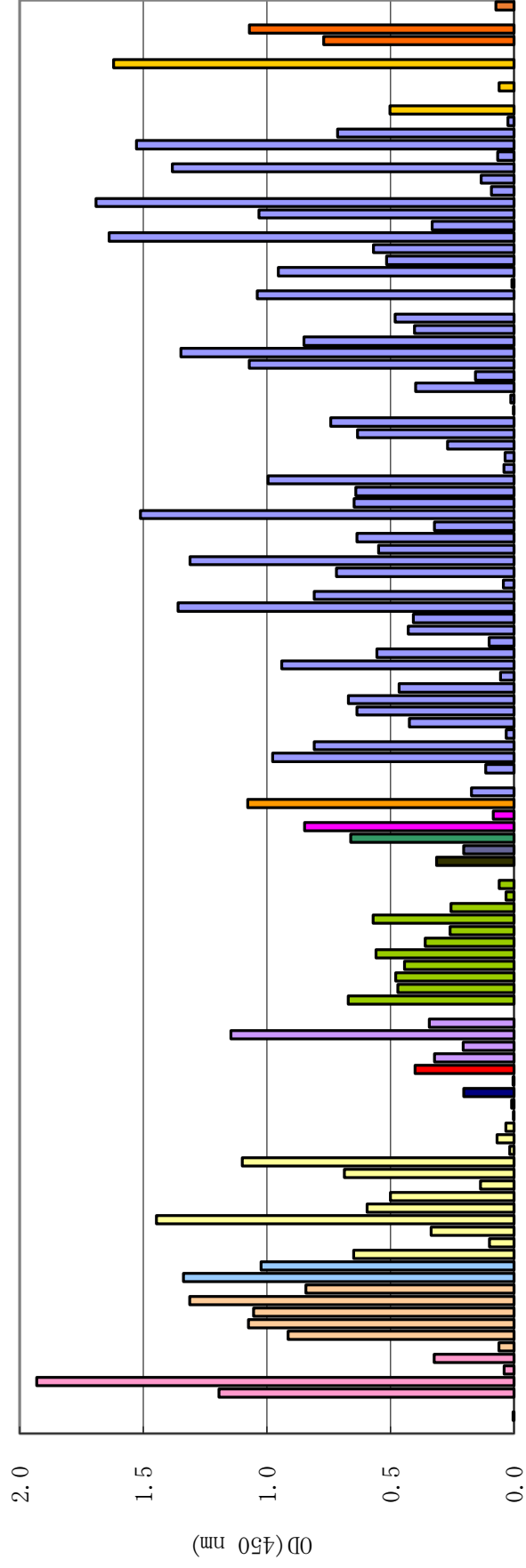


Figure 6. The IgG reactivities against 124 kinds of fish by ELISA.

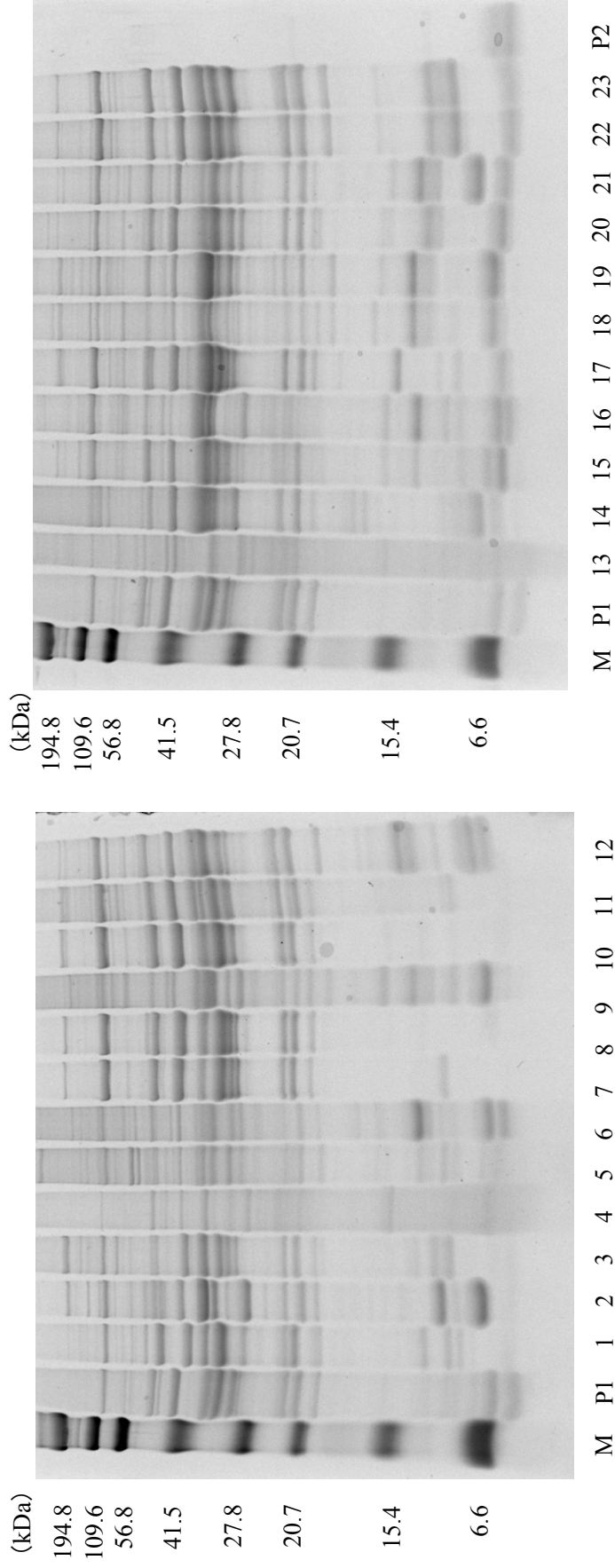


Figure 7. SDS-PAGE of the extracts of 23 species of fish that showed low antigenicity or no antigenicity on the ELISA screening test. Lane M, molecular weight marker (from bottom to top: 6.6, 15.4, 20.7, 27.8, 41.5, 56.8, 109.6, and 194.8 kDa); P1, *anago* as a positive control; P2, purified PA as a positive control; 1, *yoshikiri-zame*; 2, *ma-kasube*; 3, *kawa-yatsume*; 4, *shira-uo*; 5, *hotei-uo*; 6, *noro-gege*; 7, *kihada*; 8, *kamasu-sawara*; 9, *hatahata*; 10, *shiro-saba-fugu*; 11, *manbou*; 12, *ma-kajika*; 13, *nore-sore*; 14, *nishin*; 15, *wakasagi*; 16, *shisyamo*; 17, *ayu*; 18, *komai*; 19, *suketou-dara*; 20, *hokke*; 21, *hakkaku*; 22, *kurogashira-karei*; and 23, *karei*.

1-4. 考察

1-4-1. サケ科 12 魚種の IgG 反応性および IgE 反応性の比較

シロザケとベニザケは古くから日本で好んで食されている。いずれも降海型であり、川で孵化し、海で成長し、成魚となって遡河する。シロザケの IgG 反応性および IgE 反応性は、検討した 12 魚種の中で最も低かった。魚種間における PA のアミノ酸配列に大きな違いがない場合には IgG 反応性による PA の定量性が議論可能である。ニジマス、ヒメマス、ヤマメはいずれも陸封型であるとときに、日本では「マス」に分類されている。これらの魚種の IgG 反応性および IgE 反応性は今回検討した魚種の中では高いものであった (Fig. 1)。ヤマメとサクラマス、ヒメマスとベニザケを用いた先行研究においても同様の結果が得られている (Kondo *et al.*, 2009; Shimakura *et al.*, 2012)。近藤らはヤマメとサクラマスの PA の質は同じであり、IgG 反応性の違いは魚肉に含まれる PA の量の違いによると考察している (Kondo *et al.*, 2009)。瞬発筋は、筋繊維の収縮において重要な役割を果たしている PA の含有量が高い (Muntener *et al.*, 1995)。陸封型の生活史を有する魚種の方が、瞬発筋の量が相対的に多く、結果的に、PA の含有量が高くなると考えられる。魚類アレルギーが懸念される患者は、陸封型の生活史を有する魚種の摂取に注意しなければならない。

1-4-2. 食品表示制度に残る問題点

2002 年以降、食品衛生法 (2015 年より食品表示法) により、「さけ」は加工食品のアレルギー表示対象品目 (表示が推奨されているもの、特定原材料に準じる 20 品目の一つ) となっている。サケとマスは生物学的には類似しており、同じサケ目サケ科でありながら、陸封型のマは表示対象品目として指定されていない。その一方で、アレルギー患者が陸封型であるマス類を食し、アレルギー症状を呈した症例も報告されている。近藤らは、アレルギー表示が制度化された黎明期には十分なデータがなく、消費量が多い降海型のサケ類のみが対象となったと推察している (Kondo *et al.*, 2009)。近藤らや嶋倉らは、サケ類と陸封型のマス類の比較データを報告し、陸封型のサケ科魚類についても表示するよう表示制度の改定を提言している (Kondo *et al.*, 2009; Shimakura *et al.*, 2012)。

シロザケやベニザケといった伝統的に食されているサケ類の表示は、アレルギー患者の誤食を防ぐ観点から重要である。IgG 反応性および IgE 反応性の両者が高いマスノスケ (キングサーモン) などの大型のサケ類の輸入量および消費量も近年増加していることから、アレルギー患者のこれらの魚類の摂食には注意が必要である。清流魚として知られているイトウやイワナも陸封型のサケ科魚類であり、IgG 反応性および IgE 反応性が高く、魚類アレルギー患者、特にサケアレルギーを有する患者にとっては注意すべき魚種である。

1-4-3. 大型魚類の頭部から尾部にかけての IgG 反応性における部位依存的な変化

本検討に用いた体長 50 cm 以上の魚の属性を Table 2 に示す。クロマグロやマスノスケなどの大型の遠洋性回遊魚では、頭部から尾部にかけての IgG 反応性の減少が見られた。一方、ハモやナマズといった運動量の少ない底生魚では、頭部から尾部にかけての変化が小さかった。底生魚

の中でもハモやナマズは、全身をくねらせる躯体運動を行う。多くの底生魚は回遊を行わないため、運動量が少ない一方で、この躯体運動を行うために瞬発筋が発達する (Ajisaka, 2004)。これらの知見から、IgG 反応性、すなわち PA の含有量が高く、かつ、頭部から尾部にかけての部位依存性が生じにくいと考えられる。一方、外洋性、回遊性の魚種では持久筋が発達しているため、PA 含有量が低下し、IgG 反応性も低下すると考えられる。

Table 2. Characteristics of eight fishes by growing area and site-dependent change

Japanese fish name	Growing area	Site-dependent change
<i>Kuro-maguro</i>	Outer ocean surface	Large
<i>Masunosuke</i>	Open ocean	Large
<i>Siro-zake</i>	Migration	Large
<i>Hirame</i>	Sandy bottom (depth 10-200 m)	Large
<i>Gin-tara</i>	Mud bottom (depth 2-600 m)	Medium
<i>Hamo</i>	Surface (depth 100 m)	Low
<i>Namazu</i>	Sandy bottom,	Low

魚の大きさとその体型により、遊泳速度や尾鰭の振動速度は異なる。魚体各部位断面の筋肉面積は尾部に近づくにつれ少なくなる。紡錘形の魚種の多くは低速運動の際には鰭を使い、高速運動の際には、魚体尾側の 1/3 を大きくくねらせて推進力を得る。生息環境は瞬発筋の発達に影響を与え、Ca²⁺結合タンパク質である PA の含有量に差をもたらすと考えられる。

大型のクロマグロは、ブロックに切り分けられて取引される。大トロや中トロとされる部位は、タンパク質が少なく (Fig. 4)、相対的に IgG 反応性が高くなる。このため、魚食によるアレルギー症状の出現が懸念される患者はその摂食を避けたほうが良いと考えられる。血合いや、ほぼ赤身である尾の身ブロックは、IgG 反応性が低く、魚類アレルギーを懸念する患者に対する低アレルゲン化食品となり得る。

1-4-4. 日本で食されている 124 魚種の比較

赤身魚であるキハダやカマスサワラは SDS-PAGE のバンドパターンが相互に類似しており (Fig. 7)、かつ、抽出液中のタンパク質量もそれぞれ 14.8 および 12.3 mg/mL と高値であった。赤身魚は持久筋が発達しており、相対的に瞬発筋が少なく、PA 含有量が少ないと考えられる。サバなどはヒスタミン由来のアレルギー様中毒症状の発生が懸念されるが、PA 反応性の魚類アレルギー患者には、鮮度の良いものを低アレルゲン化食品として提供できる可能性が示された。

ヨシキリザメ、シラウオ、マカジカ、シロサバフグでは抽出液中のタンパク質量がそれぞれ 7.2, 7.1, 5.8, 7.2 mg/mL と少なくないものの、PA に対する IgG 反応性は見られなかった。広く摂食されている魚種ではないが、PA 反応性の魚類アレルギー患者が摂食することができる可能性がある。マカスベは、SDS-PAGE において明瞭なバンドが見られるにも関わらず、IgG 反応性が全くみ

られないことから、エピトープ部位におけるアミノ酸配列が大きく異なる PA である可能性がある。

1-4-5. 魚種による PA 含有量の違いと水晒しによる低アレルギー化効果

検討結果を参考にして、医師の指導のもとで、サケアレルギー患者にシシャモを試したところ、アレルギー症状を呈することなく食することができた。シシャモの魚肉中の PA は 5.9 mg/g であり、シロザケの 6.1 mg/g とほぼ変わらない。しかし、シシャモは食することができたことから、シシャモ PA は、シロザケ PA とはエピトープ部位が異なると考えられた。一般的にシシャモとして売られているカラフトシシャモの検討は行なっていないが、シシャモが属する Osmeridae (キュウリウオ科) の魚種はアレルギー性が低い可能性があり、今後の検討が必要である。

食品加工に用いられるシログチは 17.6 mg/g と PA 含有量が高かった。シログチの OD は 0.81 と比較的高いが、魚肉抽出液として抽出された PA と水溶性タンパク質の総量は 6.5 mg/mL であった。魚肉中のタンパク質量は 32.5 mg/g と仮定すると、54%が PA である。シログチを生で食する頻度は低く、多くは水産加工品として摂食されている。水産加工品の原材料として用いられる魚肉は水晒し工程を経て利用されることが多く、PA は水溶性が高いため低アレルギー化効果が期待できる。

アナゴ、ホタルジャコ、エボダイ、マハゼ、シタビラメ、チカメキントキもタンパク質 1 g あたりの OD、すなわち比活性がシログチのそれよりも高かった。サケ科魚類の中でも、イトウ、サーモントラウト、ヤマメも比活性がシログチよりも高かった。これらの魚種は抽出されるタンパク質に占める PA の割合が高いため、水晒しによる低アレルギー化効率もより高くなると推察される。

1-5. 小括

魚類アレルギーに苦しむ患者は、魚肉や水産加工品の除去を指導されていることが多い。本章では、日本全国で食されている 128 魚種を集め、魚類アレルギー患者が安全に食することができる魚種を探索する際に有用な IgG 反応性に関する情報を集積するため、魚肉中に含まれる PA 量および IgG 反応性の魚種による違いを ELISA 法で評価した。

魚肉中の PA に対する IgG 反応性は、生物学的近縁種であっても異なること、陸封型の生活史を有する魚種では高くなりやすいこと、同一個体における IgG 反応性は頭部から尾部にかけて減少する傾向にあることを確認した。これらの情報は食べられる魚種を選ぶ際の指標となりうる。

サケ科 12 魚種の比較検討により、イトウの IgG 反応性が最も高く、シロザケが最も低いことを明らかにした。サケ PA に反応性を有する魚類アレルギー患者の血清 IgE との反応性を評価した結果、今回検討した全てのサケ科魚種に対して IgE 反応性を示し、シロザケと比べて他の全てのサケ科の魚種は有意に反応性が高いことを明らかにした。サケもマスもサケ科の魚種であり、マスはサケよりも IgG 反応性が高い傾向にあるにもかかわらず、現在のアレルギー表示制度の下でマスは表示義務および推奨のいずれもされていない。このような表示制度は魚類アレルギー患者に危険を及ぼす可能性がある。現在の表示法では代替表記と拡大表記が認められ、かつ、表記の範囲には遡河性さけ・ます類（しろざけ、べにざけ、ぎんざけ、ますのすけ、さくらます、からふとます、その他の遡河性さけ・ます類）が提示されるようになってきた。日本で広く食されているサケ科の魚は、海へ出ることなく一生を川で過ごす陸封型の生活史を有するものと、川で生まれ海で生活する降海型の生活史を有するものに大別される。本研究では 3 対の降海型と陸封型のペア、すなわち、ヒメマスとベニザケ、ヤマメとサクラマス、ニジマスとサーモントラウトについて検討した結果、いずれも陸封型の魚種のほうが、IgG/IgE 反応性が高いことを明らかにした。

さらに、大型の 7 魚種を用いて、部位依存性を検討した結果、外洋に生息するクロマグロやマスノスケは、頭部の PA 反応性が高く、尾部の PA 反応性が低かった。一方、底生魚であり、全駆運動をするハモやナマズはそうした部位依存性が見られなかった。

124 魚種を対象として行なったスクリーニングの結果、キハダ、カマスサワラ、シロサバフグ、マンボウ、シラウオ、マカジカは PA の含有量が極めて少なかった。また、ヨシキリザメ、マカスベ、カワヤツメも PA の含有量が少なかった。精製した PA で検量線を作成し、魚肉に含まれる PA の含有量を測定した結果、シログチは 17.6 mg/g ($R^2=0.97$)、シロザケは 6.1 mg/g ($R^2=0.96$)、トキシラズは 4.9 mg/g ($R^2=0.97$)、シシヤモは 5.9 mg/g ($R^2=0.99$) であった。

これらの結果から、PA が少ない魚種あるいは IgG 反応性が非常に低い PA を有する魚種を予測し、これらの魚種を用いることにより、OFC の実施における症状誘発のリスクを低下させる可能性を示すことができた。

第2章 カタクチイワシ魚肉に含まれる PA およびコラーゲンの 酵素処理による IgE 反応性の低減化に関する検討

2-1. 序論

第1章では、魚類アレルギーの主要アレルゲンである PA に着目して、アレルギー症状を起こしにくい魚種の探索を行った。魚肉はその調理・加工品を摂取する機会が多く、調理・加工がアレルゲン性に与える影響を考慮する必要がある。アレルゲン性を低下させることを目的とした、水産加工品の原材料魚肉を前処理するための実用的な手法を開発することで、制限食による制約の軽減が期待できる。そこで、第2章ではプロテアーゼを用いた低アレルゲン化の有効性を明らかにすることを目的として、カタクチイワシの魚肉を食品製造加工用の7種の酵素で処理し、得られた魚肉エキス中の PA およびコラーゲンの IgG 反応性および IgE 反応性を ELISA 法および阻害 ELISA 法により評価した。

プロテアーゼは、タンパク質中の内在性アミノ酸配列の切断（分解）やアミノ酸側鎖の化学修飾、アミノ酸残基の置換（変性）により、その立体構造および抗体との結合力を変化させる。魚類アレルギーにおける主要アレルゲンである PA は、加熱・加圧調理により、そのアレルゲン性が低減化される。その一方で、ペプシンやトリプシンなどの消化酵素および酸処理ではそのアレルゲン性は消失されない (Unstersmyr *et al.*, 2005, 2007)。

一般にエキスとは、食品素材から味や香り、風味などに関わる成分を抽出したものをいう (Watanabe, 1994)。原料には、エビ、カニなどの甲殻類、エソ、グチ、ハモなどの白身魚、鰹節などの水産加工品を使用する。工業的に供給されている魚介エキスには、熱水抽出により水溶性の旨味成分を抽出したものや、水産加工品のボイル処理時に出る煮汁を濃縮したものがある。このような粗抽出法で製造されたものだけでなく、自己消化によりペプチド化したものや、食品製造用のプロテアーゼを添加して調製されるものがある。魚肉を塩とともに漬け込み、自己消化や好気性細菌の働きで発酵させた魚醤も、調味料として使用される魚介エキスの一種である。魚醤の一種として知られるナンプラーにはカタクチイワシが原料として用いられている。

1894年に高峰譲吉によりタカヂアスターゼが開発されて以来、生育が早く短時間に多種多様な分解酵素を多量に生産するカビが酵素の供給源として用いられている (Takeuchi, 1994)。特に、プロテアーゼは、ペプチド結合を加水分解する酵素の総称であり、酵素が基質に対してエキソ型に作用するエキソペプチダーゼ（ペプチダーゼ）と、エンド型に作用するエンドペプチダーゼ（プロテイナーゼ）に大別される。前者は作用様式によりアミノペプチダーゼなどの6つの酵素群に細分され、後者はセリンエンドペプチダーゼなどの4つの酵素群に細分される。各酵素は最適 pH を有することから、酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼと分類されることもある (Honma, 2016)。

本研究では、ウマミザイム G、プロテアーゼ M「アマノ G」、プロテアーゼ P「アマノ 3G」、アルカラーゼ、プロタメックス、ニュートラーゼ、フレーバーザイムの7種類の食品製造用酵素（プロテアーゼ）により調製した魚肉エキスを評価した。これらの食品製造用酵素を用いて魚肉を処理することで、魚肉タンパク質から魚肉ペプチドが生成される。得られた魚肉ペプチドは低分子量化されており、抗原提示能が低下すると予測される。PA のアレルゲン性 (IgE 反応性) は Ca^{2+}

により保持される立体構造エピトープにより提示される (Leung *et al.*, 2014). コラーゲンは α 2鎖の領域941-960のアミノ酸配列が共通のエピトープと考えられている (Shiomi *et al.*, 2010). 酵素により, これらのエピトープ部位が同時に分解・変性されるならば, 広範な魚種を対象に, その魚肉を低アレルギー化するための調理・加工法として活用できる (Suzuki *et al.*, 2007).

第2章における研究の目的は, プロテアーゼ活性を有する食品製造加工用酵素を用いて, アレルギー性が低下した魚肉エキスが得られることを示すことである. 魚類アレルギー患者はPAに反応することが多い. その一方で, コラーゲンに反応する患者も一定数存在する (Shiomi, 2003). プロテアーゼを用いることで, 主要アレルギーであるPAだけではなく, コラーゲンを含めたその他のアレルギータンパク質を低アレルギー化できる可能性がある.

そこで本研究では, カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) の魚肉にカビ由来の7種類の食品製造加工用酵素を作用させ, 得られた魚肉エキスの官能試験を行うとともに, ヒスタミン含有量とペプチドの分子量分布を評価した. さらに, 得られた魚肉エキスのIgG反応性およびIgE反応性を評価した.

2-2. 材料および方法

2-2-1. 試料

本研究で使用したカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) は、神奈川県水産試験場から提供された。捕獲後に、可食部のみを -20°C で急速冷凍し、実験に用いるまで保管した。

食品製造加工用に用いられる 7 種の酵素を、株式会社アミノ酵素とノボザイムジャパン株式会社から入手した。前者から入手したプロテアーゼ M 「アミノ G」 (酵素 1), プロテアーゼ P 「アミノ 3G」 (酵素 2), ウマミザイム G (酵素 3) と、後者から入手したアルカラーゼ (酵素 4), プロタメクス (酵素 5), ニュートラーゼ (酵素 6), フレーバーザイム (酵素 7) を用いた。酵素の製造ロットの詳細については検討を行わなかった。各酵素の性質を Table 3 に示す。

Table 3. Characteristics of the seven enzymes used in the preparation of fish extracts

Enzyme No.	1	2	3	
Product name	Protease M “Amano” G	Protease P “Amano” 3G	Umamizyme G	
Origin	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus melleus</i>	
Exopeptidase activity	○	○	○	
Endopeptidase activity	○	○		
Protease type	neutral	acidic, neutral	neutral	
Optimum pH	8	4.5	8	
Optimum temperature	45° C	50° C	45° C	

Enzyme No.	4	5	6	7
Product name	Alcalase	Protamex	Neutralse	Flavourzyme
Origin	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>A. oryzae</i>
Exopeptidase activity				○
Endopeptidase activity	○	○	○	○
Protease type	alkaline		neutral	
Optimum pH	6.5-8.5	5.5-7.5	5.5-7.5	5.0-7.0
Optimum temperature	55-70° C	35-60° C	45-55° C	50° C

血清を用いた IgE 反応性の評価には、PA のみに反応する魚類アレルギー患者 4 名 (ラベル a-d) とコラーゲンのみに反応する患者 3 名 (ラベル e-g) から提供された血清を用いた。なお、これら

の患者血清はインフォームドコンセントを得た上で使用した。

2-2-2. 魚肉の酵素処理による評価用エキス試料の調製

前述の7種の酵素を用いてカタクチイワシの魚肉を処理し、評価用エキス試料(以下、エキス)7種を調製した。エキス1-3と7は、酵素1-3と7で魚肉を個々に処理したものである。エキス4-6は、酵素4-6で個々に処理した後、酵素7を組み合わせて処理したものである(Table 4)。

Table 4. Enzyme combinations used in the preparation of fish extracts

Extract No.	1	2	3	4	5	6	7
Enzyme No.	1	2	3	4, 7	5, 7	6, 7	7

カタクチイワシ魚肉可食部を細切し、①NaCl添加、②殺菌、③酵素添加、④酵素失活の4段階の工程により酵素処理を施した。

酵素1-3の使用では、20 mLの20% NaCl水溶液に10 gの細切した魚肉を加え、最終NaCl濃度が13.3%の懸濁液を得た。この懸濁液を100°Cで10分間加熱した後、室温に戻した。10 mgの酵素1-3を懸濁液に加え、40°C恒温槽内で72時間加温した。その後100°Cで30分間加熱し、酵素を失活させた。この懸濁液を2,000×gで10分間遠心分離にかけた。孔径0.45 μmのシリンジフィルターで上清をろ過し、評価用エキス試料とした。

酵素4-7の使用では、20 mLの15% NaCl水溶液に10 gの細切した魚肉を加え、最終NaCl濃度が10.0%の懸濁液を得た。この懸濁液を100°Cで10分間加熱した後、室温に戻した。20 mgの酵素4-7を懸濁液に加え、55°C恒温槽内で1時間加温し、続けて100 mgの酵素7を加え、55°C恒温槽内でさらに5時間加温した。その後100°Cで30分間加熱し、酵素を失活させた。この懸濁液を2,000×gで10分間遠心分離にかけた。孔径0.45 μmのシリンジフィルターで上清をろ過し、評価用エキス試料とした。

2-2-3. カタクチイワシPAの精製

カタクチイワシ魚肉可食部を、①粗抽出液の調製、②GPCによる粗精製、③陰イオン交換クロマトグラフィー(Anion exchange chromatography, AIC)による精製の順で処理し、カタクチイワシPAを精製した。

粗抽出液は、魚肉に4倍量のPB(pH 7.0)を用いた加熱抽出法により調製した。魚肉に4倍量のPB(pH 7.0)を加えてホモジナイズした後、懸濁液を0°C、18,800×gで20分間遠心分離にかけた。得られた上清を100°Cで20分間加熱した後、同様に遠心分離にかけた。孔径0.45 μmのシリンジフィルターで上清をろ過し、粗抽出液を得た。

粗抽出液をSephacryl-S-100 HRカラム(GE Healthcare Life Sciences; 2.6×100 cm)を用いたGPCにより粗精製を行なった。溶離液には10 mmol/L PBS(pH 7.0)を用い、カラム温度4°C、流速30 mL/hで通液し、6.0 mLずつ分画した。クロマトグラフィーによる分画後、マウス抗カエ

ル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA により PA の溶出画分を確認した。PA 溶出画分の確認のための ELISA 法は、2-2-4. IgG 反応性の評価のための ELISA 測定で述べる。PA 溶出画分は、透析膜 (Spectra/Por 3 Dialysis Membrane MWC0 3,500, Spectrum Lab.) を用いて、蒸留水中で一晩透析した後、凍結乾燥して濃縮し、次の工程に供した。

GPC による粗精製の次に、Mono Q 5/50 GL カラム (GE Healthcare Life Sciences; 0.5×50 mm) カラムを用いた AIC により精製を行なった。カラムの平衡化には 50 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を流速 1.0 mL/min で通液し、その後、1 mol/L NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を溶離液に用い、濃度勾配を 0-100% としながら 100 分間通液し、0.5 mL ずつ分画した。

2-2-4. IgG 反応性の評価のための ELISA 測定

市販抗体を用いた ELISA 法により、調製したエキス試料の IgG 反応性を評価した。コーティング液には炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を、ブロッキング液には 1% BSA を含む DPBS を、抗体希釈液には 0.1% BSA を含む DPBS を、洗浄液には 0.15 mol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mmol/L PB (pH 7.0) を用いた。PA の評価における 1 次抗体には 4,000 倍に希釈したマウス抗カエル PA モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich Co.) を、2 次抗体には 2,000 倍に希釈した HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。コラーゲンの評価における 1 次抗体には 1,000 倍に希釈したウサギ抗サケコラーゲンポリクローナル抗体 (Novatec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany) を、2 次抗体には 4,000 倍に希釈した HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。

コーティング液を用いて 1,000 倍 (前述 2-2-3. でのクロマトグラフィーにおける PA 溶出画分の評価では 2,500 倍) に希釈した評価用エキス試料 (クロマトグラフィー画分) を 96 穴マイクロプレート (H type; Sumitomo Bakelite Co. Ltd., Tokyo, Japan) の各ウェルに 50 μ L 添加し、4°C で終夜インキュベートした。その後、プレートウォッシャーを用いて洗浄液で 3 回洗浄した。各ウェルにブロッキング液を 300 μ L 添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。洗浄後、1 次抗体を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、TMB (Pierce Biotechnology Inc.) を 50 μ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。反応停止液である 1 mol/L 硫酸を 100 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて波長 450 nm で OD を測定した。

2-2-5. IgE 反応性の評価のための ELISA 測定

患者血清を用いた ELISA 法により評価用エキス試料の IgE 反応性を評価した。コーティング液には炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を、ブロッキング液には 1% BSA を含む DPBS を、抗体希釈液には 0.1% BSA を含む DPBS を、洗浄液には 0.15 mmol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mmol/L PB (pH 7.0) をそれぞれ用いた。1 次抗体には血清を、2 次抗体には HRP 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。

コーティング液を用いて 1,000 倍 (PA 評価用) あるいは 100 倍 (コラーゲン評価用) に希釈し

た評価用エキス試料を 96 穴マイクロプレート (Maxisorp; Nalge Nunc International, NY, USA) の各ウェルに 50 μ L 添加し、インキュベーターを用いて 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、プレートウォッシャーを用い、上記の洗浄液にて 5 回洗浄した。続いて、各ウェルにブロッキング液を 350 μ L 添加し、4°C で終夜インキュベートした。洗浄後、抗体希釈液で 50 倍に希釈した血清を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、抗体希釈液で 2,500 倍に希釈した 2 次抗体を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、TMB (Pierce Biotechnology Inc., IL, USA) を 50 μ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。反応停止液である 1 mol/L 硫酸を 100 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて波長 450 nm で OD を測定した。

2-2-6. IgE 反応性の評価のための阻害 ELISA 測定

阻害率 (%) は $1 - ((A_2 - A_1) / A_0) \times 100$ の式を用いて算出した。 A_0 は阻害剤なしでの吸光度 (最大吸光度)、 A_2 は測定された吸光度、 A_1 は 1 次抗体で処理を行っていない対照ウェル (ブランク) で測定された吸光度の平均とした。吸着抗原には、既知の方法で精製されたマサバ PA あるいはニジマスコラーゲンを用い (Shiomi *et al.*, 1998; Hamada *et al.*, 2001)、阻害剤には、評価用エキス試料を DIW で 100 倍に希釈した溶液を用いた。コーティング液、ブロッキング液、抗体希釈液、洗浄液、1 次抗体、2 次抗体は前述のものを用いた。

5 μ g/mL に希釈したマサバ PA あるいはニジマスコラーゲン 50 μ L を 96 穴マイクロプレート (H type; Sumitomo Bakelite) に分注し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、プレートウォッシャーを用い、洗浄液で 5 回洗浄した。各ウェルにブロッキング液を 350 μ L 添加し、4°C で終夜インキュベートした。25 倍に希釈した患者血清と阻害剤の等量混合溶液 (患者血清の最終希釈倍率は 50 倍、評価用エキス試料の場合は 200 倍) を各ウェルに 50 μ L 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、2,500 倍に希釈した 2 次抗体 50 μ L を各ウェルに分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、TMB (Pierce Biotechnology Inc.) を 50 μ L 添加し、室温にて 5 分間静置した。反応停止液である 1 mol/L 硫酸を 100 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて波長 450 nm で OD を測定した。

2-2-7. SDS-PAGE と等電点電気泳動 (Isoelectric focusing, IEF)

SDS-PAGE および IEF には、Phast System (GE Healthcare Life Sciences) を用いた。試料は 4% SDS および 10% ジチオトレイトール (Dithiothreitol, DTT) を加えた 125 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) に溶解し 4°C で終夜静置した。Phast Gel Gradient 8-25gel (GE Healthcare Ltd.) に前処理した試料とブロードバンドプロテインマーカー (Bio-Rad Laboratories Inc.) を泳動した。泳動後のゲルは CBB R-250 を用いて染色した。

IEF も同様に試料を調製し、Phast Gel IEF 4-6.5 (GE Healthcare Ltd.) に前処理した試料と Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad pI (GE Healthcare Ltd.) を泳動した。泳動後のゲルは Phast Gel Silver Staining Kit (GE Healthcare Ltd.) を用いて銀染色を行った。

2-2-8. GPC

評価用エキス試料の分子量の評価は GPC で行なった。PolyHYDROXYETHYL A 300Å カラム (PolyLC Inc., MD, USA; 2.1×200 mm) を用い、50 mmol/L ギ酸を溶離液として流速 1.0 mL/min で通液し、UV 検出器を用いて 220 nm の吸光度を測定した。

2-2-9. 官能性評価

調製した評価用エキス試料の色調を、透明チューブ中で観察した。4 名の被験者により少量を口に含み、苦味を評価した。

2-2-10. ヒスタミン定量

市販のヒスタミン EIA キットを用いた。

2-2-11. 統計解析

ELISA の測定結果は triplicate で行い、結果の平均値と SD で記述した。群間差の検定は、有意水準 0.05 とする one-way ANOVA で行い、多重検定には Bonferroni 法を用いた。

2-2-12. 倫理的配慮

本研究の実施にあたり、神奈川県衛生研究所にて以下の倫理審査を受けた。平成 17 年 No. 5, 食物アレルギーの原因食物中に含まれるアレルゲンの検出と低アレルゲン化に関する検討 (平成 17 年 10 月 1 日～平成 20 年 3 月 31 日), 平成 18 年 No. 5, 食物アレルギーの原因食物中に含まれるアレルゲンの検出と低アレルゲン化に関する検討: 水産食品の低アレルゲン化に関する研究およびアレルゲン性を指標とした食情報のデータベース化と食教育への活用に関する基盤研究 (平成 18 年 9 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日), 平成 20 年 No. 3, 食物アレルゲンの解析とその応用に関する検討 (平成 20 年 9 月 1 日～平成 23 年 3 月 31 日)。

2-3. 結果

2-3-1. カタクチイワシ PA の精製とアイソフォーム評価

加熱抽出法で得られた未精製の PA を GPC により精製し、8 つの主要ピークを得た (Fig. 8 の◇マークのライン). これらのピークはそれぞれ Fr. 32, 51, 61, 76, 85, 92, 100, 117 を含むものであった. Fr. 76 を含むピークがメインピークであったが, モノクローナル抗カエル PA 抗体を用いた ELISA 測定の結果, Fr. 51 を含むピークのみが IgG 反応性を示した (Fig. 8 の○マークのライン). Fr. 51 に含まれるタンパク質組成を SDS-PAGE で分析した結果, 分子量 12 kDa のタンパク質であった.

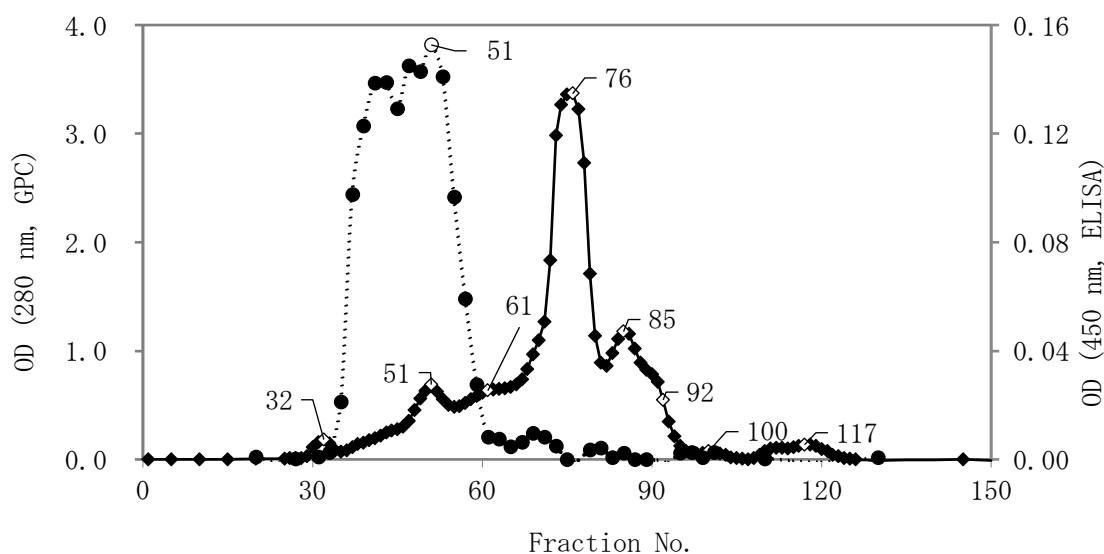


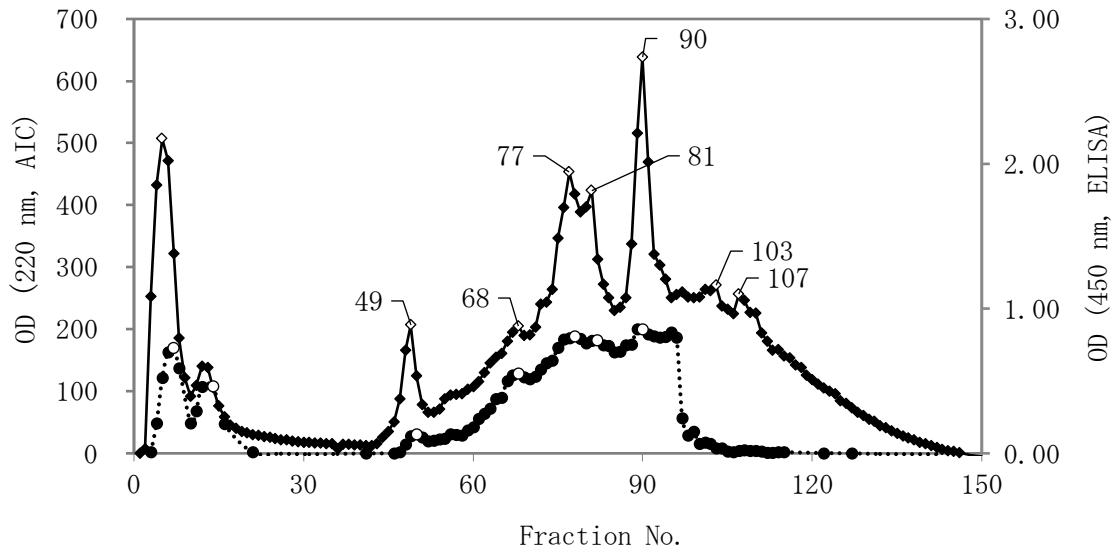
Figure 8. Purification of PA from Japanese anchovy using GPC and ELISA.

Diamond-marked line shows measured values of OD (280 nm) by GPC and circle-marked line shows measured values of OD (450 nm) of ELISA assay. GPC conditions are described in the “2-2-3. Purification of PA from the edible portion of Japanese anchovy” section. A 1:2500 volume of the chromatographic fractions was evaluated by ELISA under the following conditions: primary antibody, monoclonal anti-frog PA antibody (1:4000); secondary antibody, HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:2000).

PA には, pI 4.5-5.2 を示す複数のアイソフォームが知られている (Arif, 2009). そこで, カタクチイワシ PA のアイソフォームを同定するため, カタクチイワシ PA 様タンパク質が溶出していると考えられる Fr. 34-52 を集め, AIC を行った. その結果, 非吸着フラクションを除く 7 つの主要ピークを得た. これらのピークはそれぞれ Fr. 49, 68, 77, 81, 90, 103, 107 を含むものであった (Fig. 9a の◇マークのライン). マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 測定の結果 (Fig. 9a の○マークのライン), Fr. 9, 68, 77, 81, 90 を含む 5 つのピークに抗体

との反応性が見られた。IFE で、それぞれのピークに含まれるタンパク質の pI を評価した結果、3.74 (Fr. 81) , 4.15 (Fr. 77) , 4.23 (Fr. 49) , 4.46 (Fr. 68) , 4.63 (Fr. 90) のタンパク質が見出された (Fig. 9b) .

(a)



(b)

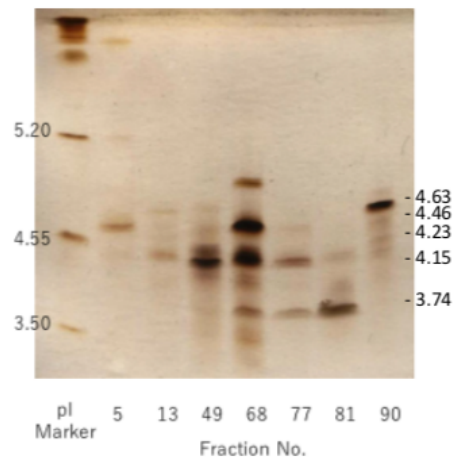


Figure 9. Identification of isoforms of PA of Japanese anchovy by AIC and IEF.

(a) AIC analysis and ELISA assay. Circle-marked line shows measured values of OD (220 nm) by AIC and diamond-marked line shows measured values of OD (450 nm) of ELISA assay. AIC conditions are described in the “2-2-3. Purification of PA from the edible portion of Japanese anchovy” section. ELISA conditions are described in Figure 8. (b) IEF analysis for pI of proteins of five peaks obtained by AIC. IEF conditions are described in the “2-2-7. SDS-PAGE and IEF” section.

2-3-2. 酵素処理した評価用エキス試料の風味の確認とヒスタミン量および分子量の測定

評価用エキス試料はいずれも、食することを躊躇させるような苦味は認められなかった。アルカラーゼとフレーバーザイムで酵素処理したエキス4のヒスタミン量は38.6 ppm ($R^2=0.943$)であり、基準値である200 ppmを下回っていた。エキス1で20.3 ppm, エキス3で64.0 ppm, エキス5で33.2 ppm, エキス6で33.4 ppm, エキス7で36.0 ppmであった。エキス2は検量線における測定可能領域外を示したため、ヒスタミン量を算出することができなかった。エキス2に含まれるヒスタミンがIgG/IgE反応性に影響を与える可能性は低いと考え、評価用エキス試料として、その後の検討にそのまま用いた。

SDS-PAGEで検出することができなかった酵素による消化を受けたアレルゲンタンパク質の分子量分布を評価するために、40-40,000 Daの測定範囲を有するPolyHYDROXYETHYL A カラムを用いてGPC分析を行なった。酵素消化を経て得られた評価用エキス試料のGPCクロマトグラムをFig. 10に示す。分子量マーカーを用いて溶出時間から算出された分子量は、いずれのエキス試料においても1 kDa以下であった。7種の異なる酵素により生成したエキスは、いずれも類似のクロマトグラムを与え、酵素による差異は観察されなかった。

2-3-3. 魚肉の酵素消化によるPAとコラーゲンのIgG反応性の低減化効果

酵素処理を受けたPAとコラーゲンの、各々のIgG反応性をELISAにて評価した結果をFig. 11に示す。抗カエルPA抗体に対するIgG反応性は、ポジティブコントロールである未処理の魚肉抽出液と比較して、いずれのエキス試料においても有意に低下した (Fig. 11a)。一方、抗サケコラーゲン抗体に対するIgG反応性は、エキス1-4ではポジティブコントロールの示した反応生からの変化は見られなかった。一方で、エキス5-7では、ポジティブコントロールが示した反応性の約70%まで有意に低下した (Fig. 11b)。

2-3-4. 魚肉の酵素消化によるPAとコラーゲンのIgE反応性の低減化効果

PA反応性およびコラーゲン反応性患者の血清を用い、得られたエキス試料のIgE反応性を評価した。

調製した全てのエキス試料のIgE反応性は、PA反応性の患者血清で有意に低下した (Fig. 12a)。一方、コラーゲン反応性の患者血清では、上記のIgG反応性の結果 (Fig. 11b) と異なり、全てのエキス試料においてポジティブコントロールのIgE反応性よりも有意に低下した (Fig. 12b)。

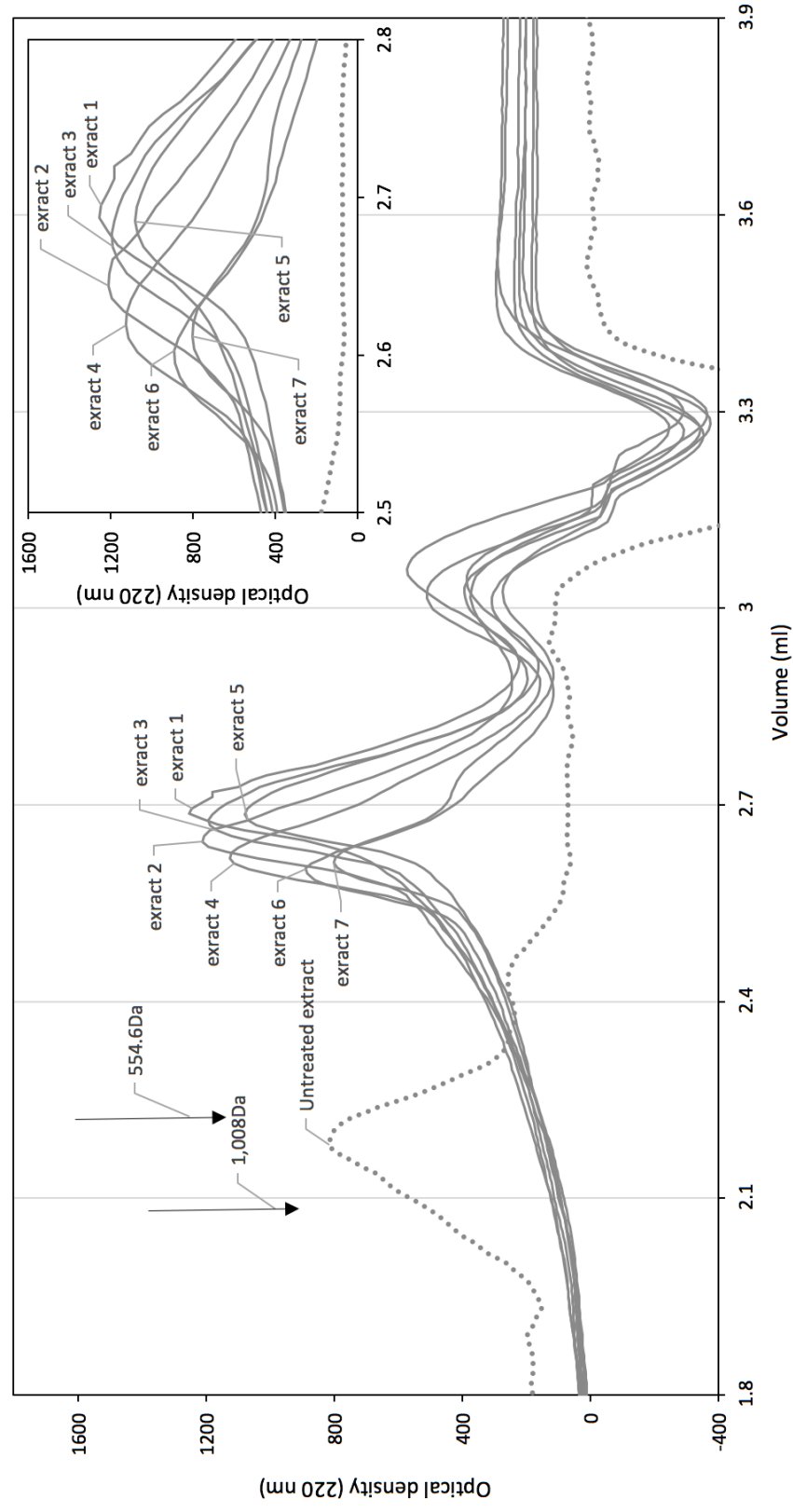
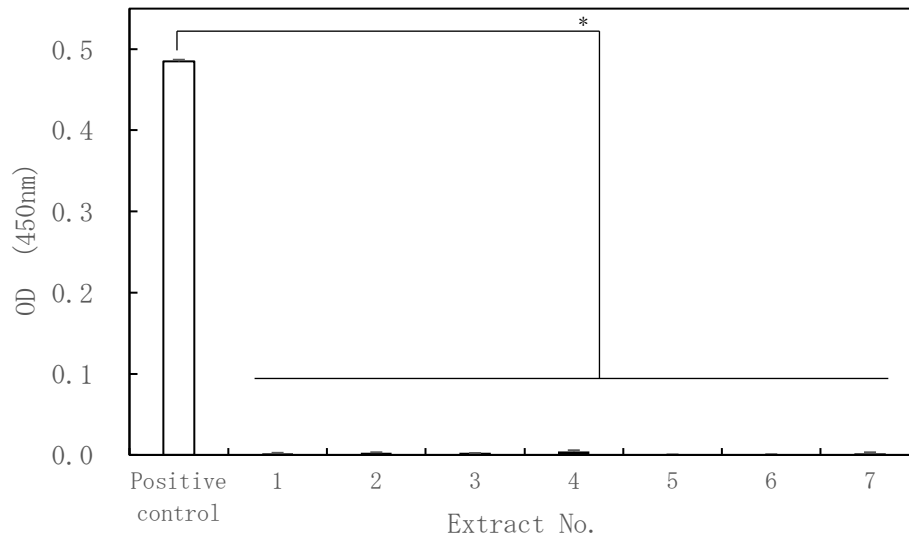


Figure 10. The chromatograms of seven extracts obtained following degradation of fish proteins using fungus-derived enzymes. GPC conditions are as follows: column, PolyHYDROXYETHYL A 300 Å (2.1 × 200 mm, PolyLC Inc., MD, USA); eluent, 50 mM formic acid; flow-rate, 1.0 ml/min.

(a)



(b)

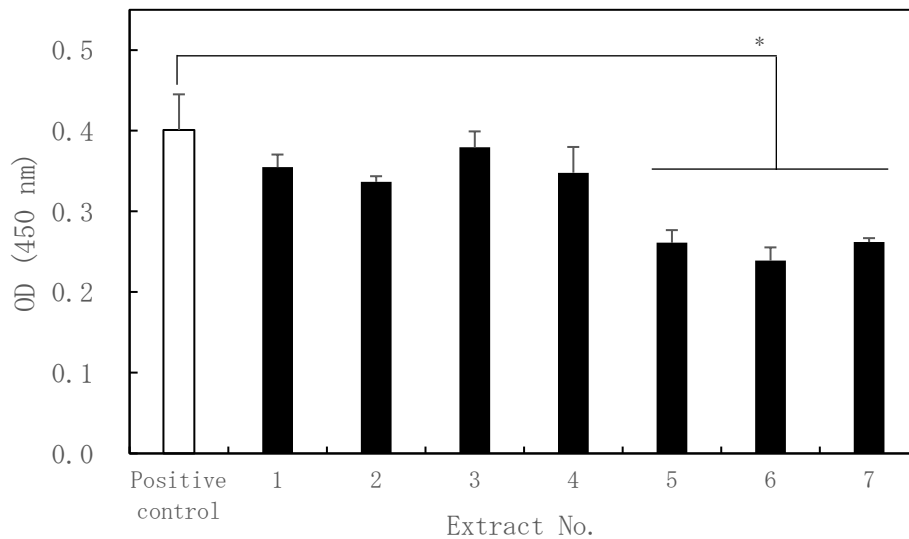
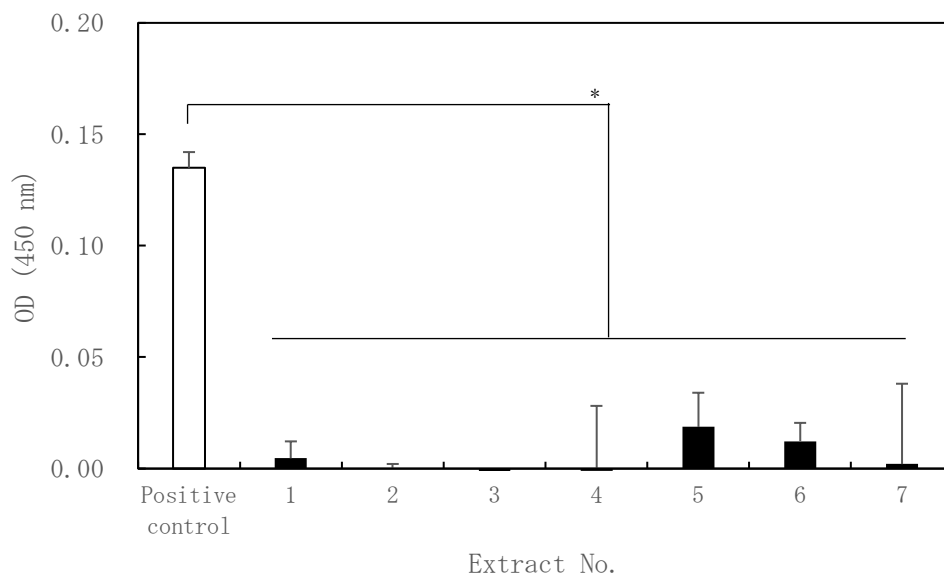


Figure 11. ELISA analysis of IgG-reactivity of extracts prepared from Japanese anchovy meat. (a) Monoclonal anti-frog PA anti-body, (b) polyclonal anti-salmon collagen I antibody. (a and b) Positive control is an extract of untreated fresh meat of Japanese anchovy with enzyme. The enzymes used for preparation of hypoallergic extracts are as follows: 1, Protease M “Amano” G; 2, Protease P “Amano” 3G; 3, Umamizyme G; 4, Alcalase with Flavourzyme; 5, Protamex with Flavourzyme; 6, Neutrase with Flavourzyme; 7, Flavourzyme. Asterisks indicate a significant difference when compared to positive control by Bonferroni test ($p < 0.0018$, $n=8$).

(a)



(b)

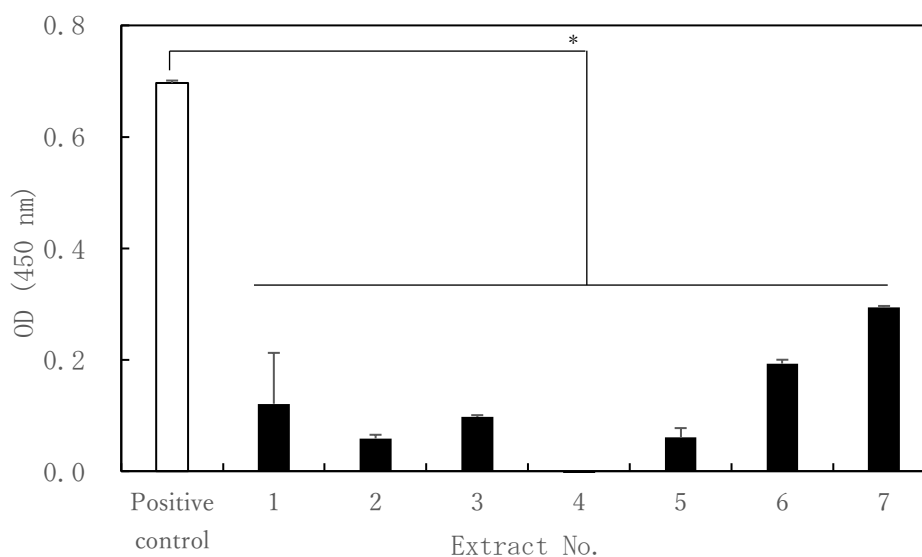
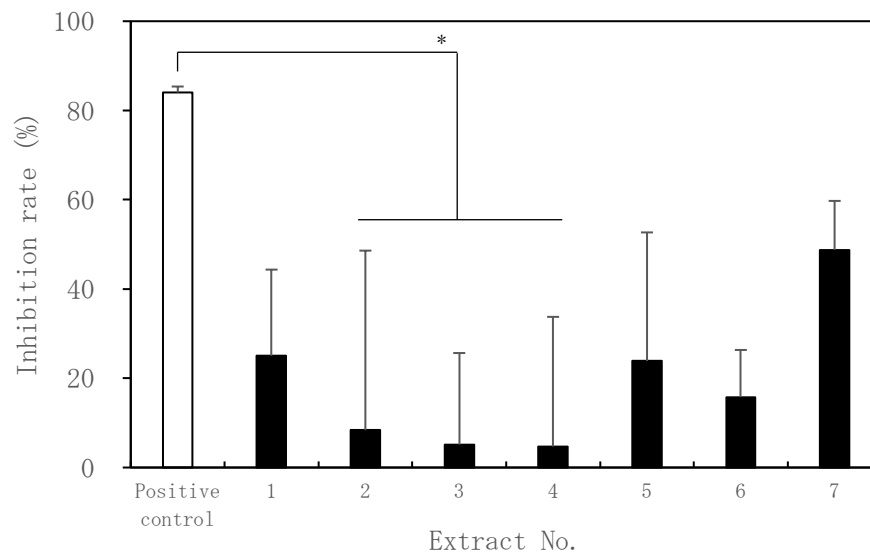


Figure 12. ELISA analysis of IgE-reactivity of extracts prepared from Japanese anchovy meat. (a)PA-reactive patient serum labeled a, (b)collagen reactive-patient serum labeled e. (a and b) Positive control is an extract of fresh meat of Japanese anchovy not treated with enzyme. The enzymes used for preparation of hypoallergenic extracts are as follows: 1, Protease M “Amano” G; 2, Protease P “Amano” 3G; 3, Umamizyme G; 4, Alcalase with Flavourzyme; 5, Protamex with Flavourzyme; 6, Neutrase with Flavourzyme; 7, Flavourzyme. Asterisks indicate a significant difference when compared to positive control by Bonferroni test ($p < 0.0018$, $n=8$).

(a)



(b)

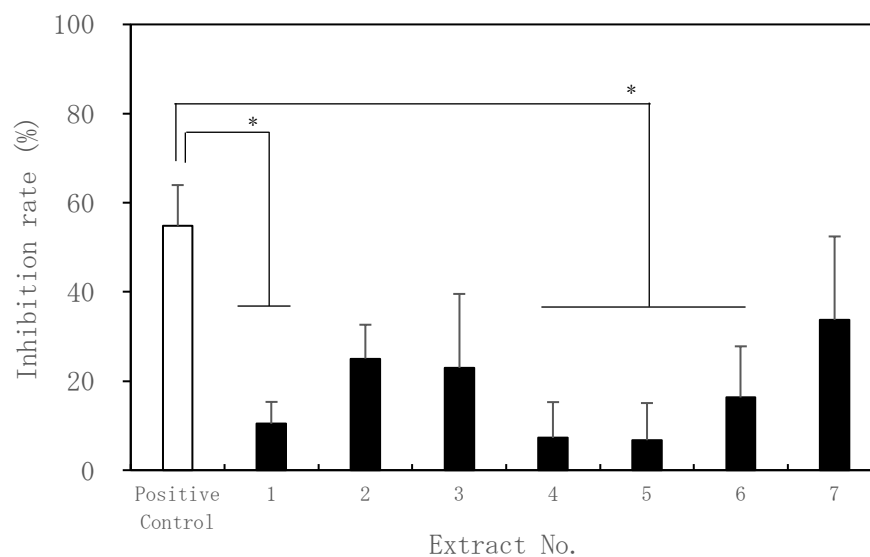


Figure 13. Inhibition ELISA analysis of IgE-reactivity of extracts prepared from Japanese anchovy meat. (a) PA-reactive patient serum labeled a, (b) collagen-reactive patient serum labeled e. (a and b) Positive control is an extract of fresh meat of Japanese anchovy not treated with enzyme. The enzymes used for preparation of hypoallergenic extracts are as follows: 1, Protease M “Amano” G; 2, Protease P “Amano” 3G; 3, Umamizyme G; 4, Alcalase with Flavourzyme; 5, Protamex with Flavourzyme; 6, Neutrase with Flavourzyme; 7, Flavourzyme. Asterisks indicate a significant difference when compared to positive control by Bonferroni test ($p < 0.0018$, $n=8$).

2-3-5. 魚肉の酵素消化による PA とコラーゲンの IgE 反応性の低減化効果の再評価

上記の ELISA 測定により得られた反応性の低下は、マイクロタイタープレートへの吸着力の低下に起因する可能性がある。マサバから精製した PA およびニジマスから精製したコラーゲンを吸着抗原として、阻害 ELISA 法を用いて IgE 反応性の再評価を行った (Fig. 13)。

吸着抗原としてマサバ精製 PA を用いた場合、ポジティブコントロールである未処理の魚肉抽出液が示す阻害率は 84.0% であった (Fig. 13a)。酵素処理したエキス試料をマイクロタイタープレートにあらかじめ吸着させて得られた前述 2-3-4. での ELISA の結果 (Fig. 12a) と異なり、エキス 2-4 のみがポジティブコントロールと比較して、有意に阻害率が低下した。

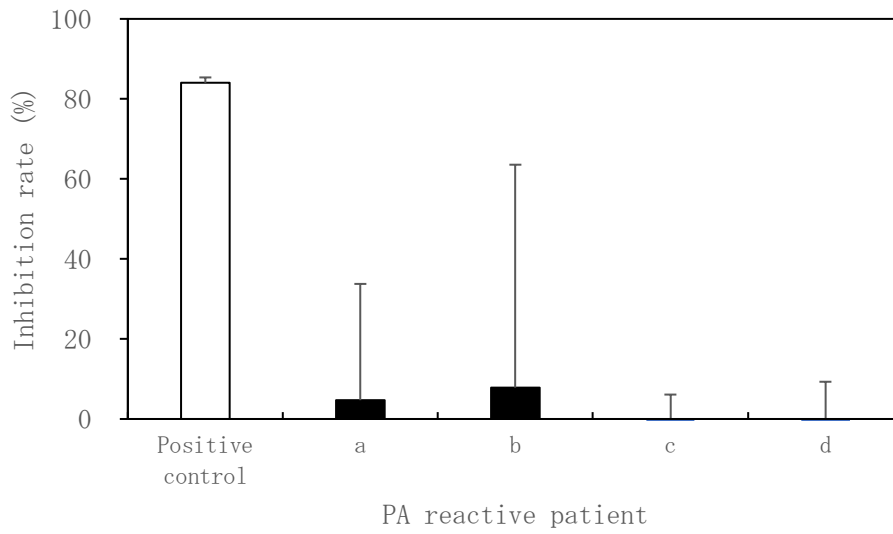
ニジマス精製コラーゲンをを用いた場合、未処理の魚肉抽出液が示す阻害率は 58.4% であった (Fig. 13b)。PA での結果と同様に、処理に用いた酵素により阻害率に差が見られた。エキス 1 およびエキス 4-6 ではポジティブコントロールと比較して、有意に阻害率が低下した。エキス 4 だけが、PA とコラーゲンの両アレルゲンタンパク質に対する阻害率を有意に低下させた。

2-3-6. 患者血清による IgE 反応性の違い

アルカラゼおよびフレーバーザイムで処理して得られたエキス 4 は、PA とコラーゲンの両アレルゲンの低アレルゲン化が達成されていると考えられた (Fig. 13)。しかし、エキスに含有されるペプチドは複数の異なる抗原認識部位を有する可能性がある。そこで、阻害 ELISA による評価を複数の患者血清を用いて行った。Fig. 14 にその結果を示す。

予想した通り、阻害率は患者血清ごとに異なる結果が得られた。PA 反応性の患者血清が示した阻害率は、血清 a で 4.2%、血清 b で 7.8% であったが、残りの血清 c、血清 d は阻害効果が見られなかった。コラーゲン反応性患者では、血清 e で 7.2%、血清 f で 17.6% であるのに対し、血清 g では阻害効果が見られなかった。

(a)



(b)

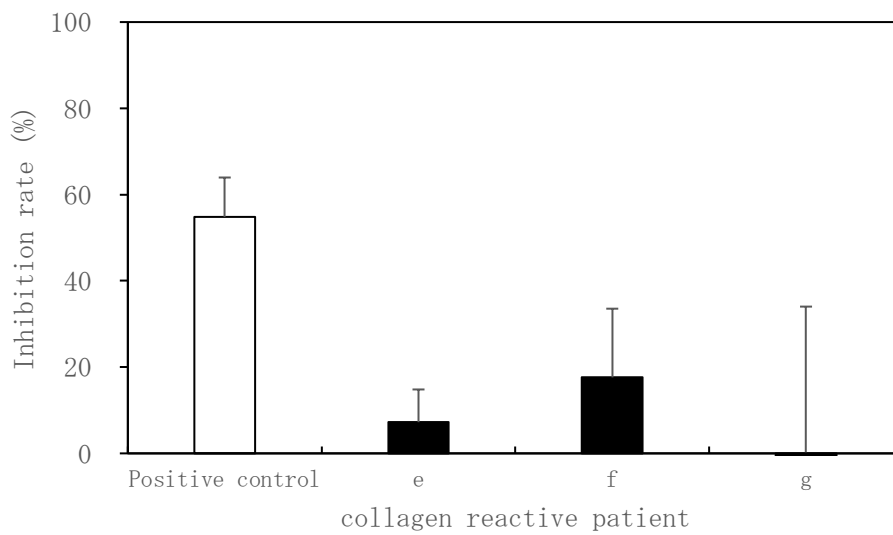


Figure 14. Ig E-reactivity of patients with fish allergies to extract 4, treated with both Flavourzyme and Alcalase. (a)PA-reactive patient sera labeled a-d, (b)collagen reactive-patient sera labeled e-g. (a and b) Positive control is extract of fresh meat of Japanese anchovy not treated with enzyme.

2-4. 考察

2-4-1. カタクチイワシ PA の性質

カタクチイワシは水産加工品の原材料として重要な魚種であり、魚醤の原料となるほか、丸干しやしらす干し、タタミイワシ、煮干しなどとして食されている。その一方で、消費量が非常に多い魚種であるにも関わらず、そのアレルギー性に関する研究は多くない。

本研究ではアレルギー性を評価するため、粗 PA 抽出液から GPC および AIC を用いて PA を精製し、市販の抗 PA 抗体と結合する分子量 10-12.5 kDa の PA 様タンパク質を得た。この PA 様タンパク質は、pI 3.74-4.63 を示す少なくとも 5 つのアイソフォームをもつことを AIC により明らかにした (Fig. 9b)。pI が異なるアイソフォームが得られたことから、アミノ酸配列あるいはリン酸化の程度の違いがあると考えられる。すでに、マダラでは 3 種、コイでは 4 種、ニジマスでは 3 種のアイソフォームがそれぞれ報告されている (Sanuki *et al.*, 2003)。したがって、カタクチイワシ PA 様タンパク質も、アイソフォームが多いと考えられる。同じ魚種の異なるアイソフォームが IgE 抗体と多様な反応性を示すことを示す詳細な研究はないため、今後の検討が必要である。

2-4-2. 食品製造加工用酵素を用いた低アレルギー化エキスの調製手法の確立

市販されている魚介エキスは、煮沸、酵素処理、煮沸滅菌、除去、濃縮の工程を経て供給されている。酵素による魚肉の自己消化では、疎水性アミノ酸であるアルギニン、バリン、メチオニンなどが露出しやすいため、苦味を呈することが多い (Nishimura, 2001)。本研究で用いた全ての酵素は食品製造加工用に供されており、風味の劣化と苦味について官能性試験で確認した。カタクチイワシはヒスチジン含有量が多く、鮮度が落ちると組織中の酵素によるヒスタミン合成が進行し、ヒスタミン中毒の原因となることが危惧される (Taylor, 1986)。エキス 2 のヒスタミン含有量は 200 ppm を超えていたが、再調製したエキス 2 のヒスタミン含有量は 3.5 ppm から 12.8 ppm と低値となった。最初に調製したエキス 2 のヒスタミン含有量が高かった理由は操作手順によるものであって、酵素種によるものではないと考えられた。本章では、工程を適切に管理することで、ヒスタミン含有量を増加させることなく、カタクチイワシ魚肉を原材料とした低アレルギー化エキスを工業的に調製できることを示した。

本研究において調製したエキスに含まれるタンパク質の分子量分布は、1 kDa 以下であった (Fig. 10)。酵素の基質特異性にかかわらず、酵素消化によって得られたペプチドの分子量分布には差異は観察されなかった。FA の原因となるアレルギータンパク質の多くは、10 kDa 以上の分子量を有することから (Taylor *et al.*, 1987)、本章でのエキス調製方法により、十分な低分子量化が達成できたと考えられる。食品製造加工用酵素を用いて、工業的工程に基づき得られた評価用エキス試料は、低アレルギー化食品として、より多くの患者に提供できると期待される。

2-4-3. 酵素処理した評価用エキス試料の IgE 反応性低減化効果

本研究では、酵素 4 (アルカラゼ) と酵素 7 (フレーバーザイム) を組み合わせることで、PA とコラーゲンの両 IgE 反応性を低下させることができた (Fig. 11, 12)。多くのカビ由来酵素は、エンドペプチダーゼ活性とエキソペプチダーゼ活性の双方の性質を有している。酵素 1, 2, 7 は

これら両活性を有しているが、得られたペプチドは低アレルゲン化されていなかった。酵素 4-6 は、エキソペプチダーゼ活性がないので、低分子量ペプチドの生成が期待できない。このため、これらの酵素は酵素 7 (フレーバーザイム) とあわせて用いることでコラーゲンの IgE 反応性を低下させたと考えられた (Fig. 11)。PA が示す IgG 反応性および IgE 反応性は、調製した 7 種類の評価用エキス試料すべてで低下したことから、本研究で用いた酵素は PA を低分子量化するとともに、PA タンパク質のエピトープ部位に影響を与えることで、IgG あるいは IgE 抗体との反応性を低下させたと考えられた。

2-4-4. 酵素処理した評価用エキス試料の今後の検討課題

本検討で調製した評価用エキス試料では、酵素のプロテアーゼ活性により PA およびコラーゲン共に低アレルゲン化された。本検討で用いた酵素はいずれもその基質特異性は高いものではなく、患者血清の反応性は患者により異なっていた (Fig. 14)。システインプロテアーゼとして知られるパパインは、塩基性アミノ酸 (R, H, K) の C 末端側やロイシン (L) とのペプチド結合を優先的に切断する高い基質特異性が知られている (Kawashima, 2008)。基質特異性の高いプロテアーゼとしてパパインの他に、ブロメライン、デナプシンが知られている。今後、これらの基質特異性の高いプロテアーゼで同様の検討を行うことが必要である。得られたペプチド断片が T 細胞応答性を保持したまま B 細胞応答性を消失していることを示すことができれば、経口免疫寛容によるアナジーを誘導する低アレルゲン化食品として活用できるものと考えられる (Burks *et al.*, 2008; Scurlock *et al.*, 2010)。

2-5. 小括

本章では、プロテアーゼを用いた低アレルゲン化の有効性を示すために、カタクチイワシの魚肉を食品製造加工用の7種の酵素で処理し、得られた魚肉エキス中のPAおよびコラーゲンのIgE反応性を評価した。

PA およびコラーゲンの IgE 反応性の低減化効果は、酵素の種類に依存し、中でも *Bacillus licheniformis* 由来のアルカラーゼ（エンドペプチダーゼ活性）と *Aspergillus oryzae* 由来のフレーバーザイム（エキソペプチダーゼ活性）の組み合わせが、検討した酵素の中で最も大きく IgE 反応性を低下させることを示した。

ウマミザイム G、プロテアーゼ M「アマノ G」、フレーバーザイムはエンドペプチダーゼ活性とエキソペプチダーゼ活性を有しているが、得られたペプチドは低アレルゲン化されていなかった。一方、エキソペプチダーゼ活性がないアルカラーゼ、プロタメックス、ニュートラーゼは、フレーバーザイムとあわせて用いることでコラーゲンのアレルゲン性を低下させた。

これらの酵素を用いて、苦味やヒスタミン含有量を増加させることなく、カタクチイワシ魚肉を原材料とした低アレルゲン化エキスの調製が工業的に可能であることを示した。酵素消化により得られたペプチドの分子量分布は1 kDa 以下であり、酵素の基質特異性にかかわらず差異は見られなかった。

これらの結果から、IgE 反応性の低減化効果の程度は、酵素消化の結果得られたペプチドの分子量には依存せず、アレルゲンタンパク質の抗体認識部位、すなわちエピトープ部位を消化する酵素の基質特異性に依存することが示唆された。

第3章 水晒し・肉挽き・KCl水溶液による魚肉中のPAおよびコラーゲンの除去効果を活用した低アレルギー化かまぼこの調製

3-1. 序論

第2章では、食品製造加工用のプロテアーゼを用いることで、アレルギータンパク質の分解および変性により、低アレルギー化したエキスの調製が可能であることを示した。魚類アレルギーの原因となるアレルギータンパク質を除去することで、魚肉をより安全に食することができるようになる。そこで、第3章では水晒し、肉挽き、KCl水溶液によるアレルギータンパク質の除去の有用性を明らかにすることを目的として、魚肉を原材料とする水産加工品のIgE反応性の評価と、家庭や小規模な施設でも実践可能なスケトウダラすり身からの低アレルギー化食品の調製方法について検討を行なった。

ヒトに対する食品の機能は、第1に栄養素としての機能、第2に健康の維持・回復効果に及ぼす機能、第3に感覚器官・嗜好性に及ぼす機能から構成される。低アレルギー化食品が食品である以上、第3の機能を損なわないことが重要である。つまり、食事制限を強いられる患者が、食の楽しみを損なわれることがないように配慮することも栄養指導の上で重要となる。

畜肉に比べ、魚肉は死後の劣化が極めて早く、長期保存を可能にするため、数多くの水産加工品が開発されてきた (Nishimura, 2016)。魚肉に2-3%の食塩を加えて播潰 (らいかい) して得られる肉糊状のすり身を成形し、これを加熱凝固させて製造される弾力性のあるゲル化加工食品を「水産練り製品」という (Morioka & Shimizu, 1990; Amano *et al.*, 2004)。魚の大小を問わず、広範囲の魚を原材料とできること、自由に調味加工できること、自由に素材を配合できること、外観・テクスチャーが特徴的であること、そのまま食することができること、低脂肪・高たんぱく質食品であることから、水産練り製品の需要は高い (Kato, 2001)。

魚肉タンパク質は、塩溶性の筋原繊維タンパク質、水溶性の筋形質タンパク質、非水溶性の肉基質タンパク質に大別される (Suzuki, 2000; Yamazaki *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2004)。赤身魚のほうが白身魚よりも筋形質タンパク質が多いなど、魚種により若干の差異はあるものの、その割合はそれぞれ50-70%、20-50%、<10%とされている。最も割合が多い塩溶性の筋原繊維タンパク質の主成分は、ミオシン (50%)、アクチン (20%)、トロポニン、トロポミオシンである。水溶性の筋形質タンパク質は、筋原繊維タンパク質の隙間を埋めるように存在し、ATPを産生するための解糖系酵素 (70%) やリン酸化酵素、酸化還元酵素、ミオグロビン、PA、ゲル補強タンパク質を含んでいる。魚肉を生のみで食することができるのは、筋形質タンパク質としてこのような多くの酵素が含まれていることに由来する。不溶性の肉基質タンパク質は主にコラーゲンである。魚肉におけるコラーゲン含有量は、畜肉に比べて非常に少なく、魚肉のふわりとした食感につながる (Yamazaki *et al.*, 2003)。

魚肉を水晒しし、変性防止剤として砂糖などの糖類を加えて播潰した後に凍結した魚肉を「すり身」という (Amano *et al.*, 2004)。船上で調製されるものは「洋上すり身」、陸揚げの後、工場調製されるものは「陸上すり身」と区別されている。洋上すり身の原材料にはスケトウダラ魚肉が用いられている。一方、陸上すり身は、多種多様な魚種が原材料となっている。すり身は本来、筋原繊維タンパク質を長期保存するための水産加工品で、最初に水晒しの工程を経る。こ

のことから、水溶性の筋形質タンパク質である PA 含有量が減少し、すり身は低アレルギー化食品の原材料となる可能性がある。

一方、魚の皮や筋を取り除く目的で肉挽き処理が行われる。魚の皮や筋には、コラーゲンが多く含まれるが、魚肉からのコラーゲンの除去は、PA の除去と比較して容易ではない。アクチンとミオシンが結合した複合タンパク質であるアクトミオシン (Actmyosin, AM) は筋原繊維タンパク質の構成成分で、KCl 水溶液を用いることで、その画分を魚肉から抽出できる。かまぼこの特徴的なテクスチャーである弾力性は、AM により生じている。したがって、KCl 水溶液および CaCl₂ を用いて得られた AM 画分だけを加熱処理することで、低アレルギー化かまぼこが調製できる可能性がある。

現在の食品表示制度では、タンパク加水分解物、魚醬、魚醬パウダー、魚肉すり身、魚油、魚介エキスは、その原材料表記は単に「魚介類」とすることになっている。網で無分別に捕獲したものが、これらの原材料に用いられることが多いためである。魚類アレルギー患者にとって、原材料となる魚種を選定し、家庭でも調理加工する方法が確立できれば、食べることを指導する食物アレルギー診療の発展に寄与することができる。

第 3 章における研究の目的は、低アレルギー化効果が高く、制限食による制約を軽減することができる調理・加工方法を提案するために、水晒し、肉挽き、そして KCl 水溶液によるアレルギー除去効果を明らかにすることである。

そこで本研究では、まず製法の異なる市販のかまぼこ製品 8 種の IgE 反応性を ELISA 法により評価した。次に、水産練り製品の製造工程で行われている水晒しによる PA の除去効果と肉挽きによるコラーゲンの除去効果、そして、KCl 水溶液に対する AM とコラーゲンの溶解性の差を利用した両アレルギータンパク質の除去効果について検討した。最後に、市販のスケトウダラすり身を原材料とし、KCl 水溶液を用いて得られた AM 画分から、PA およびコラーゲンが除去された低アレルギー化かまぼこを調製する手法を検討し、水分量と弾力性を評価した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 試料

8種類の市販のかまぼこ製品を（蒸しかまぼこが4種、ゆでかまぼこが2種、揚げかまぼこが2種）を使用した。Table 5に各かまぼこの原材料として記載されていた魚種を記す。これらのかまぼこ製品には、人工着色料および添加物が含まれていたが、その詳細については検討しなかった。

Table 5. Raw fish ingredients in commercial *kamaboko*

Product	Raw fish ingredients				
	White croaker	Cod fish	Sardine	Horse mackerel	Other
Steamed-1	+	+	-	-	
Steamed-2	-	+	-	-	Goldenthread, misc.
Steamed-3	+	-	-	-	
Steamed-4	-	+	-	-	Misc.
Boiled-1	+	-	-	-	Misc.
Boiled-2	-	+	+	+	Mackerel, Atka mackerel
Fried-1	+	-	+	-	Tuna, misc.
Fried-2	-	-	-	+	Glowbelly, Red mullet, misc.

+, present; -, not present; misc., minor amounts of other fish products

ポジティブコントロールおよび原材料として使用した魚肉は、いずれも可食部を -20°C で凍結して保管したものをを用いた。シログチ (*Pennahia aegentata* Houttuyn) は東シナ海で漁獲されたものを株式会社鈴廣より入手した。スケトウダラ (*Gadus chalcogrammus* Pallas) は釧路沖で捕獲されたものを函館市内の水産会社より購入した。カタクチイワシ (*Engraulis japonica*) は神奈川県水産試験場より提供されたものをを用いた。

スケトウダラの冷凍すり身は、洋上すり身として最も等級の高い SA を函館市内の水産会社より購入した。

血清を用いた IgE 反応性の評価には、小児患者への負担を最小限にするためプール血清を用いた。PA のみにアレルギーを示す 3 名の患者のプール血清およびコラーゲンのみにアレルギーを示す 4 名の患者のプール血清として提供されたものをを用いた。

3-2-2. かまぼこ製品および原料魚肉の蛍光 ELISA 法による IgE 反応性の評価

患者血清を用いた ELISA 法により、かまぼこ製品および原料魚肉の IgE 反応性を評価した。購入したかまぼこ製品と原料魚の可食部を細切し、5 倍量の 10 mmol/L PB (pH 7.0) あるいは 0.5 mol/L 酢酸水溶液を加えて、1 分間ホモジネーションした。得られた溶液を遠心分離 ($3,000 \times g$, 4°C , 20 分間) し、上清を孔径 5 μm のフィルターでろ過した。得られた溶液を各々 PA 評価用試料

あるいはコラーゲン評価用試料とした。

コーティング液には炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を、ブロッキング液には 1% BSA を含む DPBS を、抗体希釈液には 0.1% BSA を含む DPBS を、洗浄液には 0.15 mol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mmol/L PB (pH 7.0) を用いた。1 次抗体には血清を、2 次抗体には HRP 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。

コーティング液を用いて 1,000 倍に希釈した PA 評価用試料あるいは 100 倍に希釈したコラーゲン評価用試料を 96 穴マイクロプレート (Maxisorp; Nalge Nunc International) の各ウェルに 50 μ L 添加し、インキュベーターを用いて 37°C にて 2 時間インキュベートした。その後、プレートウォッシャーを用い、上記の洗浄液にて 5 回洗浄した。続いて、各ウェルにブロッキング液を 350 μ L 添加し、4°C で終夜インキュベートした。洗浄後、血清を抗体希釈液で 500 倍に希釈した溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体を抗体希釈液で 2,500 倍に希釈した溶液を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、0.1 mg/mL 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を 50 μ L 添加し、37°C で 1 時間静置した。反応停止液である 50 mmol/L グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.3) を 50 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc) を用いて、励起波長 (Ex) 367 nm, 測定波長 (Em) 465 nm の蛍光強度を測定した。

3-2-3. 水晒し処理

購入したスケトウダラは、捕獲後 1 日洋上で氷により保管されていたものである。魚体から皮や頭部、内臓、骨を除去して得られた可食部を用いた。魚肉は細切し、20 倍量の蒸留水を加えて 1 分間ホモジネーションした。得られた溶液を 2,000 \times g, 4°C で 20 分間遠心分離にかけ、上清を除去した。この操作を 5 回繰り返した。

精製マダラ PA を用いて検量線を作成し、市販抗体を用いた ELISA 法により魚肉抽出液および水さらし溶液中の PA 含有量を定量した。

3-2-4. 肉挽き処理

市販の肉挽き機 (OMC-12; Ohmishi Co. Ltd., Gunma, Japan) を用いて魚肉を処理した。メッシュ径 9.6, 6.4, 3.2 および 1.9 mm のプレートを用いた。精製シロサケコラーゲンをを用いて、検量線を作成し、市販抗体を用いた ELISA 法により魚肉抽出液中のコラーゲン含有量を定量した。

3-2-5. 中性塩水溶液を用いた AM 画分の調製

水晒しと肉挽きの処理を終えた魚肉と洋上 SA すり身を計量し、10 倍量の 0.6 mol/L KCl (和光純薬 特級) 水溶液を加えてホモジネートした後、1 時間静置した。その後、遠心分離 (10,000 \times g, 4°C, 30 分間) で、塩溶性の高い AM が抽出された上清を回収した。その上清に対し、30 倍量の DIW を用いて 4°C で一晩、3.5 kDa の孔径の透析膜を用いて透析処理を行なった。透析後の溶液に、終濃度が 0.5% となるよう CaCl₂ (和光純薬 食品添加物用) を添加し、1 時間攪拌した。その後、遠心分離 (10,000 \times g, 4°C, 60 分間) により得られた沈殿物を AM 画分とした。

3-2-6. SDS-PAGE

SDS-PAGE は PhastSystem を用いて実施した。各試料は 4% SDS および 10% DTT を含む 125 mmol/L Tris 緩衝液 (pH 6.8) に溶解した。4°C で一晩静置した後、PhastGel Gradient 8-25 ゲルで泳動を行なった。標準物質として、非染色 SDS-PAGE スタンダードと広域分子量のタンパク質スタンダードを用い、電気泳動後のゲルは CBB R250 で染色した。

3-2-7. 水産練り製品の各製造工程における ELISA 法による IgG 反応性の評価

市販抗体を用いた ELISA 法により、各試料 (魚肉、冷凍すり身、水晒し後魚肉、肉挽き後魚肉、AM 画分) の IgG 反応性を評価した。PA 評価用試料とコラーゲン評価用試料は、5 倍量の 10 mmol/L PB (pH 7.0) あるいは 0.5 mol/L 酢酸水溶液を加えて、1 分間ホモジネーションした。得られた溶液を遠心分離 (3,000 × g, 4°C, 20 分間) し、上清を孔径 5 μm のフィルターでろ過し、得られた溶液を各々 PA 評価用試料あるいはコラーゲン評価用試料とした。

コーティング液には炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を、ブロッキング液には 1% BSA を含む DPBS を、抗体希釈液には 0.1% BSA を含む DPBS を、洗浄液には 0.15 mol/L NaCl および 0.05% Tween20 を含む 10 mmol/L PB (pH 7.0) を用いた。PA の評価における 1 次抗体には 4,000 倍に希釈したマウス抗カエル PA モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich Co.) を、2 次抗体には 2,000 倍に希釈した HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。コラーゲンの評価における 1 次抗体には 1,000 倍に希釈したウサギ抗サケコラーゲンポリクローナル抗体 (Novatec Immundiagnostica GmbH) を、2 次抗体には 4,000 倍に希釈した HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を用いた。

コーティング液を用いて 50-1,600 倍に希釈した PA 評価用試料、あるいは 100-500 倍に希釈したコラーゲン評価用試料を 96 穴マイクロプレート (H type; Sumitomo Bakelite) の各ウェルに 50 μL 添加し、4°C で終夜インキュベートした。その後、洗浄液で 3 回洗浄した。各ウェルにブロッキング液を 300 μL 添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。洗浄後、1 次抗体を 50 μL 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体を 50 μL 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、TMB (Pierce Biotechnology Inc.) を 50 μL 添加し、室温にて 5 分間静置した。反応停止液である 1 mol/L 硫酸を 100 μL 添加した。マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用い波長 450 nm で OD を測定した。

3-2-8. 蛍光 ELISA 法による水産練り製品の各製造工程における IgE 反応性の評価

前述の、3-2-2. かまぼこ製品および原料魚肉の蛍光 ELISA 法による IgE 反応性の評価と同様の方法で実施した。

3-2-9. すり身を原料とした低アレルギー化かまぼこの調理加工

3-2-5. 中性塩水溶液を用いた AM 画分の調製で述べた方法で、洋上すり身から調製した AM 画分に食塩 2-3% とポリリン酸ナトリウム 0.5% (和光純薬 食品添加物用) を添加した。水分量が 80-

82% になるように水道水を加え、この混合物を乳鉢で十分に練ってペースト状に成形した。家庭用調理器を用いて、40℃で30分間加熱した。次に90℃で40分間蒸しあげ、最後に4℃で冷却した。

3-2-10. ゲル強度および水分量の測定

調製したかまぼこを3 cm幅に切り、ゲル強度を直径5 mmの球形プランジャーを用いてレオメーター (NRM-2002J; Fudo Kogyo Co. Ltd., Japan) で測定した (Mochizuki & Matsumiya, 1991)。水分量は5 gのサンプルを用いて赤外線水分計により測定した。

3-2-11. 統計解析

ELISA測定はtriplicateで行い、結果の平均値とSDで記述した。サンプルによる差の検定にはone-way ANOVAを用い、Bonferroni法による多重検定を行った。患者血清と健常者血清とのIgE反応性の差の検定は、Studentのt検定を用いた。有意水準は0.05とした。

3-2-12. 倫理的配慮

本研究の実施にあたり、神奈川県衛生研究所にて以下の倫理審査を受けた。平成17年No. 5, 食物アレルギーの原因食物中に含まれるアレルゲンの検出と低アレルゲン化に関する検討 (平成17年10月1日～平成20年3月31日), 平成18年No. 5, 食物アレルギーの原因食物中に含まれるアレルゲンの検出と低アレルゲン化に関する検討: 水産食品の低アレルゲン化に関する研究およびアレルゲン性を指標とした食情報のデータベース化と食教育への活用に関する基盤研究 (平成18年9月1日～平成21年3月31日), 平成20年No. 3, 食物アレルゲンの解析とその応用に関する検討 (平成20年9月1日～平成23年3月31日)。

3-3. 結果

3-3-1. 市販かまぼこ製品の IgE 反応性の評価

低アレルゲン化かまぼこの調製を目的として、8種類の市販製品と3種類の原料魚の魚肉の検討を行った。これらの粗抽出液の IgE 反応性を、PA 反応性およびコラーゲン反応性患者のプール血清で評価した (Fig. 15)。

原料魚の魚肉の粗抽出液はポジティブコントロールであり、シログチ (1)、スケトウダラ (2) およびカタクチイワシ (3) の魚肉はいずれのプール血清に対しても強く反応した。市販かまぼこ8種の粗抽出液は、PA 反応性の患者血清を用いた場合、蒸しかまぼこ4種 (4-7) と茹でかまぼこ1種 (9) で、原料魚のそれよりも有意に IgE 反応性が低下した。しかし、揚げかまぼこ2種 (10, 11) では原料魚のそれと同様の値であった。コラーゲン反応性患者の血清を用いた場合にも、PA 反応性患者の血清で評価した場合と同様の結果であった。

イワシが原料に使われている茹で-1 (8) と揚げ-1 (10) では、IgE 反応性の低下が見られなかった。一方、タラを原料に使っている蒸し-2 (5) と蒸し-4 (7) では、IgE 反応性の低下が見られた。

3-3-2. 水晒し回数による PA 含有量の減少効果

水晒し回数による PA 含有量の減少効果を評価するため、マウス抗カエル PA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法により、魚肉抽出液および水晒し液中の PA 量を測定した (Fig. 16)。水晒しを行う前の魚肉中の PA 量は 5.4 mg/g であった。1回目の水晒し処理で、魚肉中の PA は 2.1 mg/g に減少し、水晒し液中に溶出した PA 量は 3.2 mg/g であった。1回目の低減化効果は 61.1%減少であった。その後、水晒しの繰り返しにより、魚肉中の PA は 0.7, 0.3, 0.2 mg/g と順次減少し、5回目の水晒し後は 50 µg/g となった。水晒し液中に溶出した PA 量は 1.5, 0.4, 0.08 mg/g であった。

3-3-3. 肉挽きによるコラーゲン含有量の減少効果

肉挽き機を用いて魚肉から筋をとる肉挽きの処理による、コラーゲン含有量の減少効果を評価するため、ウサギ抗サケコラーゲンポリクローナル抗体を用いた ELISA 法により、魚肉抽出液中のコラーゲン量を測定した。

肉挽き後のプレート上には多くの筋が残った。魚肉中に存在する筋は、コラーゲンなどの結合繊維で構成されていることから、可視的にコラーゲンの除去効果が確認できた。この筋の除去効果は、用いるプレートのメッシュ径を小さくすることにより向上した。肉挽き前の魚肉中のコラーゲン量は 89.7 µg/g であった。9.6 mm のメッシュ径のプレートで処理した魚肉では 19.6 µg/g に減少していた。9.6 mm のメッシュ径のプレートを用いた肉挽き処理の低減化効果は 78.1%減少であった。同様に、6.4 mm のものでは 17.0 µg/g, 3.2 mm のものでは 14.4 µg/g, 1.9 mm のものでは 10.5 µg/g となった。

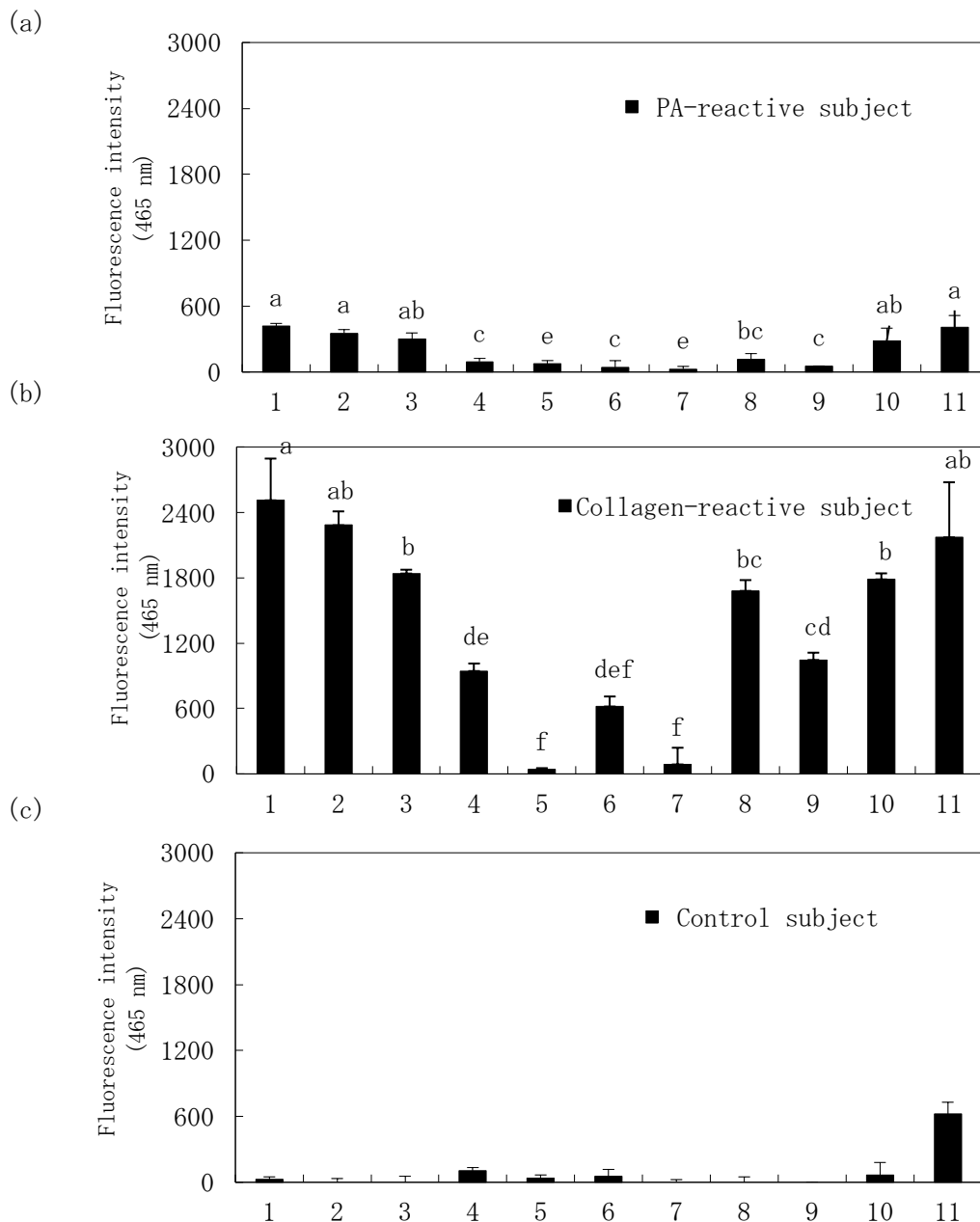


Figure 15. IgE reactivity of commercial kamaboko products and fresh fish meat using fluorescent ELISA at wavelengths of 367 nm (Ex) and 465 nm (Em). (a) Serum samples of four patients reactive to parvalbumin (PA) , (b) Serum samples of three patients reactive to collagen, and (c) Serum samples of non-allergic subject. (a to c) 1, fresh white croaker; 2, fresh Alaskan pollack; 3, fresh Japanese anchovy; 4, steamed-1; 5, steamed-2; 6, steamed-3; 7, steamed-4; 8, boiled-1; 9, boiled-2; 10, fried-1; 11, fried-2. Abbreviations for commercial kamabokos products indicate preparative performed on the raw fish paste (surimi) : steamed-1-4, boiled-1, 2, and fried-1, 2. (a and b) Bars with different letters are significantly different from each other by Bonferroni test ($p < 0.0009$, $n=11$).

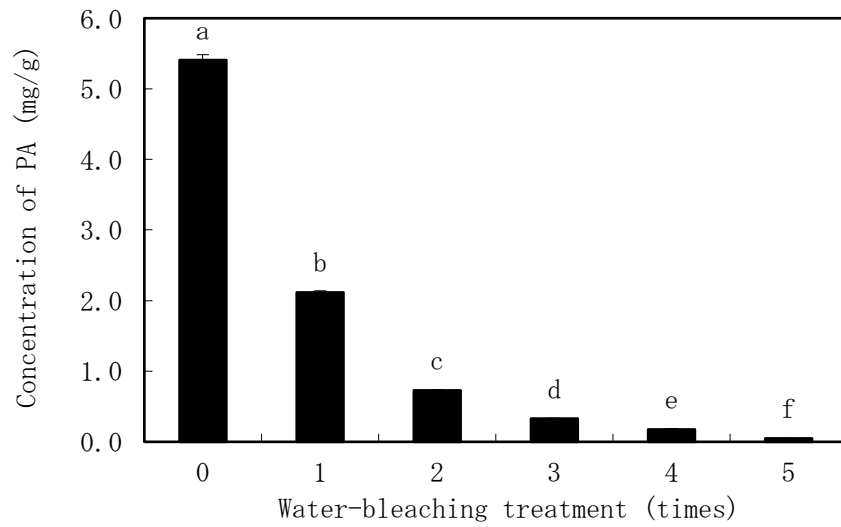


Figure 16. Effect of successive water-bleaching treatments (up to five times) on the reduction of PA antigenicity.

Concentration of PA in fish meat of Alaskan pollack, prepared according to “water-bleaching and grinding processes” section and subjected to successive water-bleaching treatments (0-5 time(s)) was quantified by measuring the optical density at 450 nm for ELISA reactions and comparing against a standard curve of IgG reactivity for PA. Bars with different letters are significantly different from each other by Bonferroni’s test ($p < 0.0033$, $n=5$).

3-3-4. 溶解性の差を利用したコラーゲンの除去効果

肉挽き後の魚肉中に残存するコラーゲンを 0.6 mol/L KCl 水溶液で除去する効果について検討した (Fig. 17).

スケトウダラ魚肉の酢酸抽出液 (Lane 1) のタンパク質バンドとして, 6.6-14.4 kDa に 1 本, 21.5 kDa に 3 本, 31.5-45.0 kDa に 2 本, 116-200 kDa に 1 本, 200 kDa 以上のもの 1 本を確認した. PA に相当する分子量の領域にある 6.6-14.4 kDa のバンドは, 水晒し処理後 (Lane 2) に消失した. コラーゲンに相当する分子量の領域にある 116 kDa 以上の領域に見られた 2 本のバンドは, 水晒しでは変化しなかったが, 0.6 mol/L KCl 抽出画分 (AM 画分, Lane 3) では低分子量化した.

筋に存在したコラーゲンは肉挽き処理で除去されていると考えられるため, AM 画分に見られるバンドは, 魚肉中のコラーゲンのものと推定される. 21.5-45.0 kDa のミオシン軽鎖と推定される 3 本のバンドと, 40 kDa 付近に見られるアクチンと推定されるバンドは, KCl 抽出操作で濃縮された AM 由来のバンドと推定した.

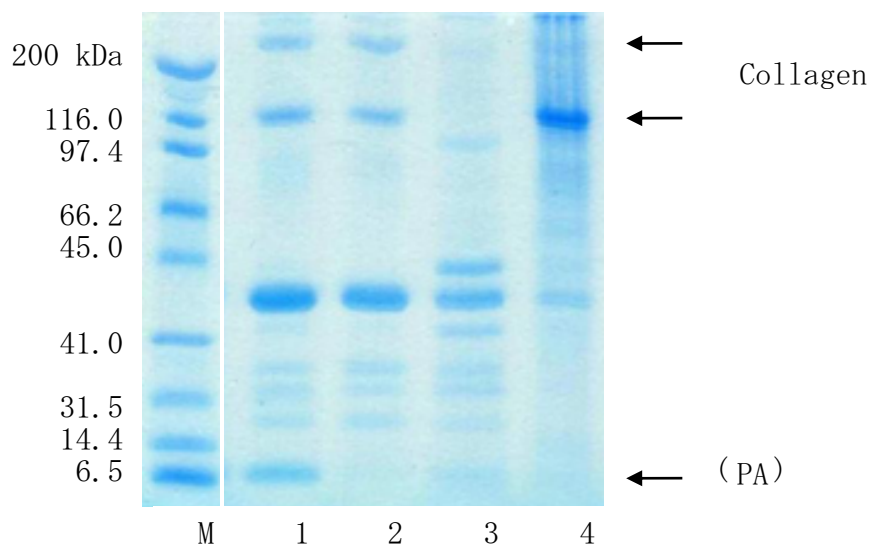


Figure 17. SDS-PAGE analysis of fish meat extracts. Lane M, molecular weight markers (from bottom to top: 6.5, 14.4, 21.5, 31.0, 45.0, 66.2, 97.4, 116 and 200 kDa); lane 1, raw Alaskan pollack; lane 2, after water-bleaching; lane 3, actomyosin fraction; lane 4, purified collagen.

3-3-5. 各工程における低アレルギー化効果

前述の各プロセスで得られた試料の IgG 反応性を、マウス抗カエル PA モノクローナル抗体およびウサギ抗サケコラーゲンポリクローナル抗体を用いて評価した (Fig. 18).

原料のスケトウダラ魚肉 PA に対する反応性を示す OD は、水晒し後は有意に減少した。肉挽き後も小さいながら OD の有意な減少がみられた。AM 画分では、PA に対する IgG 反応性が消失した。AM 画分調製の時の透析と塩析の操作により、PA が除去されたと考えられる。

原料のスケトウダラ魚肉コラーゲンに対する反応性を示す OD は、水晒し後および肉挽き後に小さいながら有意に減少した。しかし、AM 画分ではコラーゲンに対する IgG 反応性が大きく上昇した。

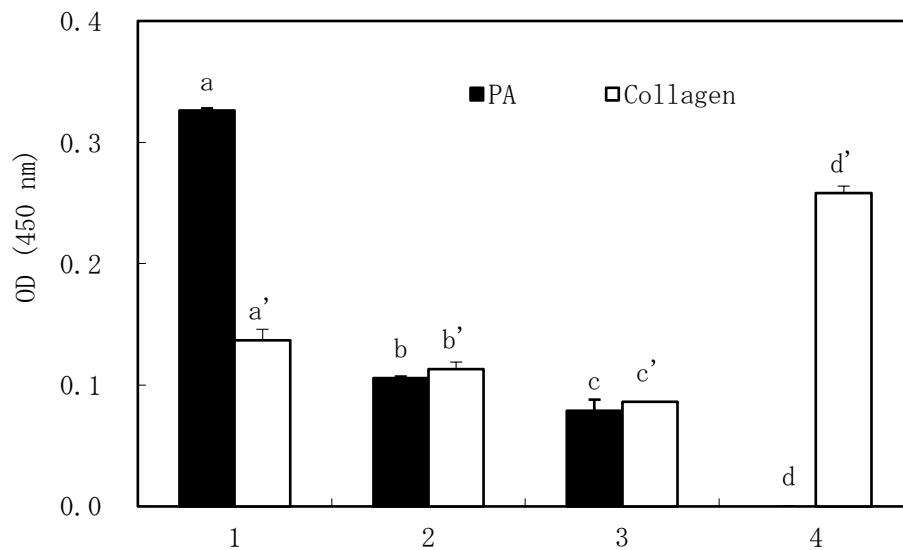
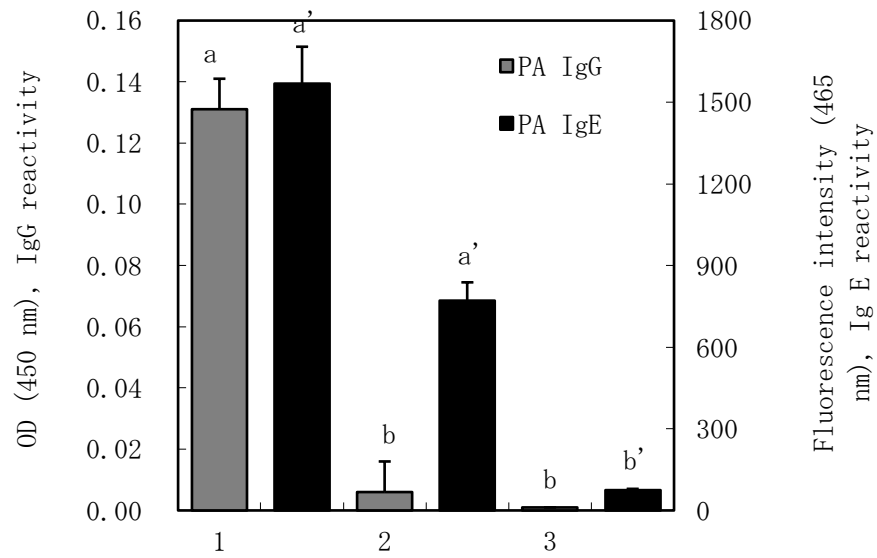


Figure 18. ELISA analysis of allergen PA (solid bars) and collagen (open bars) levels with each preparation process. 1, raw Alaskan pollack; 2, after water-bleaching; 3, after grinding; 4, actomyosin fraction.

IgG reactivity for PA and collagen in the fish meat, prepared according to the procedure summarized in section of development of a novel method to remove allergens, was quantified by determining the OD (450 nm) following ELISA. Bars with different letters (nonprime and prime for PA and collagen, respectively) are significantly different from each other by Bonferroni test ($p < 0.0083$, $n=4$).

(a)



(b)

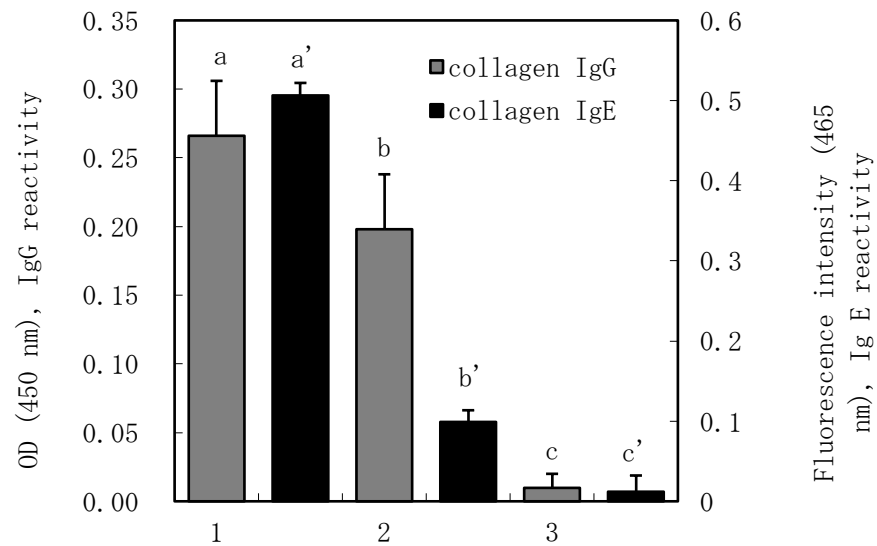


Figure 19. ELISA analysis of antigenicity and allergenicity of the actomyosin (AM) fraction prepared from frozen *surimi*. The AM fraction indicates the fish meat fraction abundant in AM but not parvalbumin (PA) or collagen. (a)PA detection, (b)collagen detection. (a and b) Lane 1, Alaskan pollack fish meat; Lane 2, frozen surimi; Lane 3, AM fraction. Bars with different letters are significantly different from each other by Bonferroni test ($p < 0.0167$, $n=3$)

3-3-6. 市販の冷凍すり身を原料とした低アレルギー化かまぼこの調製

スケトウダラ魚肉を原料とするかまぼこ製造の工程は複数あり、温度によるコラーゲン変性が起きる可能性がある。魚類コラーゲンでは、変性によるアレルギー性の増加が報告されている (Hamada & Shiomi, 2001)。そこで、市販されている SA 等級の洋上すり身から調製した AM 画分について、AM 画分のコラーゲンの低減化効果を IgG 反応性と IgE 反応性により評価した。同時に、PA の低減化効果についても同様に評価した (Fig. 19)。

冷凍すり身の IgG/IgE 反応性は、スケトウダラ魚肉と比較して、PA とコラーゲンのいずれにおいても低下した。冷凍すり身の PA に対する IgG 反応性は有意に減少していた (Fig. 19a)。冷凍すり身の IgE 反応性は減少したものの、IgG 反応性よりも減少の度合いが小さかった。その一方で、冷凍すり身のコラーゲンでは、IgE 反応性が有意に低下し、IgG 反応性の低下の度合いよりも大きかった。冷凍すり身から得られた AM 画分は、コラーゲンの IgG/IgE 反応性が共に有意に減少した (Fig. 19b)。これらの結果から、魚肉から得られた AM 画分と異なり、低アレルギー化の工程においてコラーゲンの変性が抑制されていると考えられた。

冷凍すり身に残存していた PA の IgE 反応性も、AM 画分では有意に減少した (Fig. 19a)。

3-3-7. すり身 AM 画分から調製したかまぼこの物性評価

スケトウダラの洋上すり身から調製したかまぼこ、AM 画分を用いて調製した低アレルギー化かまぼこのゲル強度と含水量の評価を行なった。

洋上すり身から調製したかまぼこのゲル強度は 445 g/cm^2 で、AM 画分から調製したかまぼこのゲル強度は 245 g/cm^2 であった。洋上すり身を用いて調製したかまぼこの含水量は 73.2% で、AM 画分から調製したかまぼこの含水量は 77.8% であった。洋上すり身そのものの含水量は 74.0 から 77.0% を示しており、加工中の含水量は変化していなかった。

3-4. 考察

3-4-1. 水産練り製品の IgE 反応性

市販されているかまぼこは、採肉、水晒し、肉挽き、播潰、調味、成形、加熱、冷却の工程を経て製造されている。なお、蒸しかまぼこ、茹でかまぼこ、揚げかまぼこという製品分類は、主に加熱調理の方法によるものである。

濱田らは、かまぼこ、ちくわ、はんぺん（茹でかまぼこ）、さつま揚げ（揚げかまぼこ）、つみれ、魚肉ソーセージの6種類の水産練り製品の IgE 反応性を調査し、PA 反応性の患者血清では、つみれ抽出液のみに反応があったのに対し、コラーゲン反応性の患者血清では、全ての水産練り製品抽出液で反応が見られたことを報告した (Hamada *et al.*, 2000)。つまり、コラーゲンの除去方法を改良することが、市販されている水産練り製品あるいは低アレルゲン化かまぼこのアレルゲン性を低下させるために重要であることを示した。

本章での検討の結果、蒸しかまぼこ製品すべてで PA 反応性の患者血清の反応が弱く (Fig. 15a)、かつ、コラーゲン反応性の患者血清の反応が弱い製品があることから (Fig. 15b)、蒸しかまぼこが PA とコラーゲンを除去した低アレルゲン化かまぼこを調製するのに最も適した製法であることがわかった。イワシを原料とした製品は、いずれの患者血清にも反応を示した。カタクチイワシあるいはイワシの IgE 反応性は、シログチやスケトウダラと比較すると、加熱調理での除去が難しいと考えられる。タラはかまぼこ製品の原材料としては一般的であることから、本研究における低アレルゲン化かまぼこの素材としてスケトウダラを選定した。

3-4-2. 水産練り製品の各製造工程における IgG/IgE 反応性の低減化効果

PA は水への溶解度が高く、水晒しの繰り返しにより他の構成タンパク質に影響を及ぼすことなく除去することができる。本章での検討の結果、20 倍量の水を用いた PA の除去効果は 1 回目で 61% 減少、2 回目で 66% 減少であった (Fig. 16)。水晒し処理を 5 回繰り返すことで魚肉中の PA 含有量を検出限界以下に低下させることができることを示した。水産練り製品を含め、水産加工品の製造過程には水晒し工程が含まれるものが多い。したがって、製造過程に水晒し工程を含む水産加工品は、PA の含有量を低下させた低アレルゲン化食品とみなすことができる。これらの水産加工品は簡便に入手できることから OFC や経口免疫療法への応用が期待できる。

魚肉中のコラーゲンの約 90% が筋線維の形で存在する。水産練り製品の製造工程で行われる肉挽き処理は、筋や皮を除去する目的で行われる。肉挽き機を用いた方法では、魚肉中のコラーゲンの IgG 反応性を低下させることができなかった (Fig. 18)。そのため、PA 除去のための水晒し工程と比較すると、肉挽きを用いる方法は、低アレルゲン化の有効な手法であるとは言い難い。本実験で得られた肉挽き後のコラーゲン含有量は 10.5 $\mu\text{g/g}$ と微量であった。その一方で、コラーゲンへの IgG 反応性が検出された (Fig. 18)。市販の水産練り製品の多くがコラーゲン反応性の患者血清と反応すると報告した濱田らの検討結果を考慮すると、魚肉中のコラーゲンのアレルゲン性が、PA のそれと比較して高い可能性がある (Hamada *et al.*, 2000)。

肉挽き処理では、魚肉中のコラーゲンの十分な除去が難しく、そのために AM 画分の利用を新規手法として検討した。かまぼこの特徴的なテクスチャーである弾力性は、KCl や NaCl などの中性

塩を含む水溶液に溶解性が高い AM により生じる。そこで、AM を主成分とした魚肉抽出物からかまぼこを調製することができれば、低アレルギー化食品として応用できる。

AM は中性塩水溶液への溶解度が高く、AM 画分の調製では、KCl 水溶液を用いた抽出、透析および CaCl₂ 水溶液を用いた塩析処理を行なった。主に 30 倍量の DIW を用いた透析操作の結果、肉挽き後には残存していた PA の IgG 反応性が消失した (Fig. 18)。一方、AM 画分におけるコラーゲンは、IgG 反応性が増加 (Fig. 18) していた。コラーゲンは、非水溶性の肉基質タンパク質として魚肉中に含有されている。そのため、KCl 溶液への抽出を行なった時点で不溶性残渣として除去できる。しかし、中性塩溶液に溶解する性質を有するコラーゲンが、結合筋組織に少量であるものが見出されている (Shiomi *et al.*, 2010)。したがって、この方法であっても、中性塩溶液に溶解する性質を有するコラーゲンが AM 画分に溶出する可能性がある。さらに、コラーゲンタンパク質の変性の可能性も IgG 反応性の増加から示唆された。SDS-PAGE での結果から、コラーゲンが低分子量化されていることもわかった (Fig. 17)。魚類のコラーゲンの変性温度は、哺乳類のそれよりも低く、鮮度に依存して非加熱抽出溶液中であっても変性が生じる。約 75% の患者血清で変性コラーゲンが IgE 反応性を示すことが報告されている (Hamada & Shiomi, 2001)。スケトウダラは比較的低温の海域に生息しており、そのコラーゲン変性温度も低いと考えられる。温度によるコラーゲン変性が要因となり、AM 画分に抽出されるコラーゲンの量あるいは IgG 反応性を増加させた可能性がある。

これらの結果から、AM 画分を用いた低アレルギー化は有効であるものの、スケトウダラ魚肉を原料に用いて低アレルギー化かまぼこを調製する場合には、コラーゲンの変性による IgE 反応性の増加が懸念される。そこで、魚肉の代わりに、洋上で処理されている SA 等級の洋上すり身を用いて AM 画分を調製することとした。

3-4-3. PA およびコラーゲンが除去された低アレルギー化かまぼこの開発

本研究では、20 倍量の水を用いた 1 回の水晒しによる PA の低減化効果は約 60% 減少であった。原料の魚肉中の PA 含有量が同程度であると仮定し、IgG 反応性に関わる OD を元に PA 低減化効果を算出すると、かまぼこ調製に用いた冷凍すり身では 92.3% 減少となった (Fig. 18)。一方、肉挽きによるコラーゲンの低減化効果は、魚肉では 78.1% 減少であるのに対し、冷凍すり身では 23.1% 減少に止まった (Fig. 18)。

一方、冷凍すり身から抽出した AM 画分は、コラーゲンの除去に大きく貢献し、その IgG 反応性を低下させた (Fig. 19b)。冷凍すり身は、PA に対して IgG 反応性が低いにも関わらず、やや高い IgE 反応性が見られた。PA のエピトープ部位は、タンパク質分子の表面上にあるため、微量でも強い IgE 反応性を示すと考えられる。しかし、その冷凍すり身から調製した AM 画分ではその IgE 反応性は大きく低下した (Fig. 19a)。

以上の結果から、冷凍すり身をかまぼこ原料に使用することで、魚肉を原料とした場合と比較して、PA とコラーゲンの両者の含有量が低いかまぼこを調製することができた。AM 画分を原料として調製したかまぼこの含水量は、魚肉を原料としたそれと同様のものではあった。その一方で、かまぼこの弾力性の指標となるゲル強度は、AM 画分から調製したかまぼこでやや弱かった。低品

質の材料を用いた際に、かまぼこの弾力が劣ることがある。こうした場合に、弾力を生み出す増強剤として広く使用されているのはデンプンである。デンプンは弾力を生み出すとともに保水効果も高く、より良い食感を生み出すことができる (Amano *et al.*, 2004)。

なお、本章では、Fig. 15, 18, 19 に示す ELISA 測定で、低アレルギー化効果の評価について、PA およびコラーゲン含有量の低減化効果は OD の減少により、IgE 反応性の低減化効果は蛍光強度の減少により結論づけた。その証明には、前者は精製 PA を用いた定量を、後者はアミノ酸配列解析などを実施する必要がある。特に、食品重量あたりのアレルギー含有量の測定は、OFC や経口免疫療法に安全にかつ効果的に適用するために不可欠であることから、今後の検討が望まれる。

3-5. 小括

本章では、低アレルギー化効果が高く、制限食による制約を軽減することができる調理・加工方法を提案するために、魚肉を原料とした水産練り製品の IgE 反応性の評価と、スケトウダラすり身からの低アレルギー化かまぼこの調製について検討した。

アレルギー性を低下させるためには、アレルギーの除去が最も安全な方法である。水産練り製品をはじめ、水産加工品の多くは水晒し工程を含むため、水産加工品は PA の含有量が低下している低アレルギー化食品であると考えられる。水晒し、肉挽き、および KCl 水溶液による AM 画分の抽出法は、魚肉からアレルギータンパク質を効果的に除去する方法として有用であることを明らかにした。さらには、本検討で調製された低アレルギー化かまぼこによる OFC の実施を可能にした。

魚食が成人病の予防効果があることが認知され、世界では水産練り製品の生産量は増加する傾向にある (kato, 2001)。市販されている 8 種類の水産練り製品のうち、蒸しかまぼこ製品は 4 種すべてで PA 反応性が低く、特に、タラを原材料に用いたものはコラーゲン反応性も低かった。そこで、低アレルギー化かまぼこの素材に、かまぼこ製品の原材料として汎用されているスケトウダラを選定した。

スケトウダラ魚肉中の PA 含有量は水晒しにより、5.4 mg/g から 2.1 mg/g に減少し、20 倍量の水を用いた 1 回の水晒しによる PA の低減化効果は 61.1%減少であった。さらに、繰り返しの水晒しにより、5 回目の水晒し後には PA 含有量は 50 μ g/g となった。PA は水への溶解度が高く、水晒し処理を繰り返すことで魚肉中の PA 含有量を検出限界以下に低下させることができることを明らかにした。

肉挽き機を用いた方法では、魚肉中のコラーゲンの IgG 反応性を十分に低減化することができなかった。PA 除去のための水晒し工程と比較すると、本法はコラーゲン除去を目的とした低アレルギー化の有効な手法であるとは言い難い。一方、KCl 水溶液に溶解性が高い AM 画分を抽出し、CaCl₂ により得られた AM 画分では、高いコラーゲンの除去効果が期待されたものの、同時にコラーゲンの変性による IgE 反応性の増加が懸念された。そこで、洋上で処理される SA 等級の洋上すり身を、魚肉の代わりに用いて AM 画分を調製することとした。洋上すり身を用いて調製された AM 画分は PA に対する IgG 反応性がほぼ消失し、コラーゲンの IgG 反応性も大きく低下することを示した。この AM 画分は、かまぼこの主要な特徴であるゲル化形状を形成することができることも同時に示した。

これらの結果から、魚類アレルギーを危惧する消費者に対して、水晒し、肉挽き、および KCl 水溶液による AM 画分の抽出法は、魚肉からアレルギータンパク質を効果的に除去する方法として有益であること、かつ、目的に応じて魚種を選び、家庭や小規模の実験設備で低アレルギー化食品を調製するための新たな手法となりうることを明らかにした。

4章 食物アレルギー歴の聞き取りで想定される患者発話に関する意識・実態調査

4-1. 序論

第1章では魚種によるPAのIgG反応性の違いを明らかにし、第2章ではプロテアーゼ活性を有する食品製造加工用酵素を用いて調製された低アレルゲン化魚肉エキスについて検討を行なった。第3章では、低アレルゲン化かまぼこを家庭や実験室で調製する方法を検討した。これまでの検討の結果は、除去食により制約が大きくなりがちな魚類アレルギー患者やその家族の負担を軽減できると期待される。しかし、これらの方法において、完全なアレルゲン性の消失は達成できていない。魚類アレルギーは耐性が得られにくく (Ikematsu *et al.*, 2006)、極少量のアレルゲンがアレルギー症状を誘発するリスクがある。そのため、IgG反応性が低い魚種の情報を、専門医でない者が鵜呑みにして、魚類アレルギー患者に奨めることは避けるべきである。患者にとって、正確な診断とそれを元に慎重にOFCを実施することが極めて重要である。そこで、第4章では、正確な診断のために必要不可欠な、FAに関する正しい情報の普及を目的として、非医療関係者を対象としたFAに関する意識調査を行なった。

FAの確定診断および症状誘発リスクの評価はOFCにより行われる。OFCは、原因食品と疑われる食品を一定の時間間隔で分割摂取させ、症状の出現を観察する試験である。通常、目標とする総負荷量を漸増法で3-6回に分割し、15-30分毎に患者に摂取させる。そのため、OFCには常にアナフィラキシー誘発の危険が伴う。魚類アレルギー患者の場合、抗体価の高さとOFC陽性率の関係を示す精度の高いプロバビリティカーブが得られていないため、現状では、そのリスクを十分に避けることが困難である (Koyama *et al.*, 2006; Schulkes *et al.*, 2014)。

正確な診断は、その時点までに確認している症状の改善と、予期せぬアレルゲンの摂取の回避のためにも必要不可欠である。感作があっても摂取による誘発症状がない食品の除去は本来不要である。IgE依存性反応の原因アレルゲンの同定のために行われる検査には、血中抗原特異的IgE抗体検査、プリックテスト、好塩基球ヒスタミン遊離試験などがある。特に、保険適応が認められている血中抗原特異的IgE検査が広く実施されている。しかし、血中抗原特異的IgE抗体検査やプリックテストの結果のみで容易に診断できるとの誤解も広がっており、正確な診断を妨げる要因となっている。つまり、これらの検査の結果は感作の事実を示唆しているに過ぎず、丁寧な問診やOFCを経て行われる確度の高い診断への理解と協力が必要となる。患者やその保護者が使用する「FAと診断された」という表現は、多くの場合、血中抗原特異的IgE検査の結果を言及しているにすぎず、正しい表現ではない。

魚類によるアレルギー症状は必ずしも魚肉タンパク質が原因となるわけではない。成人では魚肉に寄生するアニサキスによるものや、魚類の餌となるオキアミなどの甲殻類によるものも多い。食物不耐症とされている青魚によるヒスタミン中毒は、アレルギー様症状が起きる点において魚肉アレルギーと類似しており、正確な診断を難しくする要因となっている。診断には、魚類アレルギーの原因が魚肉タンパク質によるものであるかの十分な検討が必要であるが、魚類アレルギー患者だけでなく医療関係者も含めてこうした理解が十分であるとはいえないままに、問診や聞き取りが行われてしまうことがある。

薬剤師は、患者のアレルギー素因について調剤の際に聞き取りを行い、学校薬剤師として、アレルギー疾患を有する児童等への学校現場での対応も支援してきた。2015年に成立したアレルギー疾患対策基本法のもと、国、地方公共団体、医療保険者、国民、医師その他の医療関係者及び学校等の設置者又は管理者は、アレルギー疾患を有する患者がその予防と症状の軽減のための知識を得て、等しくアレルギー疾患医療を受けることができるようにサポートしていく責務を負っている。

患者や周囲の人間の不正確な知識や発言は、正確な診断と正しい栄養指導の妨げになる。非医療関係者が「アレルギー」という言葉から想起する事柄は多岐にわたる。情報学では、人が五感で受け止められるものをデータと呼び、データは知識により抽象化されて情報となると定義される (Hartley, 1928; Ono, 2005a-c)。情報は常に正しくその内容を伝えるものであることが望ましい。しかし、多くの場合、データの受け手が持つ知識に応じて、情報は変化することとなる。医療関係者が日常的に使用するアレルギー症状に関する言葉や、アレルゲンに対する説明は、非医療関係者である患者にとっては一次的にはデータである。これらのデータを、情報として正しく伝えていくためには、データの受け手である患者の知識がどのようなものであるかを理解することが重要となる。

第4章における研究の目的は、正確な診断のために必要不可欠な、FAに関する正しい情報を普及するために、非医療関係者が有するFAに関する知識の特徴を明らかにすることである。低アレルゲン化された食品が開発され、低アレルゲン性が認められる魚種が明らかになっても、実際にそれらを食した時のリスクを最小限に抑えるためには、正しい知識と理解が必要となる。

そこで本研究では、インターネットモニターによるWebアンケートとインターネット上で公開されている質問投稿サイトのデータを用いた解析を行った。まず、Webアンケートを実施し、FA症状、アレルゲン、調理加工による低アレルゲン化効果についての認知の状況と、FA症状に関する発話の言語量と情報の充足率を評価した。さらに、質問投稿サイトのデータから、言語学的手法を用いて、FA患者と接している人々が必要としている情報を検討した。

4-2. 調査方法

4-2-1. Web アンケートの実施と基本回答者群の作成

インターネットモニターに登録している 20-70 歳の男女 36,167 名を対象にスクリーニング調査を行った後、4つの基本回答者群毎に目標回答数を 50 として本調査を実施した。スクリーニング調査は 2010 年 5 月 30 日から 6 月 1 日に、本調査は 2010 年 6 月 2 日から 6 月 4 日に実施した。

過去あるいは現在のいずれかの時点で FA 症状を経験したことがある人を FA+ とした。本人の FA+ の有無で 2 群にわけ、さらに同居家族の FA+ の有無で 2 群にわけ、最終的に 4 群に分けたものを、基本回答者群 (Group I~IV) とした。

4-2-2. FA の症状およびアレルゲンを含む食品に関する認知率の検討

Web アンケートで得られた回答を集計し、回答者総数に対する選択者の割合を認知率として算出した。

FA の症状についての認知率は、「一般的な食物アレルギーの症状としてあなたが思いつくものを 5 つ自由に書いてください」との設問に対する自由記述の回答から算出した。自由記述の内容は、目視により分類し、言葉のゆらぎを吸収した。

アレルゲンを含む食品についての認知率は、「食物アレルギーを起こす可能性があるとは知らなかった食物がありますか。あると思う方は該当する食物を全てお教えてください」との設問に対する複数選択式の回答を食品ごとに集計した。選択肢は、調査当時、アレルギー物質を含む食品に関する表示の対象になっていた原材料 25 品目にチーズを加えた 26 品目に、FA に関する研究が積極的に展開されていた 10 品目 (米、ごま、まぐろ、マンゴ、パイナップル、さくらんぼ、梨、にんじん、きゅうり、じゃがいも) を加えた 36 品目とした。実際の調査では、回答を容易にするために「全て知っている」を加えた 37 選択肢を用いた。

基本回答者群ごとの認知率を食品毎に算出すると同時に、表示義務系 8 品目 (卵、牛乳、乳製品 (チーズ)、小麦、そば、ピーナッツ、えび、かに)、表示推奨系 18 品目 (大豆、さば、やまいも、くるみ、いか、いくら、鶏肉、牛肉、あわび、豚肉、さけ、ゼラチン、キウイ、モモ、松茸、バナナ、オレンジ、りんご)、研究系 10 品目、家畜系 7 品目、水産系 8 品目、果物系 9 品目、野菜系 5 品目、穀物系 7 品目ごとに、認知率の平均値を算出した。

調理・加工による低アレルゲン化効果の認知率は、「調理加工によりアレルギー症状がでないことがあります。卵のほかに同じような例を知っていますか」との設問に対する択一選択式の回答を、基本回答者群ごとに集計した。選択肢は「A) 全く知らなかった」、「B) 卵の例しか知らなかった」、「C) 卵の例は知らないが他の例は知っていた」、「D) 卵以外の例も知っていた」の 4 つとした。

4-2-3. 自発的発話の言語量の検討

Web アンケートで得られた自由記述の回答では、Excel 関数を用いて言語量の解析を行なった。

「原因となった食品や症状、原因と思われる食物を食してからアレルギーが出るまでの経緯、

その後の治療や対応、その頻度や時間経過なども書いてください。(回答は具体的に)あなたあるいは15歳未満の同居家族の食物アレルギーについて、できるだけ詳しく教えてください。」との設問に対する自由記述の回答を解析に用いた。Group Iでは、「あなた」と「15歳未満の同居家族」の回答、Group IIでは「あなた」のみ、Group IIIでは「15歳未満の同居家族」のみを解析に用いた。

4-2-4. 情報充足率の検討

自発的発話の中に、診断に必要な十分な情報が含まれているかを確認するため、情報充足率を検討した。4-2-3. 自発的発話の言語量の検討 で用いた記述回答文を目視にて確認し、該当する内容が記載されている記述回答文の件数を、回答者総数で除したものを情報充足率とした。

情報充足率を検討するための情報カテゴリを選定するために、Yahoo!知恵袋を、検索式「食品 AND アレルギー」として2010年3月1日に検索して得られた質問投稿文42件を用いた。情報カテゴリは、①原因食物、②症状、③経過、④治療、⑤食品の調理加工状態、⑥検査結果、⑦アレルギー歴とした。

4-2-5. 再質問による回答の不一致の検討

「食物アレルギーはありますか」との設問に、「FAの経験はない」を選択した回答者に対し、いくつかの具体例を提示した再質問を行い、「FAの経験あり」と変更される可能性があると思われる回答者数を、回答者総数で除したものを算出した。

「食物アレルギーがないと回答した人にお聞きします。何か特定のものを食べると下痢をする、だるくなる、口の中がかゆくなるなど、確信はできないものの食物に対するアレルギーがあるかもしれないと不安になったことがありますか」と質問し、「不安になったことがある」を選択した回答者に対し、食物アレルギーではないと判断した理由を複数選択式で質問した。選択肢は「ただの食あたりだと思った」、「体調不良だと思った」、「毎回体調が悪くなるわけではない」、「症状が軽度だった」、「原因食物となるとは思わなかった」、「アレルギー体質ではない」、「家族に食物アレルギーの人はいない」、「アレルギー検査の結果は陰性だった」、「その他」の9項目とした。

4-2-6. 言語解析ソフトウェアを用いたFA情報に関する要望分析

Webアンケートの自由記述文による手本を用い、出現単語とその頻度から分類用スコアを算出するナイーブベイズモデル(ベイズ学習法)を利用した大量サンプルの自動分類を行った(Hachiken *et al.*, 2012; Higuchi, 2016, 2017)。

1. 要望カテゴリの作成

①診断: 病院, 専門医, 検査について, ②種類: 原因になる食物の種類と症状について, ③啓発: 啓発活動について, ④機序: 原因因子について, ⑤表示: 食品表示法について, ⑥治療: 治療法について, ⑦対処: 対処方法について, ⑧回避: リスク回避についての8項目を本検討における要望カテゴリとした。

2. 手本の作成

自動分類に用いる手本を作成するため、「食物アレルギーについて不足していると感じている情報がありますか？あなたが、食物アレルギーについてもっと知りたいと思っている事などを具体的に教えてください」との設問に対する 150 件の自由回答文を用いた。回答を目視で確認し、主題となる要望カテゴリをそれぞれの回答に与えた。複数の要望カテゴリを含むと思われるものは、主題となる分類を優先した。

3. 手本を用いた分類の学習

KH Corder (ver. 2 beta22) のベイズ学習による分類モジュールを用いて、ベイズ学習を試みた。自由回答文に与えられた要望カテゴリを外部変数として与えたものを学習見本とし、ランダムにその分類データを欠損させたものを学習用データとした。

- 1) ベイズ学習モジュールの「外部変数から学習」メニューを用いて、89 件の自由回答文の分類を学習させて、「学習結果ファイル 1」を得た。この時、交差妥当化を 10 回繰り返し、その妥当性を評価した。
- 2) ベイズ学習モジュールの「学習結果を用いた自動分類」メニューを用いて、残りの 61 件の自由回答文に対して「学習結果ファイル 1」による自動分類を行った。
- 3) 不正解だった回答文に正解を与えながら、再学習を繰り返して「学習結果ファイル 3」を作成した。これを用いて最終的に 150 件の回答文に対して、自動分類を行った。正解率が 80% を超えたところで、再学習を終了とした。

4. 大量データの取得と自動分類

Yahoo!知恵袋への質問投稿記事の中から、「食物アレルギー」を含む質問文を 900 件抽出した。検索は 2010 年 11 月 8 日に行った。KH Corder (ver. 2 beta22) を用いて、得られた質問投稿文から、4,753 文、114,633 語を抽出した。そのうちの 5,660 語を用いて、前述のベイズ学習結果を利用して、要望カテゴリへの自動分類を行い、要望カテゴリごとの質問文の件数の全体に対する割合を算出した。

4-2-7. 倫理的配慮

実施当時は、無記名アンケート等の研究は倫理審査委員会への付議を要しないという規定のため、倫理審査は受けていない。ただし、倫理的配慮の一環として、Web アンケートでは、研究目的で行われる調査であること、研究目的、回答者が特定できない匿名式で実施することを明記し、回答をもって同意とみなすオプトアウトを実施した。Yahoo!知恵袋にも同様に、研究機関へのデータの提供について、個人を特定できない情報に処理したうえで、投稿に関する情報を研究機関に提供する旨が明記されていることを確認した。

4-3. 結果

4-3-1. Web アンケートの回答者属性

プロトコールに基づき集められた基本回答者群の回答者属性を Table 6 に示す。解析対象者は 287 名、そのうち男性回答者は 115 名 (40.1%)、平均年齢±SD は 41.8 ± 11.2 歳であった。本人が FA+ である回答者は 127 名 (44.3%) であった。同居家族のうち FA+ の小児がいる回答者は 49 名 (17.1%)、小児以上の年齢 (以後、大人とする) の FA+ がいる回答者は 107 名 (37.3%) であった。Group II は、男性回答者の割合が低く、かつ、高齢者の割合も低かった。

Table 6. Characteristics of respondents for four groups by sex, age, and family members

	All respondents	Group I	Group II	Group III	Group IV
Total	287 (100.0%)	61 (21.3%)	66 (23.0%)	83 (28.9%)	77 (26.8%)
Sex					
male	115 (40.1%)	22 (36.1%)	16 (24.2%)	39 (47.0%)	38 (49.4%)
female	172 (59.9%)	39 (63.9%)	50 (75.8%)	44 (53.0%)	39 (50.6%)
Age					
mean age \pm SD	41.8 \pm 11.2	41.6 \pm 11.9	38.8 \pm 10.7	43.7 \pm 10.3	42.6 \pm 11.5
>=20, <30	41 (14.3%)	11 (18.0%)	12 (18.2%)	7 (8.4%)	11 (14.3%)
>=30, <40	86 (30.0%)	16 (26.2%)	24 (36.4%)	24 (28.9%)	22 (28.6%)
>=40, <50	90 (31.4%)	17 (27.9%)	22 (33.3%)	29 (34.9%)	22 (28.6%)
>=50, <60	51 (17.8%)	13 (21.3%)	6 (9.1%)	16 (19.3%)	16 (20.8%)
>=60, <70	19 (6.6%)	4 (6.6%)	2 (3.0%)	7 (8.4%)	6 (7.8%)
Respondents					
FA+	127 (44.3%)	61 (100.0%)	66 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
FA-	160 (55.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	83 (100.0%)	77 (100.0%)
Family members under 15 years old living with the respondent					
FA+	49 (17.1%)	15 (24.6%)	0 (0.0%)	34 (41.0%)	0 (0.0%)
FA-	60 (20.9%)	5 (8.2%)	20 (30.3%)	11 (13.3%)	24 (31.2%)
not exist	178 (62.0%)	41 (67.2%)	46 (69.7%)	38 (45.8%)	53 (68.8%)
Family members over 15 years old living with the respondent					
FA+	107 (37.3%)	51 (83.6%)	0 (0.0%)	56 (67.5%)	0 (0.0%)
FA-	140 (48.8%)	7 (11.5%)	46 (69.7%)	21 (25.3%)	66 (85.7%)
not exist	40 (13.9%)	3 (4.9%)	20 (30.3%)	6 (7.2%)	11 (14.3%)

4-3-2. FA 症状の認知率

代表的な FA 症状を思いつくままに 5 つ記述した回答を集計した結果、951 の回答があった。そのうち、481 はアレルギーの原因となる食物、植物、動物の名前を述べたものであったため、解析から除外した。原因だけを回答した人は 123 名 (42.9%)、一つも回答しなかった回答者は 11 名 (3.8%) であった。原因だけを回答した人の割合は、回答者本人と同居家族に FA+ がいる Group I だけが 34.4% と低く、Group II では 43.9%、Group III では 45.8%、Group IV では 45.5% であった。

解析対象 470 件を分類した結果を Table 7 に示す。FA 症状として、湿疹、痒み、蕁麻疹、呼吸困難、嘔吐、腫れ (炎症)、発熱、下痢、意識障害 (ショック)、不快感、しびれ、痛み、咳が回答に上がった。湿疹や痒み、蕁麻疹、呼吸困難、嘔吐をあげた人が多く、比較的軽症のものから重症のものまで認知されていた。もっとも多かった湿疹は全体の 30.3% が回答した。

Table 7. Typical FA symptoms found in descriptive responses

Symptom	n	Sympyom	n
rash	87 (30.3%)	diarrhea	32 (11.1%)
itch	61 (21.3%)	consciousness muddle	19 (6.6%)
hives	60 (20.9%)	discomfort	12 (4.2%)
difficulty breathing	55 (19.2%)	numbness	10 (3.5%)
vomiting	45 (15.7%)	pain	9 (3.1%)
swelling	37 (12.9%)	cough	9 (3.1%)
fever	32 (11.1%)	miscellaneous	2 (0.7%)

4-3-3. アレルゲンを含む食品に関する認知率

調査実施当時、アレルギー物質を含む食品に関する表示の対象になっていた原材料 26 品目に 10 品目加えた 36 品目の認知率について調査した結果、「全て知っている」と回答した人は全体の 7.3% であった。Table 8 に回答者全員の認知率が高い順に結果を示す。

Table 8. Comprehension of representative 36 allergens evaluated by multiple choice

No.	Food	Respondant (n)		Comprehension rate				Food labeling			Animal		Plant			
		Unknown	Known	Total	Group I	Group II	Group III	Group IV	Duty	Optional	Nothing	Livestock	Seafood	Grain	Vegetable	Fruit
	Average	86	201	0.700	0.819	0.705	0.585	0.589	0.939	0.686	0.536	0.831	0.816	0.881	0.521	0.457
1	egg	10	277	0.97	0.98	0.97	0.94	0.95	○			○				
2	soba	10	277	0.97	1.00	0.97	0.95	0.92	○			○		○		
3	milk	12	275	0.96	0.98	0.97	0.92	0.94	○			○		○		
4	cheese	14	273	0.95	0.98	0.95	0.92	0.92	○			○		○		
5	wheat	16	271	0.94	0.98	0.98	0.89	0.89	○			○		○		
6	soy	20	267	0.93	0.97	0.98	0.91	0.83				○		○		
7	crab	22	265	0.92	0.97	0.92	0.92	0.85	○				○			
8	peanut	26	261	0.91	0.98	0.92	0.86	0.83	○			○		○		
9	shrimp	28	259	0.90	0.94	0.92	0.91	0.80	○				○			
10	mackerel	33	254	0.89	0.95	0.88	0.85	0.82					○			
11	yamaimo	38	249	0.87	0.94	0.89	0.85	0.74				○				○
12	walnut	43	244	0.85	0.98	0.85	0.73	0.79				○		○		
13	squid	45	242	0.84	0.95	0.79	0.83	0.74					○			
14	salmon roe	57	230	0.80	0.91	0.77	0.74	0.71					○			

(continued on next page)

No.	Food	Respondant (n)		Comprehension rate					Food labeling			Animal		Plant		
		Unknown	Known	Total	Group I	Group II	Group III	Group IV	Duty	Optional	Nothing	Livestock	Seafood	Grain	Vegetable	Fruit
	Average	86	201	0.700	0.819	0.705	0.585	0.589	0.939	0.686	0.536	0.831	0.816	0.881	0.521	0.457
15	sesami	62	225	0.78	0.88	0.82	0.67	0.70			○	○		○		
16	chiken	62	225	0.78	0.92	0.80	0.67	0.67		○		○				
17	rice	64	223	0.78	0.91	0.83	0.65	0.64			○	○		○		
18	beef	64	223	0.78	0.89	0.80	0.67	0.67		○		○				
19	abalone	66	221	0.77	0.91	0.71	0.65	0.73		○			○			
20	pork	67	220	0.77	0.89	0.80	0.62	0.67		○		○				
21	tuna	80	207	0.72	0.86	0.67	0.61	0.65			○		○			
22	salmon	92	195	0.68	0.77	0.68	0.50	0.65		○			○			
23	gelatin	111	176	0.61	0.77	0.58	0.50	0.47		○		○				
24	pineapple	126	161	0.56	0.80	0.56	0.39	0.33			○		○			○
25	mango	133	154	0.54	0.77	0.56	0.29	0.36			○					○
26	kiwi	135	152	0.53	0.73	0.53	0.39	0.30		○		○				○
27	peach	144	143	0.50	0.70	0.52	0.32	0.29		○		○				○
28	<i>matsutake</i>	144	143	0.50	0.68	0.47	0.35	0.32		○		○			○	
29	banana	158	129	0.45	0.68	0.45	0.26	0.21		○		○				○

(continued on next page)

	Respondant (n)		Comprehension rate				Food labeling		Animal		Plant				
	Unknown	Known	Total	Group I	Group II	Group III	Group IV	Duty	Optional	Nothing	Livestock	Seafood	Grain	Vegetable	Fruit
Average	86	201	0.700	0.819	0.705	0.585	0.589	0.939	0.686	0.536	0.831	0.816	0.881	0.521	0.457
No. Food															
30	158	129	0.45	0.55	0.38	0.32	0.36			○	○		○		
31	167	120	0.42	0.58	0.44	0.21	0.24	○			○				○
32	172	115	0.40	0.58	0.32	0.17	0.33			○	○		○		
33	176	111	0.39	0.48	0.33	0.15	0.36			○	○		○		
34	177	110	0.38	0.50	0.42	0.23	0.17			○	○				○
35	180	107	0.37	0.56	0.47	0.11	0.14	○			○				○
36	184	103	0.36	0.50	0.42	0.11	0.18			○	○				○

表示義務がある「卵」、「そば」、「乳製品」、「えび」、「かに」、「ピーナッツ」が認知率の高い品目の上位を占めた。これらの平均認知率は 93.9% であったのに対し、表示が推奨される品目の平均認知率は 68.6% であった。さらに、それ以外の研究段階にある食品の平均認知率は 53.6% であり、アトピー性皮膚炎などの皮膚炎に使用される紫雲膏の原材料である「ごま」の認知率が 78.4% ともっとも高く、「米」の 77.7%、「まぐろ」の 72.1% が続いた。

魚類の認知率は「さば」の 88.5% がもっとも高く、「まぐろ」72.1%、「さけ」67.9% の順であった。家畜系原材料の平均認知率が、83.1% であるのに対し、水産系原材料のそれは 81.6% であった。穀物系の原材料の認知率が 88.1% であるのに対し、野菜系の原材料は 52.1%、果物系原材料は 45.7% であった。

水産系原材料の認知率は、基本回答者群の中では、回答者本人と同居家族に FA+ がいる Group I で高くなる傾向が見られた。全体の認知率が低い食品は、回答者本人が FA+ である Group I と II の認知率に比べて、回答者本人が FA- である III 群と IV 群で認知率が低くなる傾向が見られた。

調理加工によりアレルギー性が低下することを全く知らないと回答した人は、全体の 45.3% であった (Table 9 選択肢 A)。一方、鶏卵を調理加工することでアレルギー性が低下することを知っている と回答した人は 48.5% 存在した (選択肢 B と D)。鶏卵ではないが、調理加工することでアレルギー性が低下することを知っている回答者は 6.3% 存在した (選択肢 C)。FA+ がいない Group IV は、調理加工によりアレルギー性が低下することを全く知らない と回答した人の割合が最も高かった (選択肢 A, 62.3%)。本人のみが FA+ である Group II では、「卵以外であれば知っている」人の割合が (選択肢 C, 12.1%)、同居家族のみに FA+ がいる Group III では「卵の場合のみ知っている」人の割合が最も高かった (選択肢 B, 45.8%)。

Table 9. Comprehension of hypoallergenicity with cooking of eggs for four groups

	Group I		Group II		Group III		Group IV	
	Respondent		FA+		FA-		FA-	
	Family		FA+		FA-		FA-	
n	287	61	66	83	77			
A (%)	45.3	36.1	43.9	37.3	62.3			
B (%)	30.7	24.6	25.8	45.8	23.4			
C (%)	6.3	3.3	12.1	4.8	5.2			
D (%)	17.8	36.1	18.2	12.0	9.1			

A, I didn't know it at all; B, I knew only about egg; C, I didn't know about the egg but about other foods; D, I knew about both the egg and other foods.

4-3-4. 自発的な発話の言語量

Group I および II に属する 127 名が回答した，自身の FA 経験に関する自発的な発話の言語量を性別および年代で比較した結果を Table 10a に示す．男性の発話の平均±SD は 53±37 語であるのに対し，女性は 82±63 語であった．中央値も男性 51 語，女性 72 語となり，男性の方が言語量が少なく，ばらつきも小さかった．年代別に見ると，20 代では 52 語，30 代で 73 語，40 代では 60 語，50 代で 77 語，60 代で 86 語であり，年代とともに言語量は増加する傾向にあった．

Table 10b には，Group I および III に属する回答者のうち，FA+ である小児家族と同居している 49 名の回答者が行った，FA+ である小児家族の FA 経験に関する発話の言語量を同様に比較した結果を示した．男性の中央値が 33 語，女性が 74 語であり，男性のほうが言語量は少なかった．年代別に見ると，20 代では 37 語，30 代で 55 語，40 代では 67 語，50 代で 29 語，60 代で 17 語であり，子育て世代である 30 代から 40 代に比べ，50 代から 60 代の言語量が少なかった．

次に，基本回答群での比較を行った結果 (Table 10c)，自身の FA 経験に関する発話では，Group I の発話は 71±57 語に対し，Group II は 76±59 語であった．中央値は Group I で 59 語，Group II で 63 語となり，Group I のほうが言語量は少なかった．FA+ である小児家族の FA 経験に関する発話では，Group I の発話は 62±52 語に対し，Group III は 103±115 語であった．最頻値は Group I で 52 語，Group III で 58 語となり，Group I の方が言語量は少なかった．

Table 10. Quantity of language for FA symptoms in descriptive responses

(a) FA symptoms happened to respondents themselves

	Total	Male	Female	Age >=20, <30	Age >=30, <40	Age >=40, <50	Age >=50, <60	Age >=60, <70
n	127	38	89	23	40	39	19	5
Mean	74	53	82	71	76	67	79	94
SD	85	37	63	163	56	60	56	44
Median	62	51	72	52	73	60	77	86
Max	303	151	303	303	225	270	201	158
Min	1	1	2	5	2	1	14	33

(b) FA symptoms happened to respondents' family members (under 15 years old)

	Total	Male	Female	Age >=20, <30	Age >=30, <40	Age >=40, <50	Age >=50, <60	Age >=60, <70
n	49	21	28	4	23	17	3	2
Mean	91	50	121	55	113	88	27	17
SD	101	49	119	50	124	680	25	20
Median	54	33	74	37	55	67	29	17
Max	536	188	536	128	536	278	50	31
Min	1	1	3	20	12	1	1	3

(c) Comparison of quantity of language for FA symptoms between groups

Group	FA+ respondents		FA+ children	
	I	II	I	III
n	61	66	15	34
Mean	71	76	62	103
SD	57	59	52	115
Median	59	63	52	58
Max	303	270	188	536
Min	1	2	1	1

4-3-5. 自発的発話における情報充足率

前述の、自発的な発話の言語量を算出するために用いた自由記述回答を用いて、それぞれの回答における情報の内在、すなわち7つの情報カテゴリに対する情報の有無を目視により検討した。

自身のFA経験に関する発話において、7つの情報カテゴリの内容を全て含んでいた回答者は存在しなかった。6つの情報カテゴリの内容を含んでいた回答者は13名(10.2%)で、検査やアレルギー歴の記載がないものが多かった。FA+の小児家族のFA経験に関する発話では、7つの情報カテゴリの内容を全て含んでいた回答者は7名(14.3%)、6つの情報カテゴリの内容を含んでいた回答者も7名(14.3%)であった。

Table 11に、7つの情報カテゴリに対する情報充足率を基本回答群ごとに検討した結果を示す。自身のFA経験に関する発話における原因食物の情報充足率はGroup Iでは98.4%、Group IIでは92.4%であった。FA+の小児家族のFA経験に関する発話では、Group Iでは93.3%であったが、Group IIIでは88.2%であった。原因食物と症状の情報充足率は非常に高く、一方で、時間を追って説明する必要がある経過や治療についての情報充足率は、いずれの群においても低かった。調理加工状態、検査結果、アレルギー歴の情報充足率は、FA+の小児家族のFA経験に関する発話のほうが高くなっていた。自身のFA経験に関する発話では、Group Iと比較してGroup IIでは、経過の情報充足率が8.9ポイント、検査の情報充足率が7.6ポイント高かった。一方、FA+の小児家族のFA経験に関する発話では、原因食物、症状、アレルギー歴以外の情報充足率はGroup IとGroup IIIの間で10ポイント以上の違いが見られた。

Table 11. Sufficiency rate for seven attributes related to FA occurrence in descriptive responses

Group	FA+ respondents (%)			FA+ children (%)		
	I	II	Δ	I	III	Δ
n	61	66	(point)	15	34	(point)
Causative food	98.4	92.4	6.0	93.3	88.2	5.1
Symptom	88.5	86.4	2.1	80.0	79.4	0.6
Progress	62.3	71.2	8.9	60.0	73.5	13.5
Treatment	60.7	62.1	1.4	40.0	64.7	24.7
Cooking condition	21.3	25.8	4.5	33.3	44.1	10.8
Laboratory test	0.0	7.6	7.6	40.0	23.5	16.5
Other allergies	3.3	4.5	1.2	13.3	8.8	4.3

4-3-6. FA症状に関する聞き方を変えた時の自由記述回答

Closed questionにより「FAの経験はない」とした回答者に対し、closed question と Open question を組み合わせて再質問することで、「FAの既往あり」と変更される可能性がある」と疑わ

れた回答数の割合について検討した。

自身のFA経験については、「FAの経験はない」とした77名の回答者のうち、11名(14.3%)が、「FAかもしれないと不安になったことがある」と回答した。FA-の小児家族のFA経験については、24名の回答者のうち、2名(8.3%)が、FA-の成人家族のFA経験については、66名の回答者のうち、5名(7.6%)が、「FAかもしれないと不安になったことがある」と回答した。最初に、FAではないと判断した理由のうち、「症状が軽度だったから」を選択した回答者がもっとも多く、18名の回答者のうち11名(61.1%)を占めた。次に多かったのは「毎回体調が悪くなるわけではない」を選択した7名(38.9%)であった。「体調不良が原因だと思った」「アレルギー体質ではない」を選択した回答者はそれぞれ2名(11.1%)であった。「それが原因になるとは思わなかった」「家族に食物アレルギーの人はいない」「ただの食あたりだと思った」を選択した回答者はそれぞれ1名(5.6%)であった。

4-3-7. FA 関連情報に対する要望分析

89件の自由回答文を用いた学習により自動分類した結果、1回目の学習における正解率は52.8%であり、学習を繰り返して得られた学習結果1のファイルの最終的な正解率は95.6%であった。1回目の学習における交差妥当化の結果をTable 12に示す。プログラムにより提示されたKappa統計量は0.447であった。交差妥当化の結果、正解率をもっとも高かったのは表示カテゴリの87.5%であった。なお、対処カテゴリは正解することができなかった。

Table 12. Cross-validation between original classification and classification with Bayse learning model in the first learning

		Classification with Bayse learning model								Total
		<i>Shindan</i>	<i>Syurui</i>	<i>Taisyo</i>	<i>Keihatsu</i>	<i>Kaihi</i>	<i>Hyouji</i>	<i>Chiryō</i>	<i>Kijyo</i>	
Original classification	<i>Shindan</i>	9	0	0	2	1	0	3	0	15
	<i>Syurui</i>	1	8	0	0	0	2	0	0	11
	<i>Taisyo</i>	0	1	0	0	2	2	2	0	7
	<i>Keihatsu</i>	5	1	0	3	1	1	0	0	11
	<i>Kaihi</i>	1	0	0	2	6	0	0	0	9
	<i>Hyouji</i>	1	0	0	1	0	14	0	0	16
	<i>Chiryō</i>	5	0	0	0	2	0	6	0	13
	<i>Kijyo</i>	1	1	0	3	0	0	1	1	7
	Total	23	11	0	11	12	19	12	1	89

Correct ratio, 47/89 (52.8%); Kappa value, 0.447.

61件の自由回答文を、学習結果1のファイルを用いて自動分類した。1回目の正解率は44.3%であった。最終的に学習ファイル3を用いて得られた正解率は92.7%となった。最終の学習結果の概要をFig. 20に、回答の根拠となった得点分布の例をTable 13に示す。

Table 13. Typical seven words appeared in each eight categories and their scores in the final learning result (in Japanese)

Classification	<i>Shindan</i>	<i>Syurui</i>	<i>Taisyō</i>	<i>Keihatsu</i>	<i>Kaihi</i>	<i>Hyoujū</i>	<i>Chiryō</i>	<i>Kijyō</i>
Word	検査	さまざま	対処	知識	調理	表示	薬	なぜ
<i>Hinshi</i>	サ変名詞	形容動詞	サ変名詞	名詞	サ変名詞	サ変名詞	名詞	副詞
Score	2.83	1.51	2.16	1.95	1.81	2.60	1.51	1.91
病院	食材	緊急	学校	変わる	食品	治療	遺伝	
名詞	名詞	形容動詞	名詞	動詞	名詞	サ変名詞	サ変名詞	
2.07	1.51	1.24	1.61	1.52	2.77	2.49	1.68	
気軽	違う	処置	世代	予防	外食	改善	年齢	
形容動詞	動詞	サ変名詞	名詞	サ変名詞	サ変名詞	サ変名詞	名詞	
1.51	1.51	1.24	1.39	1.52	2.00	1.51	1.40	
行く	良い	応急	ピーナツ	現状	徹底	治る	コーヒー	
動詞	形容詞	名詞	名詞	名詞	サ変名詞	動詞	名詞	
1.51	1.51	1.24	1.39	1.12	1.81	1.51	1.40	
調べる	期間	万が一	もっと	欲しい	書く	確立	摂取	
動詞	名詞	名詞	副詞	形容詞	動詞	サ変名詞	サ変名詞	
1.92	1.10	1.24	2.08	1.12	1.5	1.11	1.40	
できる	種類	対応	祖父	工夫	原材料	すごい	ストレス	
動詞	名詞	サ変名詞	名詞	サ変名詞	名詞	形容詞	名詞	
2.20	1.10	1.65	1.10	1.12	1.59	1.11	1.40	
窓口	割合	実際	死ぬ	受胎	加工	いつ	反応	
名詞	名詞	副詞	動詞	サ変名詞	サ変名詞	副詞	名詞	
1.22	1.10	1.24	1.10	1.12	1.59	1.11	1.40	

質問ケース 71 は、「病院」という語が出現するので、診断カテゴリに 2.07 が加算され、「祖父」「世代」という語により啓発カテゴリに 1.10 と 1.39 が加算された。最終的に啓発カテゴリのスコアは 74.90 となり、他のカテゴリのスコアよりも高くなったことから、質問ケース 71 は啓発カテゴリに分類された。

【Case 6】 食物名と具体的な症状が一覧などになっていると分かりやすい。

<i>Shindan</i>	<i>Syurui</i>	<i>Taisyō</i>	<i>Keihatsu</i>	<i>Kaihi</i>	<i>Hyouji</i>	<i>Chiryō</i>	<i>Kijyo</i>
13.04	18.14 *	8.27	12.48	10.49	9.76	9.61	10.49

【Case 37】 原因よりも根本的な治療法が確立されればよい。その為の研究活動などを知る機会があればよい。

<i>Shindan</i>	<i>Syurui</i>	<i>Taisyō</i>	<i>Keihatsu</i>	<i>Kaihi</i>	<i>Hyouji</i>	<i>Chiryō</i>	<i>Kijyo</i>
18.20	14.70	12.79	15.73	13.87	14.41	22.20 *	14.41

【Case 71】 最近の母親は雑誌や病院などからの情報で、アレルギーについてのある程度の知識があるが、祖父祖母世代はどんどん食べれば治ると信じているようで、とてもたちが悪い。祖父祖母世代に、アレルギーは数をこなせば治るものではないということを教えたい。また、野菜のアレルギーの有無、妊娠中に胎児にアレルギーが出るからといっさい乳製品などをとらない人もいるので、正しいアレルギーの情報を周知させたい。

<i>Shindan</i>	<i>Syurui</i>	<i>Taisyō</i>	<i>Keihatsu</i>	<i>Kaihi</i>	<i>Hyouji</i>	<i>Chiryō</i>	<i>Kijyo</i>
44.99	46.01	37.58	74.90 *	47.34	42.04	40.48	44.37

Figure 20. Distribution of scores with automatic classification of typical three cases (in Japanese). Asterisk represents the highest score to determine the final classification.

Yahoo!知恵袋から抽出した 900 件の質問文を、得られたモデルにより分類した結果を Table 14 に示す。FA に関する質問文では、病院や専門医、検査についてなどの診断 (48.8%) に関するニーズが最も大きく、啓発 (31.9%)、原因因子などの機序 (13.8%) が続いた。一方、FA に限定せず、アレルギーで検索した質問文では、診断 (54.3%)、啓発 (27.3%)、原因因子などの機序 (7.8%) となった。

Table 14. Result of automatic classification of 900 contributions including discription of “allergy” and those including FA obtained by application of the learning files

	Allergy	Food allergy	Δ (<i>point</i>)
	n (%)	n (%)	
<i>Shindan</i>	489 (54.3)	439 (48.8)	-5.5
<i>Syurui</i>	30 (3.3)	16 (1.8)	-1.5
<i>Taisyō</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
<i>Keihatsu</i>	246 (27.3)	287 (31.9)	4.6
<i>Kaihi</i>	2 (0.2)	4 (0.4)	0.2
<i>Hyouji</i>	47 (5.2)	27 (3.0)	-2.2
<i>Chiryō</i>	16 (1.8)	3 (0.3)	-1.5
<i>Kijyō</i>	70 (7.8)	124 (13.8)	6.0
Total	900 (100.0)	900 (100.0)	0.0

4-4. 考察

4-4-1. FA の情報に関する認知率

FA に関する情報の中で患者をはじめとする非医療関係者にとって一般的な情報は、表示義務がある食品（アレルゲン）の名称や皮膚症状，アナフィラキシーに関する情報である。

本研究では、調査対象者に FA の症状として思いつくものを 5 つまで回答させることで、その認知率について検討した。湿疹やかゆみ，蕁麻疹といった皮膚症状の認知率が高く，呼吸困難や意識障害といったアナフィラキシー症状がこれに続いた。一方，嘔吐，下痢といった消化器症状は多くは挙がらなかった。比較的軽症のものから重症のものまで広く認知されていたが，有効回答者数が 57.1% であったことを考慮すると，その認知率は高いものではなかった。

症状とは異なり，食品に関する認知率は高かった。表示義務がある 6 品目の平均認知率は 93.9% であり，いずれの基本回答者群においても大きな差は見られなかった。表示が推奨される 20 品目の平均認知率は 68.6% であった。魚類の認知率はさばが 88.5% で最も高く，まぐろが 72.1%，さけが 67.9% の順であった。魚類の中で表示推奨品目となっているのは，さばとさけのみで，これらは比較的よく認知されているといえる。しかし，卵や牛乳，肉などの家畜系に比べると，水産系の食品の認知率は低かった。さらに，植物性タンパク質は，動物性タンパク質と比べると，その認知率は低かった。植物によるアレルギーといえば花粉症，FA の原因となるタンパク質といえば肉（家畜）という固定観念が影響していると推察された。実際には，花粉症も花粉に含まれるタンパク質がアレルゲンとなって生じている。

調理加工による低アレルゲン化について，全く知らないと回答した人が全体の 45.3% 存在した。さらに，調理加工による低アレルゲン化の事例として認知されているのは，ほぼ鶏卵のみであることがわかった。FA+ がいない Group IV は，調理加工によりアレルゲン性が低下することを全く知らないと回答した人の割合が 62.3% と最も高かった。本人のみが FA+ である Group II では，「卵以外であれば知っている」人の割合が，同居家族のみに FA+ がいる Group III では「卵の場合のみ知っている」人の割合が最も高かった。鶏卵アレルギーは小児で起こりやすく，Group III は FA+ の小児家族がいる人が，基本回答者群の中で最も多かった。調理加工による低アレルゲン化の事例は，家族の中に FA+ の人がいなければ，知ることの少ない情報であると考えられる。また，Group II では自身の経験でその他の食品での事例を知り得たと考えられる。

4-4-2. FA の知識が患者発話に与える影響

問診は正確な診断を行う上で必要不可欠であり，患者の発話の内容が重要となる。患者は医療者とのやり取りの中で，発話すべき事柄を学んでいく。自発的に，かつ，正しく説明できる事項は簡潔に，そうではない事項は，医療者による適切な誘導が必要となる。

FA 患者は経験した症状を語る際に，食品名のみ，あるいは症状のみを示すことが多く，本人や身近に FA を経験した人がいるほど，その傾向が高くなることを明らかにした。FA の症状に関する自発的発話の言語量は，女性よりも男性の方が少なかった。FA は食生活と密接に関係する。そのことが，こうした性差に繋がったと考えられる。

FA を経験した家族の有無は，言語量の差にはつながらなかった。一方で，発話に含まれる情報

については、FAを経験した家族の有無が情報充足率に影響を与えていることを明らかにした。自身のFA経験に関する発話では、FA+の家族がいない群において、経過および検査の情報充足率が高かった。自身の症状については、自分自身がよく理解しており、他人への伝達は簡潔に済まされていることが危惧された。一方、FA+の小児家族のFA経験に関する発話では、経過、治療、調理では、本人がFA-である群では情報の充足率が高く、検査だけが低かった。同居家族の存在が発話すべき情報の学習に影響を与えると仮定したが、本調査の結果、FAや子育てを経験することで、調理加工や検査が発話すべき情報であると学習した人において発話されている可能性が高い。親として、自身の子供の症状を観察し、説明することに慣れていることが要因の一つとして考えられる。

次回の診療に備えて、患者あるいはその家族が、日頃から正確な診断につながる情報を収集することが必要である。Closed questionでは、FAの経験はないとした回答者のうち、19.0%の回答者が具体的な事例を示しながら聞き取りを行うことで、回答を変更する可能性があることを見出した。その中で、症状が軽度だったことを理由にした回答者の割合は40.6%と最も多く、それが原因になるとは思わなかったことを理由にした回答者も9.3%存在した。これらは、単なる思い込みとは言い切れず、知識の有無が患者の発話に影響を与えた可能性がある。

これらの結果から、多くの人自身が経験からFAに関する知識を得るだけでなく、子育てなどを通して食生活と密接に関わることで、アレルギーや調理加工による低アレルギー化情報、検査結果の捉え方など多くの情報を得ていると推察された。

4-4-3. FAに関する正しい情報の普及

本研究では、FA患者と接している人々が必要としている情報を探索するために、ナイーブベイジモデル（ベイズ学習法）による自動分類法を、Yahoo!知恵袋に投稿された質問文に適用して解析を行った。

Webアンケートに寄せられた意見の中には、Fig. 20が示すように、世代による認識の違いを指摘したものが多くみられた。回答者に選択肢を提示し、その中から必要としている情報のニーズをつかむことは容易である。しかし、回答者が正しく選択肢を選ぶことができるとは限らない。前述の検討で明らかにしたように、FAに関する回答は、発話量が多くても必要な情報が含まれていないことが多々ある。テキストマイニングは、意味のある語のレベルに患者の発話を分解し、それらの関係性を数値化することで、真の要望を取り出す手法である(Hachiken *et al.*, 2012; Higuchi, 2016, 2017)。本研究で用いたナイーブベイジモデル（ベイズ学習法）による分類は、いわば、事象を整理するために用いる親和図法や、問題解決のために用いられるKJ法を、自然言語処理技術を用いて具体化するものと捉えることができる。したがって、大量のデータから傾向を予測するツールとしての応用が期待されている。

Yahoo!知恵袋に投稿された、FAに関する質問を解析した結果、診断（病院や専門医、検査など）に関するニーズが48.8%と最も大きく、啓発活動（学校、世代、死ぬなど）が31.9%、機序（遺伝、年齢、ストレス）が13.8%と続いた。FAに限定せずに集めた質問文と比較すると、啓発活動は4.6ポイント、機序は6.0ポイント、回避は0.2ポイント増加した。

Web アンケートで示された、世代による認識の違いは、アレルギー疾患の中でも FA に特有のものであることが伺えた。FA に関する一般的な知識が大きく変化してきたことや、食育の普及との関わりも考えられる。子育て世代は、学校現場を通じて、比較的新しい情報を入手する機会に恵まれるが、高齢世代はそうした情報に触れる機会が少ない。特に、FA を好き嫌いと捉えて無理に食べさせようとする、反対に、徹底的な除去を強いるなどの情報ギャップが存在し、子育て世代における大きな問題となっている様子が Yahoo!知恵袋の投稿文からも示唆された。

アレルゲンや症状に関する知識が一般的には十分ではないため、なぜ症状が出るのかを理論的に考えることができず、日常生活の中で適切な対応ができていない人が存在する可能性もある。FA の定義は「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と明確に定められているものの、アレルギーの症状自体は様々な理由でおきる。なぜ症状が起きたのか、その原因を探るのは難しいことが反映された結果であると考えられた。

4-5. 小括

本章では、非医療関係者の FA の知識における特徴を明らかにすることを目的とした Web アンケートを実施した。その結果を解析するとともに、インターネット上で公開されている質問投稿サイトの投稿文を自然言語処理技術に基づくテキストマイニング手法により解析した。Web アンケートにより得られた少量サンプルを手がかりとし、出現用語とその頻度から分類用スコアを算出することで、FA 患者と日常的に接している人々に必要とされている情報のニーズとその割合を示した。

表示義務がある食品は、いずれもアレルゲンとしての認知率は非常に高いものの、推奨品目の中には認知率が低いものが存在した。アレルゲンとしての魚類の認知率は約 7 割であった。今回調査した 3 魚種（サケ、サバ、マグロ）の中で、サケの認知率が最も低く、第 1 章で指摘したサケ科魚類の表記についてはより積極的な情報提供が必要であることが示された。

FA の原因食品の認知率と比較すると、FA の症状の認知率は高くなかった。回答のばらつきは少なく、皮膚症状、消化器症状、アナフィラキシーのいずれかの回答に集約された。

調理加工による低アレルゲン化について全く知らない人が全体の 45.3% 存在した。こうした理解不足は、症状を経験した食品を徹底的に除去する行動を引き起こしやすいと考えられる。さらに、FA の症状に関する質問に対して、原因食品を回答した人が半数近くいたことから、原因食品に強い意識があり、適切な栄養指導を受ける前に不適切な自己判断を行ってしまうと考えられる。

多くの FA 患者は、経験した症状を語る時に、食品のみ、あるいは、症状のみを端的に示すことが多く、本人や身近に FA を経験した人がいるほど、その傾向が強く見られた。自身の子供の FA について説明する際には、言語量が増え、情報充足率も向上していることから、FA や子育てを経験することで、アレルゲンの種類、調理加工の情報、検査結果についても医療関係者や指導者に伝えるべき情報であることなどを学習していることを示した。

質問投稿サイトの投稿文の記述を解析した結果、診断に関する情報へのニーズが最も高いこと、さらに、啓発活動に対するニーズは他のアレルギー疾患と比較して FA で高いことを明らかにした。FA に関して提供されている情報は時代とともに変わっていく。FA は小児にとって重大な問題であり、子育て世代は学校や医療の現場から新しい情報を入手する機会に恵まれる。しかし、高齢になるにつれ、新しい情報に触れる機会が減少していく。FA を好き嫌いと捉えて無理に食べさせようとする、反対に、徹底的な除去を強いるなどの身近な人による行動が、子育て世代では、世代間ギャップとして大きな問題となっていることを明らかにした。

Web アンケートによる調査では、FA の情報に関する認知率、FA の知識が患者発話に与える影響について明らかにするとともに、質問投稿サイトの投稿文の記述から、FA に関する正しい情報の普及に必要な観点を明らかにした。また、これらの結果から、時代とともに変わる FA 情報を、世代を超えて正しく伝えていくことが、正しい診断と適切な栄養指導を必要としている FA 患者への大きな支援となることを明らかにした。

結論

食物によって引き起こされる、抗原特異的な免疫学的機序を介して生じる FA 患者の数は年々増加している。日本における魚類アレルギーの有症率の報告はないが、即時型 FA 症状の調査では、2.1%を占めると報告されている（日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会，2018）。広範な原因食品の除去や制限は、患者、特に患児への栄養状態の悪化が懸念され、食育の観点からも、食べられるものを増やす指導を実現するための体制づくりが急務となっている。

魚類アレルギーでは PA とコラーゲンが主要アレルゲンとして特定されている。魚類アレルギーの問題点は、食用とされている魚類が非常に多く、PA は魚種間で交差抗原性が認められることから、摂取可能な魚を見極めることが難しいことにある。魚類アレルギー患者の支援には、アレルギーを起こしにくい魚種の情報を蓄積し、低アレルゲン化食品を開発するだけでは十分ではない。魚類アレルギーでは、アレルギー症状が誘発される状況が多様であり、正確な診断が困難であることが多い。患者や周囲の人の不正確な知識は、問診や診断、栄養指導の妨げになる。問診を有意義なものとし、的確な栄養指導を受けるために、患者や非医療関係者が有している、FA の症状やアレルゲンに対する知識に関する特徴を明らかにすることが必要である。このような背景から、本研究では魚類アレルギー患者への対策・支援のために、多様な魚種のアレルゲンに関する情報のデータベース化と低アレルゲン化手法に関する基礎的な検討に加え、FA に関わる適切な情報提供のあり方について検討した。本論文の第 1 章から第 4 章で述べた結果を以下にまとめる。

第 1 章

日本全国で食用とされている 128 魚種について、魚肉中に含まれる PA 量および IgG 反応性の魚種による違いを ELISA 法により評価することで、魚類アレルギー患者が安全に食することができる魚種を探索する際に有用な IgG 反応性に関する情報を集積した。

食用とされる機会の多いサケ科魚類に着目し、サケ科 12 魚種の比較検討により、イトウの IgG 反応性が最も高く、シロザケが最も低いことを明らかにした。サケ科の魚は、海へ出ることなく一生を川で過ごす陸封型の生活史を有するものと、川で生まれて海で生活する降海型の生活史を有するものに大別される。本研究では 3 対の降海型と陸封型のペア、ヒメマスとベニザケ、ヤマメとサクラマス、ニジマスとサーモントラウトについて検討した。その結果、いずれも陸封型の魚種のほうが、IgG 反応性が高いことを明らかにした。

次に、大型の 7 魚種を用いて、部位依存性を検討した結果、外洋に生息するクロマグロやマスノスケは頭部の IgG 反応性が高く、尾部の IgG 反応性は低かった。一方、底生魚であり、全躯運動をするハモやナマズにはそうした部位依存性は見られなかった。124 魚種を対象として行ったスクリーニングの結果、キハダ、カマスサワラ、シロサバフグ、マンボウ、シラウオ、マカジカは PA の含有量が極めて少なかった。ヨシキリザメ、マカスベ、カワヤツメも PA の IgG 反応性が低かった。これらの結果から、128 魚種を相対的に比較しながら、魚類アレルギー患者に対してリスクの低い、すなわち PA が少ない魚種あるいは IgG 反応性が非常に弱い PA を有する魚種を探索する際に有用な情報を得ることができた。

第2章

プロテアーゼを用いた低アレルゲン化の有効性を明らかにするために、カタクチイワシの魚肉を食品製造加工用の7種の酵素で処理し、得られた魚肉エキス中のPAおよびコラーゲンのIgE反応性を、FA患者血清を用いたELISA法により評価した。

その結果、苦味やヒスタミン含有量の増加を招くことなく、分子量分布が1 kDa以下のペプチドを主成分とする低アレルゲン化エキスを調製することができた。食品製造加工用酵素を用いて工業的工程に基づき得られた魚肉エキスは、低アレルゲン化食品としてより多くの患者に提供できる可能性がある。PAおよびコラーゲンのIgE反応性の低減化効果は、*Bacillus licheniformis*由来のアルカラーゼ（エンドペプチダーゼ活性）と*Aspergillus oryzae*由来のフレーバーザイム（エキソペプチダーゼ活性）の組み合わせで得ることができた。これらの結果から、IgE反応性の低減化効果は、酵素消化によって得られた分解産物のペプチド分子量には依存しておらず、アレルゲンタンパク質の抗体認識部位、すなわちエピトープ部位を消化する酵素の基質特異性に依存することが示唆された。

第3章

水晒し、肉挽き、KCl水溶液によるアレルゲンタンパク質の除去の有用性を明らかとすることを目的として、魚肉を原料とした水産練り製品のIgE反応性の評価を行なった。さらに、スケトウダラすり身からの低アレルゲン化かまぼこの調製を試みた。

魚肉中のPAは水への溶解度が高いため、水晒し処理を繰り返すことで魚肉中のPA含有量を検出限界以下に低下させることができることを明らかにした。KCl水溶液を用いてAM画分を抽出することで、コラーゲンの高い除去効果が得られることを示すことができた。洋上すり身から調製されたAM画分はPAに対するIgG反応性がほぼ消失し、コラーゲンのIgG反応性も大きく低下した。これらの結果から、魚類によるアレルギーが起きる可能性がある消費者に対して、水晒し、肉挽き、そしてKCl水溶液によるAM画分の抽出法は、魚肉からアレルゲンタンパク質を効果的に除去する方法として有用であることを示すことができた。これらの処理を組み合わせることで、除去食や制限食による制約を軽減することができる低アレルゲン化食品を、患者に合わせて魚種や手法を選んだ上で、調理・加工により調製できることを示した。

第4章

非医療関係者のFAの知識における特徴を明らかにし、正確な診断のために必要不可欠な正しい情報を普及することを目的として、Webアンケートを実施した後、質問投稿サイトの投稿文を自然言語処理技術に基づくテキストマイニング手法により解析した。

表示推奨品目であるさけやさばを含む魚類の原因食品としての認知率は約7割で、今回検討した3魚種（サケ、サバ、マグロ）の中でサケの認知率が最も低いものであったことから、サケ科魚類の表記についてはより積極的な情報提供が必要であることを示した。調理加工による低アレルゲン化について全く知らない人が全体の45.3%存在した。このようなFAに関する理解不足は、

症状を経験した食品を徹底的に除去する行動を引き起こしやすいと考えられる。FA の症状に関する質問で、原因食品を回答した人が半数近くいたことから、原因食品に強い意識があり、適切な栄養指導を受ける前に不適切な自己判断が行われる可能性がある。多くの人が FA や子育てを経験することで、アレルゲンの種類、調理加工の情報、検査結果についても、問診の際に説明すべき情報であることを学習していることを明らかにした。FA は、啓発活動に対するニーズが他のアレルギー疾患と比較して高く、子育て世代において世代間の情報ギャップは大きな問題となっていることが示唆された。これらの結果から、時代とともに変わる FA 情報を、世代を超えて正しく伝えていくことが、正しい診断と的確な栄養指導を必要としている FA 患者への大きな支援となることを示した。

FA は、食物またはその成分がアレルギー症状の誘発に関与しており、食べるという行為だけではなく、触れる、吸い込むといった間接的な接触行動により起きることがある (Lack, 2008)。その一方で、乳製品の摂取により起きる乳糖不耐症や、青魚の摂取で起きるヒスタミン中毒などの食物不耐症と症状は類似している。魚類アレルギーでは、魚体に存在する寄生虫や、消化管内容物に由来するタンパク質が原因となっていることも多く、こうした食品に関する生化学的な理解を、FA と関わる多くの人に広げていく必要がある。FA の原因となる食品に対する情報は、ちくわといった調理加工品、卵やアジといった食品素材、オボムコイドや PA といったアレルゲンタンパク質、それぞれに対して蓄積されていく。食用とされる魚種は多岐にわたるが、FishBase などの魚類に関するデータベースが公開されており、生物学的分類、生息環境、食餌、形状などの情報を容易に得ることができる。水産加工品は種類が多く、その製法も多岐に渡る。医学や栄養学の専門家が、患者への個別対応を行うことを前提にすれば、これらの知見を検討した上で、魚類アレルギー患者への低アレルゲン化食品の提供は可能である。本研究で得られた知見は、こうしたデータベースを有効活用し個別対応を行うこと、そして、魚類アレルギーに苦しむ人々への支援につながることを期待される。

謝辞

本研究の共同研究者として、終始懇切なる御指導を賜りました北海道文教大学 板垣康治 教授をはじめ、東京海洋大学 塩見一雄 教授、日本大学 松宮政弘 教授、横浜国立大学 杉山久仁子 教授、神奈川県こども医療センター 栗原和幸 教授、メグミルク株式会社 伊藤正也 氏、仙味エキス株式会社 箆島克裕 氏、近藤智彦 氏、中村 厚 氏に深謝いたします。

本研究への有益な御助言と多大な御協力を賜りました慶応義塾大学 望月真弓 教授、東京大学 久保田潔 教授、東京大学特任研究員 岡崎光洋 氏に深謝いたします。

本研究における実験遂行にあたり、御協力を賜りました神奈川県衛生研究所アレルギー研究チーム 深井むつみ 氏、飯島ひとみ 氏、小菅友里 氏、清水明寿 氏、角田誠 氏、柴田健治 氏、東京薬科大学 西澤麻里 氏、中の堂ひとみ 氏、今野菜穂 氏に感謝いたします。

本研究に対し、御配慮と御便宜を賜りました神奈川県衛生研究所の職員みなさまに感謝いたします。

本研究にまとめるにあたり、多大な御指導および御鞭撻を賜りました東京薬科大学 土橋 朗 教授に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Aas, K. and Elsayed, S. (1975), Physio-chemical properties and specific activity of a purified allergen (codfish), *Dev. Biol. Stand.*, **29**, 90-98
- Abe, H., Amano, H., Ushio, H. *et al.*, (2004), Suisankagaku gairon, Tanpakushitsu (in Japanese), "*Suisan kaiyou handbook*", Takeuchi, T., Nakata, H., Wada, T., Ushio, H., Arimoto, T., Watabe, S. and Nakamae, A., Ed., Seibutu kenkyusya., Tokyo, pp.391-408
- Ajisaka, T., Iguchi, K., Ishimatsu, A. *et al.*, (2004), Kaiyu koudou (in Japanese), "*Suisan kaiyou handbook*", Takeuchi, T., Nakata, H., Wada, T., Ushio, H., Arimoto, T., Watabe, S. and Nakamae, A., Ed., Seibutu kenkyusya., Tokyo, pp.117-120
- Aldámiz-Echevarría, L., Bilbao, A., Andrade, F., Elorz, J., Prieto, A. J. and Rodríguez-Soriano, J. (2008), Fatty acid deficiency profile in children with food allergy managed with elimination diets, *Acta Paediatr.*, **97**, 1572-1576
- Albert, C. M., Campos, H., Stampfer, M. J., Ridker, P. M., Manson, J. E., Willett, W. C. and Ma, J. (2002), Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1113-1118
- Amano, H., Ohshima, T., Ochiai, Y. *et al.*, (2004), Neri seihin, Reitou surimi (in Japanese), "*Suisan kaiyou handbook*", Takeuchi, T., Nakata, H., Wada, T., Ushio, H., Arimoto, T., Watabe, S. and Nakamae, A., Ed., Seibutu kenkyusya., Tokyo, pp.457-464
- Arif, S. H. (2009), A Ca²⁺-binding protein with numerous roles and used: parvalbumin in molecular biology and physiology, *BioAssays*, **31**, 410-421
- Bernhisel-Broadbent, J., Scanlon, S. M. and Sampson, H. A. (1992a), Fish hypersensitivity I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **89**, 730-737
- Bernhisel-Broadbent, J., Sterause, D. and Sampson, H. A. (1992b), Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 622-629
- Bugajska-Schretter, A., Pastore, A., Vangelista, L., Rumpold, H., Valenta, R. and Spitzauer, S. (1999), Molecular and immunological characterization of carp parvalbumin, a major fish allergen, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **118**, 306-308
- Burks, A. W., Laubach, S. and Jones, S. M. (2008), Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **121**, 1344-1350
- Crespo, J. F., Pascual, C., Burks, A. W., Helm, R. M. and Esteban, M. M. (1995), Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain, *Pediatr. Allergy Immunol.*, **6**, 39-43
- Daschner, A., Alonso-Gomez, A., Cabanas, R., Suarez-de-Parga, J. M. and Lopez-Serrano,

- M. C. (2000), Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 176-181
- Dores, D. S., Chopin, C., Romano, A., Galland-Irmouli, A. V., Quarantino, D., Pascual, C., Fleurence, J. and Gneant, J. L. (2002), IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allelrgen of codfish, *Allergy*, **57**, 84-87
- Ebisawa, M. (2018a), Syokumotu arerugii no Shinryo (in Japanese), “*Syokumotu arerugi no eiyou sidou*”, Imai, T., Takamatsu, N. and Hayashi, N., Ed., Ishiyaku Publisher Inc., Tokyo, pp.2-4
- Ebisawa, M. (2018b), Rekishiteki Haikei to Gainenn no Henka (in Japanese), “*Syourei wo toshite manabu nenndaibetu shokumotu arerugi no subete*”, Ebisawa, T., Ed., Nankoudou, Tokyo, pp.2-7
- Elsayed, S. and Aas, K. (1971), Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **40**, 428-438
- Elsayed, S. and Bennich, H. (1975), The Primary structure of allergen M from cod, *Scand. J. Immunol.*, **4**, 203-208
- Elsayed, S. and Apold, J. (1983), Immunochemical analysis of cod fish allergen M: Locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides, *Allergy*, **38**, 449-459
- Faeste, C. K. and Plassen, C. (2008), Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods, *J. Immunol. Methods*, **329**, 45-55
- Fu, H. B., Bronner, L., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Rexrode, K. M., Albert, C. M., Hunter, D. and Manson, J. E. (2002), Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women, *JAMA*, **287**, 1815-1821
- Gallnd, A. V., Dory, D., Pons, L., Chopin, C., Rabesona, H., Gueant, J. L. and Fleurence, J. (1998), Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein, *J. Chromatogr. B*, **706**, 63-71.
- Gerday, C. (1982), Soluble calcium-binding proteins from fish and invertebrate muscle, *Mol. Physiol.*, **2**, 63-87
- Hachiken, H., Matsuoka, A., Murai, A., Kinoshita, S. and Takada, M. (2012), Iryo Yakugaku Kenkyu no Text mining ni yoru Keiryouteiki Bunseki (in Japanese), *Janaese Journal of Drug Informatics*, **13**, 152-159
- Hajab, P. and Seamat, J. (2012), A contemporary review of seafood allergy, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **42**, 365-385
- Hamada, Y., Genka, E., Ohira, M., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (2000), Allergenicity of fish meat paste products and *surimi* from Walleye pollack (in Japanese), *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **41**, 38-43

- Hamada, Y. and Shiomi, K. (2001), Collagen: A new allergen of fish allergy (in Japanese), *Nihon syouni arerugii gakkaiishi (J. J. Pediatric Allergy Clin. Immunol.)*, **15**, 47-53
- Hamada, Y., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (2001), Identification of collagen as a new fish allergen, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 285-291
- Hamada, Y., Tanaka, H., Ishizaki, S., Ishida, M., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (2003), Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels, *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1149-1156
- Hamoir, G., Gerardin-Otteiers, N. and Focant, B. (1980), Protein differentiation of the superfast swimbladder muscle of the toad fish *Opsanus tau*, *J. Mol. Biol.*, **143**, 155-160
- Hartley, R. (1928), Transmission of information, *Bell System Technical Journal*, **7**, 535-563
- Higuchi, K. (2016), A two-step approach to quantitative content analysis: KH Coder tutorial using Anne of Green Gables (Part I), *Ritsumeikan Social Science Review*, **52**, 77-91
- Higuchi, K. (2017), A two-step approach to quantitative content analysis: KH Coder tutorial using Anne of Green Gables (Part II), *Ritsumeikan Social Science Review*, **53**, 137-147
- Hilger, C., Thill, L., Grigioni, F., Lehnert, C., Falagiani, P., Ferrara, A., Romano, C., Stevens, W., and Hentges, F. (2004), IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin, *Allergy*, **59**, 653-660
- Honma S. (2016), Bio technology to syokuhin (in Japanese), *Syokuhin kakou chozougaku.*, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, pp.197-200
- Iikura, Y., Imai, Y. and Imai, T. (1999), Frequency of immediate-type food allergy in children in Japan, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **118**, 251-252
- Ikematsu, K., Tachimoto, H., Sugisaki, C., Sykuya, A. and Ebisawa, M. (2006), Feature of food allergy developed during infancy (2): Acquisition of tolerance against hen's egg, cow's milk, wheat, and soybean up to 3 years old (in Japanese), *Allerugi (Japanese J. allergol.)*, **55**, 533-541
- Imai, T. (2018), Ekigaku (in Japanese), "Syousei wo toshite manabu nenndaibetu shokumotu arerugi no subete", Ebisawa, T., Ed., Nanzandou, Tokyo, pp.8-11
- Itagaki, Y. (2011), Food allergy and Fish (in Japanese), *Nihon Chourikagaku Kaishi (J. Cookery Sci. Japan)*, **44**, 306-309
- Kato N. (2001), Suisan neri seihin no anzensei (in Japanese), "Suisanbutu no anzensei", Makinodan, Y. and Murata, M. Ed., Koseisyakouseikaku, Tokyo, pp.148-151
- Kawashima, S. (2008), Papain (in Japanese), "Kousou handbook", Yagi, T., Fukui, T., Ichishima, E., Kagamiyama, H. and Toraya, T., Ed., Asakura shoten., Tokyo, pp.658

- Kobayashi, Y., Yang, T., Yu, C. T., Ume, C., Kubota, H., Shimakura, K., Shiomi, K., and Hamada-sato. N. (2016), Quantification of major allergen parvalbumin in 22 species of fish by SDS-PAGE. *Food Chemistry*, **194**, 345-353
- Kondo, Y., Kakami, M., Koyama, H., Yasuda, T., Nakajima, Y., Kawamura, M., Tokuda, R., Tsuge I. and Urisu, A. (2005), IgE cross-reactivity between fish roe (salmon, herring and pollack) and chicken egg in patients anaphylactic to salmon roe, *Allergol. Int.*, **54**, 317-323
- Kondo, Y., Ahn, J., Komatsubara, R., Terada, A., Yasuda, T., Tsuge, I. and Urisu, A. (2009), Comparison of allergenic properties of salmon (*Oncorhynchus nerka*) between landlocked and anadromous species, *Allergol. Int.*, **58**, 295-299
- Koyama, H., Kakami, M., Kawamura, M., Tokuda, R., Kondo, Y., Tsuge, I., Yamada, K. m Yasuda, T. and Urisu, A. (2006), Grades of 43 fish species in Japan based on IgE-binding activity, *Allergol. Int.*, **55**, 311-316
- Lack, G. (2008), Epidemiologic risks for food allergy, *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **121**, 1331-1336
- Leung, N. Y., Wai, C. Y. and Chu, K. H. (2014), Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: A comprehensive review, *Clinic Rev. Allerg.*, **46**, 180-197
- Lindstrom, C. D., Van, D. T., Hordvik, I., Endresen, C. and Elsayed, S. (1996), Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Scand. J. Immunol.*, **44**, 335-344
- Mehta, H., Groetch, M. and Wang, J. (2013), Growth and nutritional concerns in children with food allergy, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **13**, 275-279
- Mochizuki, A. and Matsumiya, M. (1991), Effects of starches on textural characteristic of cold stored *kamaboko* (in Japanese), *Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ.*, **48**, 173-179
- Morioka, K. and Shimizu, Y. (1990), Contribution of sarcoplasmic proteins to gel formation of fish meat (in Japanese), *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 929-933
- Motoyama, K., Suma, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (2007), Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 985-991
- Muntener, M., Kaser, L., Weber, J. and Berchtold, M. W. (1995), Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 6504-6508
- Nagasaki F. (2000), Nihonjin to gyosyoku (in Japanese), "*Suisan syokuhin no jiten*", Takeuchi, M., Fujii, T. and Yamazawa, M., Ed., Asakura syoten., Tokyo, pp.1-7
- Nagashima T. (2000), Suisanbutsu, kakouhin no seisan doukou to syourai (in Japanese),

- "*Suisan syokuhin no jiten*", Takeuchi, M., Fujii, T. and Yamazawa, M., Ed., Asakura syoten., Tokyo, pp.14-19
- Nishimura, T. (2001), Role of peptides in food taste (in Japanese), *Kagaku to seibutsu*, **39**, 177-783
- Nishimura T. (2016), Sakana no Kakou (in Japanese), "*Syokuhin kakou chozougaku*", Honma, S. and Murata M., Ed., Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, pp.79-80
- Ono, A. (2005a), Search for Japanese term 'joho' in actual use (1) (in Japanese), *Joho Shori*, **46**, 347-351
- Ono, A. (2005b), Search for Japanese term 'joho' in actual use (2) (in Japanese), *Joho Shori*, **46**, 475-479
- Ono, A. (2005c), Search for Japanese term 'joho' in actual use (3) (in Japanese), *Joho shori*, **46**, 612-616
- Pascual, C., Esteban, M. M. and Crespo, S. B. (1992), Fish allergy: Evaluation of the importance of cross-reactivity, *J. Pediatr.*, **121**, 29-34
- Rance, F., Grandmottet, X. and Grandjea, H. (2005), Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France, *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 167-172
- Ribeiro, J. C., Chuha, L. M., Sousa-Pinto, B. and Fonseca, J. (2018), Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review, *Mol. Nutr. Food Res.*, **62**, 1700030.
- Ruethers, T., Taki, A. C., Johnston, E. B., Nugraha, R., Le, T. T. K., Kalic, T., McLean, T., Kamath S. D. and Lopata, A. L. (2018), Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens, *Mol. Immunol.*, **100**, 28-57
- Saarinen, U. M. and Kajosaari, M. (1980), Does dietary elimination in infancy prevent or only postpone a food allergy? A study of fish and citrus allergy in 375 children, *Lancet*, **1**, 166-167
- Sampson, H. A. (2001), Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **107**, 891-896
- Sampson, H. A. (2004), Update on food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **113**, 805-819
- Sanuki, H., Hata, M. and Takeuchi, M. (2003), Distribution of calcium bound to parvalbumin in water-soluble fractions in some fish muscles (in Japanese), *Nippon Suisan Gakkaishi*, **69**, 387-392
- Schiere, S. H., Munoz-Furlong, A. and Sampson, H. A. (2004), Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **114**, 159-165
- Schiere, S. H. (2011), Epidemiology of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 594-602
- Schulkes, K. J., Klemans, R. J., Knigge, L., de Bruin-Waller, M., Bruijnzeel-Koomen, C.

- A., Marknell deWitt, A., Lidholm, J. and Knulst, A. C. (2014), Specific IgE to fish extracts does not predict allergy to specific species within an adult fish allergic population, *Clin. Transl. Allergy*, **4**, 27-33
- Scurlock, A. M., Vickery, B. P., Hourihane, J. O. and Burks, A. W. (2010), Pediatric food allergy and mucosal tolerance, *Mucosal Immunol.*, **3**, 345-354
- Seheila, M. J., Wesley, B. A. and Richi, H. M. (2006), *Food Allergy*, American Society for Microbiology Press, Washington, USA
- Sharp, M. F. and Lopata, A. L. (2014), Fish allergy: In review. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.*, **46**, 258-271
- Shibata, K., Hayashi, S., Ishikawa, M., Shimakura, K. and Nagashima, Y. (1998), Identification of parvalbumin as an allergen in Horse mackerel muscle, *Fish. Sci.*, **64**, 300-304
- Shimakura, K., Wataya, Y. and Shiomi, K. (2012), Comparative analyses of allergens between landlocked and anadromous species of masu salmon *Oncorhynchus masou masou* (in Japanese), *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **53**, 8-13
- Shimizu, K., Nakamura, A., Kishimura, H., Hara, A., Watanabe, K. and Saeki, H. (2009), Major allergen and its IgE cross-reactivity among salmonid fish roe allergy, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 2314-2319
- Shimizu, Y., Kishimura, H., Kannno, G., Nakamura, A., Adachi, R., Akiyama, H., Watanabe, K., Hara, A., Ebisawa, M. and Saeki, H. (2014), Molecular and immunological characterization of β' -component (Onc k 5), a major IgE-binding protein in chum salmon roe, *Int. Immunol.*, **26**, 139-147
- Shiomi, K. (2003), Gyokairui to Arerugii (in Japanese), "Sakana no Syokumotsu arerugii (in Japanese)", The Japanese Society of Fisheries Science, Seizando Syoten, Tokyo.
- Shiomi, K., Hayashi, S., Ishikawa, M., Shimakura, K. and Nagashima, Y. (1998), Identification of parvalbumin as an allergen in Horse mackerel muscle, *Fish. Sci.*, **64**, 300-304
- Shiomi, K., Hamada, Y., Sekiguchi, K., Shimakura, K. and Nagashima, Y. (1999), Two classes of allergens, parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel and bigeye tuna, *Fish. Sci.*, **65**, 592-595
- Shiomi, K., Yoshida, S., Sawaguchi, T. and Ishizaki, S. (2010), A major IgE epitope of rainbow trout collagen alpha 2 chain, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **51**, 153-159
- Suzuki, K. (2000), Suisanbutu no eiyouseibun (in Japanese), "Suisan syokuhin no jiten", Takeuchi, M., Fujii, T. and Yamazawa, M., Ed., Asakura syoten., Tokyo, pp.37-43
- Suzuki, S. and Nakamura, Y. (2007), A case of oral allergy syndrome due to extracts of bonito (*Katsuo-dashi*) (in Japanese), *J. Showa Medical Assoc.*, **67**, 87-91

- Suzuki, T. (2012), Usefulness of n-3 polyunsaturated fatty acids in children (in Japanese), *Shishitsu eiyougaku (J. Lipid Nutr.)*, **21**, 217-229
- Swoboda, I., Bugajska-Schretter, A., Linhart, B., Verdino, P., Keller, W. and Schlmeister, U. (2007), A recombinant hypoallergic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy, *J. Immunol.*, **178**, 6290-6296
- Takeuchi, M. (1994), Molecular biology and gene use of mold.3. Useful enzyme of mold and its gene characteristics (in Japanese). *Kagaku to Seibutsu*, **32**, 195-202
- Taylor, S. L. (1986), Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects, *Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 91-128
- Taylor, S. L., Lemanske, R. F., Bush, R. K. and Busse, W. W. (1987), Food allergens: Structure and immunologic properties, *Ann. Allergy*, **59**, 93-99
- Taylor, S. L., Kabourek, J. L. and Hefle, S. L. (2004), Fish allergy: Fish and products thereof, *J. Food Sci.*, **69**, 175-180
- Tomura, S., Ishizaki, S., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (2008), Reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by mutations at Ca²⁺-binding sites, *Fish. Sci.*, **74**, 411-417
- Ueda, H. (2004), Kaiyu koudou (in Japanese), "*Suisan kaiyou handbook*", Takeuchi, T., Nakata, H., Wada, T., Ushio, H., Arimoto, T., Watabe, S. and Nakamae, A., Ed., Seibutu kenkyusya., Tokyo, pp.117-120, 391-393
- Ueno, K., Miyazaki, T., Murakami, Y., Honjyou, S. and Odajima, H. (2016), Growth failure in infants due to restricted intake of milk, or milk and fish (in Japanese), *Nihon syouni nanchizensoku arerugisikkann gakkai (Japanese Soc. Pediatr. Intract. Asthma Allergic Diseases)*, **14**, 11-16
- Unstersmyr, E., Poulsen, L. K., Platzner, M. H., Pederson, M. H., Boltz-Nitulescu, G., Skov, P. S. and Jenson-Jarolim, E. (2005), The effects of gastric digestion on codfish allergenicity, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **115**, 377-382
- Unstersmyr, E., Vestergaard, H., Malling, H. J., Jenson, L. B., Platzner, M. H., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Skov, P. S., Jensen-Jarolim, E. and Poulsen, L. K. (2007), Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**, 711-717
- Van, D. T., Hordvik, C. I., Endressen, S. C. and Elsayed, S. (2004), Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish allergen M, *Mol. Immunol.*, **42**, 345-353
- Van, D. T., Elsayed, S., Florvaag, E. and Hordvik, I. (2005), Allergy to fish parvalbumins: Studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 1314-1320
- Watanabe, J. and Tanabe, S. (2007), Approaches to produce functional foods possessing

- antiallergic Effects (in Japanese), *Kagaku to Seibutsu*, **45**, 168-176
- Watanabe, K. (1994), Gyokairui no Aji (in Japanese), "*Sakana no kagaku*", Abe, H. and Fukuike S., Ed., Asakura shoten., Tokyo, pp.51-55
- Watanabe, M., Miyaoka, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirao, T., Yoshizawa, T. and Arai, S. (1990), Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent proteins, *J. Food Sci.*, **55**, 781-783
- Yamazaki, K., Shimada, K., Shibukawa, S. and Shimomura, M. (2003), Gyokairui no chori (in Japanese), "*Cookery and its theort*", Yamazaki, K., Shimada, K., Shibukawa, S. and Shimomura, M., Ed., Doubun shoin., Tokyo, pp.230-289
- Yoshida, S., Ichimura, A. and Shiomi, K. (2008), Elucidation of a major IgE epitope of Pacific mackerel parvalbumin, *Food Chem.*, **111**, 857-861

Guidlines :

- 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会(2018), *食物アレルギー診療ガイドライン 2016* ダイジェスト版, https://www.dental-diamond.jp/conf/nakakohara/allergy_2016/html/index.html
- 食物アレルギーの診療の手引き 2017 検討委員会(2017), *食物アレルギー診療の手引き 2017*, <https://www.foodallergy.jp/care-guide/>
- 食物アレルギーの栄養指導の手引き 2017 検討委員会(2017), *食物アレルギーの栄養指導の手引き 2017*, <https://www.foodallergy.jp/tebiki/>
- 日本学校保健会(2008), *学校のアレルギー疾患に対する取り組みガイドライン*, https://www.gakkohoken.jp/book/ebook/ebook_1/1.pdf
- 厚生労働省(2011), *保育所におけるアレルギー対応ガイドライン*, <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/pdf/hoiku03.pdf>
- 文部科学省(2015), *学校給食における食物アレルギー対応指針*, http://www.mext.go.jp/a_menu/sports/syokuiku/1355536.htm

研究結果の掲載誌

- Kurata, K., Dobashi, A., Kurihara, K., & Itagaki, Y. (2019), Characterization of Parvalbumin in 127 Species of Fish by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Anti-frog Parvalbumin IgG Antibody and Serum IgE from an Allergic Patient, *J. Cookery Sci. Japan*, **52**, 147-158
- Kurata, K., Itoh, M., Matsumiya, M., Dobashi, A., Nakamura, A., Kondo, T., Osajima, K., & Itagaki Y. (2018), Reduction of Potential IgE Reactivity in Fish Meat of Japanese Anchovy by Enzymatic Degradation of Parvalbumin and Collagen, *J. Cookery Sci. Japan*, **51**, 205-216
- Kurata, K., Itoh, M., Matsumiya, M., Dobashi, A., Itagaki, Y., & Shiomi, K. (2017), Preparation of Hypoallergenic *Kamaboko*: Removal of Parvalbumin and Collagen from Fish Meat by Water-bleaching, Mechanical Grinding and Extraction with Potassium Chloride, *J. Cookery Sci. Japan*, **50**, 141-150