

## 魚類アレルゲンの分離とその性質

儀保 清香\*, 鎌田 陽子\*\*, 中地 伸恵\*\*,  
一橋 沙織\*\*, 大室 和代\*\*\*, 高橋 享子\*\*

\*(武庫川女子大学大学院生活環境学研究科食物栄養学専攻)

\*\* (武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

\*\*\* (宝塚第一病院・小児科)

## Isolation and the Characterization of Fish Allergen

Sayaka Gibo\*, Yoko Kamada\*\*, Nobue Nakachi\*\*,  
Saori Ichihashi\*\*, Kazuyo Ohmuro\*\*\*, Kyoko Takahashi\*\*

\* *Administ Food Sciences and Nutrition Major,  
Graduate School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

\*\* *Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

\*\*\* *Dai-Ichi Hospital, Takarazuka, 665-0832, Japan*

Salt-soluble fractions (I, II), an alkali-soluble fraction (III) and an acid-soluble fraction (IV) were separated from fresh Cod (*Gadus macrocephalus*). Allergenic activities of the I~IV fractions were measured using mAb parvalbumin (mAb PV) and sera of fish-allergy patients. 36kDa and 12.3kDa proteins of the fractions showed a positive reaction against mAb PV. It was presumed that the 12.3kDa protein was parvalbumin (PV) judging from references. However, a positive reaction was indicated only in the 36kDa protein of the III fraction in the IgE reaction with a fish-allergy patient serum. Therefore, it was presumed that the patient having the above serum developed an allergy to a protein being different from PV. Moreover, it was presumed that the 36kDa allergen has the immunity intersection to PV because the positive reaction was shown against mAb PV.

Allergenic activities of alkali-soluble fractions (III) from Salmon, (*Oncorhynchus keta*), Saury, (*Cololabis saira*), Sardine (*Sardinops melanostictus*), Flatfish (*Pleuronectes herzensteini*) were measured with mAb PV and the sera of the patients. However, a clear allergen was not observed as compared with the Cod III fraction.

The Cod III fraction in the acidic solution (pH2~6) was decreased about 50% binding activity with mAb PV by heating at 100°C. The activity of the same fraction in the alkaline solution (pH7~10) was not decreased. Therefore, the Cod III fraction was considered to be heat-stable in the alkaline solution.

## 緒 言

近年、食物アレルギーは増加傾向にあり、時には重篤な症状となることもあることから、アレルギー物質に対する関心が高まっている。また、保育園、幼稚園、小学校において、給食などにおける食物アレルギーに関連した問題も増加している<sup>1)2)3)</sup>。アレルギーを起ししやすい食品はそれぞれの国の食習慣も反映しており、例えば、アメリカではピーナッツ、北欧ではタラ、イスラエルではモモが主要なアレルギー原因食品となっている<sup>4)</sup>。日本では、卵、牛乳、小麦、エビ、米、魚などが挙げられる<sup>1)</sup>。さらに、アレルゲンの低減化研究も発展し、米では低アレルゲン化米、小麦では低アレルゲン化小麦粉などの食品が開発され市販されている<sup>5)6)</sup>。

魚類や甲殻類の摂取量の多い我が国では、魚、エビ、カニなどを原因とした魚・甲殻類アレルギーが増加し、成人の食物アレルギーの第1位となっている<sup>6)7)</sup>。しかし、我が国に魚・甲殻類アレルギーが多いことが認識されたのはごく最近で、特に魚類アレルギーに関する研究は、欧米が先行しているのが現状である<sup>6)</sup>。

魚類アレルギーは、1960年代から北欧においてタラ(Cod)の研究から始められ、主要アレルゲンGad c Iが分子量12,328の筋形質タンパク質の一種パルブアルブミン(PV)であると報告されている<sup>8)9)</sup>。しかし、欧米よりも摂取する魚の種類もはるかに多彩な我が国においては、魚アレルギーの原因タンパク質が複数存在するものと推定される<sup>10)11)</sup>。現在のところ、魚アレルギーの報告はPV・タンパク質が多く、その他の魚アレルギーの報告が僅かである。従って、他の魚アレルギーの解析が早急に必要であると考えられる。

本研究では、比較的、発症頻度の高い魚5種について、mAb PV及び魚アレルギー患者血清を用いて魚アレルギーの検索を行い、また、単離アレルギーについてその性質について検討を行った。

## 実験材料及び方法

### 1. サンプル

「魚光株式会社」(西宮市笠屋町みやこ市場内)において、新鮮なマダラ(Cod, *Gadus macrocephalus*)、サケ(Salmon, *Oncorhynchus keta*)、サンマ(Saury, *Cololabis saira*)、マイワシ(Sardine, *Sardinops*

*melanostictus*)、カレイ(Flatfish, *Pleuronectes herzensteini*)を購入し試料とした。

### 2. 試薬

Anti-Human IgE-HRP (Goat) (ナカライテスク社製)、フェノール試薬(和光純薬社製)を使用した。その他の試薬類は、ナカライテスク社製及び和光純薬社製を用いた。また、抗体として Monoclonal anti-parvalbumin: mAb PV (Swant社製)と患者血清を用いた。患者血清は、小児科外来において魚アレルギー患者と診断された小児血清と成人患者血清をアッセイに供した。医師によりインフォームドコンセントを行い、保護者の同意が得られた魚アレルギー患者3名(3歳~6歳)の血清と同意を得た成人患者血清を用いた(Table 1)。

Table 1. 患者血清一覧

No	性別	年齢	RAST
1	男	3歳7ヶ月	アジ(2) カニ(1) エビ(3)
2	男	6歳	エビ(4) カニ(4) アサリ(3)
3	男	4歳7ヶ月	エビ(2) アサリ(1)
4	女	25歳	エビ 魚類

### 3. サンプル調製

5種類の魚(40g)を適当な大きさに切り、6倍量の0.6mol/L塩化カリウム-0.01mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)を加えてホモジナイズした後、冷却遠心分離(himacCR 20G, 15,000rpm, 4℃, 60min)によってI画分と沈殿を分離した。I画分の一部を採取し加熱した後、冷却遠心分離して得られた上清をII画分とした。沈殿部に0.1mol/L水酸化ナトリウムを加えて2時間以上攪拌し、冷却遠心分離により上清と沈殿に分けた。この操作を4回を行い、4回分の上清を合一して0.5mol/L酢酸で中和後、冷却遠心分離(15,000rpm, 30min)し、上清液を蒸留水で十分透析した。透析終了後、凍結乾燥して得たものをIII画分とした。一方、0.1mol/L水酸化ナトリウム抽出後の沈殿部は蒸留水で2回洗浄後、0.5mol/L酢酸とともに3日間攪拌した。その後、冷却遠心分離し、上清液を蒸留水で十分透析し凍結乾燥したものをIV画分とした。

### 4. SDS-PAGE, Western Blotting 法

試料(2mg/ml)について1%SDSを含む15%アクリルアミドゲルを下層、4.5%ゲルを上層に用い、U.K Laemmli<sup>12)</sup>の方法に従って泳動した。電気泳動後、H. Towbinら<sup>13)</sup>の方法に従ってニトロセル

ローソ膜に転写した。

**5. mAb PV による酵素免疫反応**

転写膜を TBS (Tris-HCl containing 0.5M NaCl, pH7.5) で 3 回振盪洗浄後、1% BSA を含む TBS で 1 時間振盪し、タンパク質未結合部位をブロックした。TBS-T (TBS containing 0.05% Tween 20) で洗浄後、0.1% BSA を含む TBS で希釈した mAb PV を膜上にのせ、室温で 2 時間放置した。一次抗体との反応後 TBS-T で洗浄後、二次抗体として 1000 倍希釈した Anti-Mouse IgG HRP conjugate を膜上にのせ、室温で 2 時間放置した。二次抗体との反応後、TBS-T で洗浄し、4-Chloro-1-Naphthol による基質反応法により、抗原の検出を行った。

**6. 患者血清による酵素免疫反応**

転写膜を TBS (Tris-HCl containing 0.5M NaCl, pH7.5) で洗浄後、1% BSA を含む TBS で 1 時間振盪し、タンパク質未結合部位をブロックした。TBS-T で洗浄後、膜をポリエチレン袋に入れた。その中に一次抗体として、TBS で 10 倍希釈した患者血清を入れ、気泡を抜いてシーリングをし、室温で一晩放置した。一次抗体との反応後、TBS-T で洗浄し、二次抗体として 1000 倍希釈した Anti-Human IgE conjugated to biotin を加え、室温で 2 時間放置した。二次抗体との反応後、TBS-T で洗浄し、1000 倍希釈した Avidin HRP を加え、室温で 1 時間放置した。反応後、TBS-T で洗浄し、4-Chloro-1-Naphthol を使用した基質反応法によりアレルゲンの検出を行った。

**7. 魚 5 種のアレルゲン画分の検索**

マダラ I ~ IV 画分のアレルゲン性を mAb PV と患者血清による酵素免疫反応により、アレルゲン画分を確認した。さらに、魚 5 種のアレルゲン画分について同様の方法で検索を行った。

**8. pH 及び熱処理**

pH2 ~ 10 の緩衝液に溶解したマダラ III 画分 (2mg/ml) を 200µl ずつマイクロチューブに分注した後、パラフィルムで密封し、100℃で 0 分、10 分、60 分の各時間まで加熱した。終了後冷却し、アレルゲン測定に供した。

緩衝液は 0.02M で調製した。

pH2	Gly-HCl buffer
pH3	Gly-HCl buffer
pH4	CH <sub>3</sub> COONa buffer
pH5	CH <sub>3</sub> COONa buffer
pH6	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH7	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH8	Tris-HCl buffer
pH9	Tris-HCl buffer
pH10	NaHCO <sub>3</sub> -NaOH

**実験結果**

**1. アレルゲン画分**

マダラ I ~ III 画分に対する mAb PV による IgG 反応は、いずれの画分も 36kDa と 12.3kDa に陽性反応が認められた (Fig. 1)。また、患者血清による IgE 結合性では I, II, IV 画分には反応が認められず III 画分の 36kDa タンパク質に強い陽性反応が認められた (Fig. 2)。

**2. サケ、マイワシ、サンマ、カレイ、マダラの III 画分に対する患者血清の IgE 結合性**

魚 5 種の III 画分に対する患者血清の IgE 反応の結果、サケ、イワシ、サンマ、カレイのいずれの III 画分にも陽性反応のバンドは認められなかった。また、マダラ III 画分の 36kDa タンパク質に対しては、4 名中 3 名に明確な陽性反応が認められた。また、成人患者も同様にマダラの 36kDa タンパク質のみに免疫陽性反応が認められた (Fig. 3, Fig. 4)。

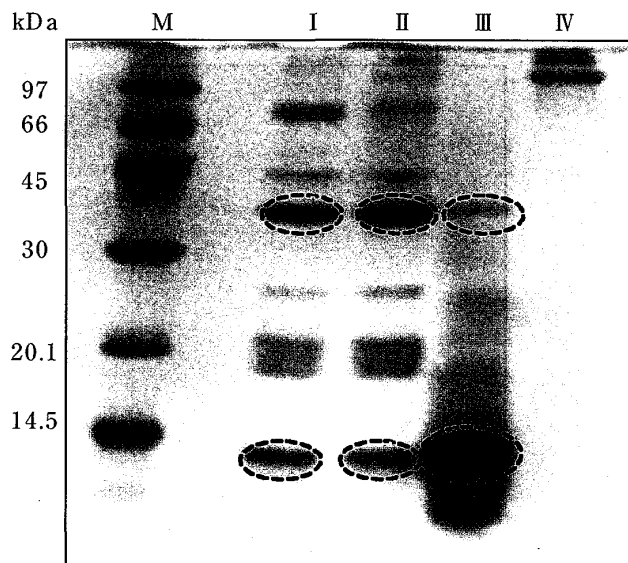


Fig. 1. マダラ I ~ IV 画分の SDS-PAGE と IgG 反応  
M: Marker ○: IgG 陽性反応

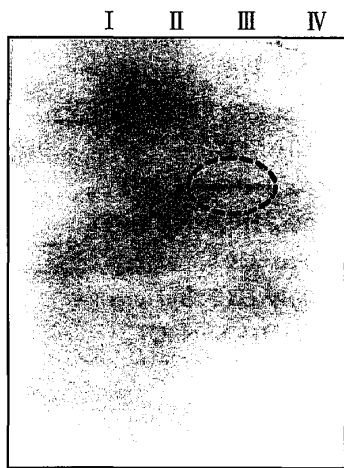


Fig. 2 マダラ I~IV 画分の IgE 反応  
○ : IgE 陽性反応

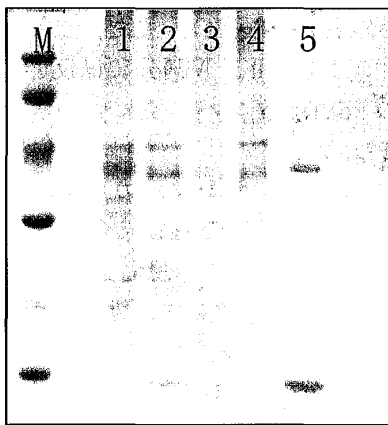


Fig. 3. 魚 5 種の III 画分の SDS-PAGE  
M: Marker, 1: サケ, 2: マイワシ,  
3: サンマ, 4: カレイ, 5: マダラ

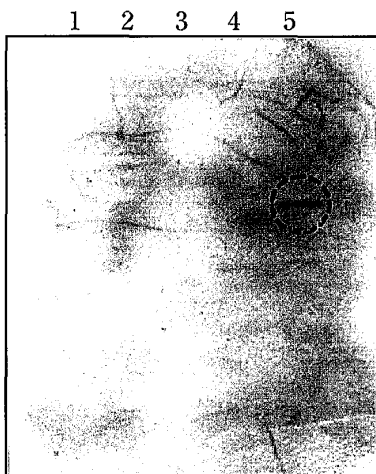


Fig. 4. 魚 5 種 III 画分に対する IgE 反応  
1: サケ, 2: マイワシ, 3: サンマ, 4: カレイ,  
5: マダラ 患者 No. 4 ○ : IgE 陽性反応

### 3. マダラ III 画分の pH, 熱安定性

マダラ III 画分を pH2~10 緩衝液に溶解し, 100℃にて, 0, 10, 60 分で加熱した. その結果, Fig. 5 に示すように, 時間経過と共に pH2~6 の酸性側では, 抗体結合性の低下が認められ, 60 分経過には, 約 50% の低下を示した. しかしながら, pH7~10 の中性からアルカリ性では, 0 分時のアレルゲン活性に比較して大きな変化が認められなかった. 従って, マダラ III 画分は酸性領域, 特に pH2~6 の溶液で, 100℃, 60 分加熱することにより低減化が認められ, 0 分に比較して 40~50% の mAb PV 結合性の低下が認められた.

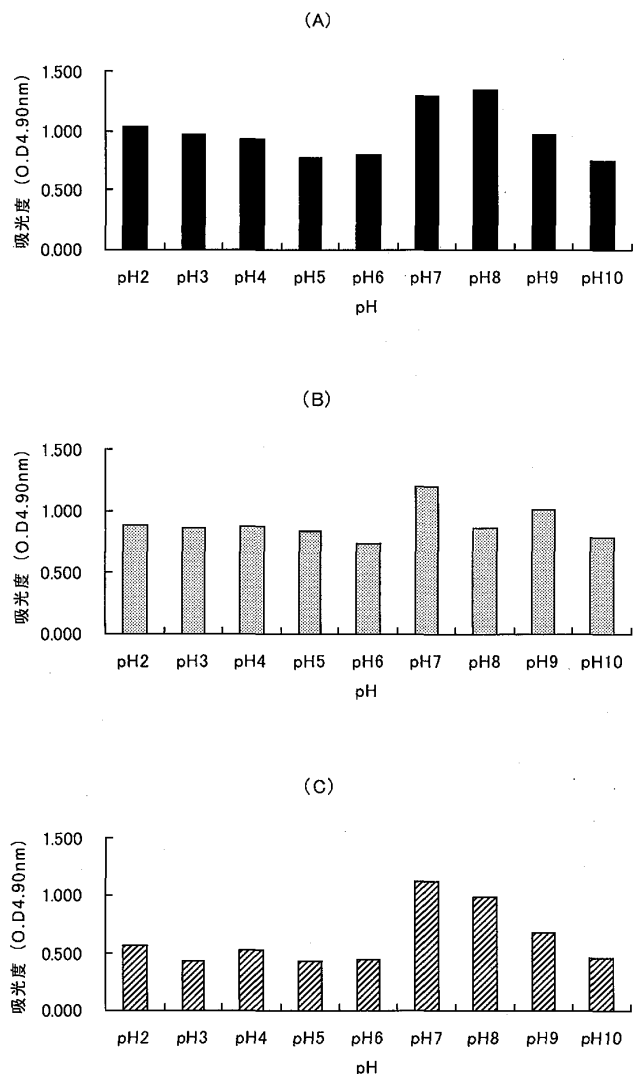


Fig. 5. マダラ III 画分の熱・pH 安定性  
(A):加熱 0 分 (B):加熱 10 分 (C):加熱 60 分  
一次抗体:mAb PV 二次抗体:anti IgG-HRP

## 考 察

タラ・ミオシンより単離されたアレルゲンは、Gad c Iと名づけられ、その分子量やアミノ酸配列からPVであることが明らかにされている。PVは魚類、両生類の筋肉中に広く分布するCa結合性タンパク質であり、3つのドメインから構成されている。従って、卵白アレルゲン・オボムコイドと類似した構造を有していると推定される<sup>14)15)16)</sup>。

本研究で分離したマダラⅠ～Ⅳ画分のうちⅠ～Ⅲ画分には、36kDaと12.3kDaのタンパク質がmAb PVによるIgG陽性反応を示した。Ⅰ～Ⅲ画分の12.3kDaは、文献からの分子量数とIgG陽性反応からPVと推定されたが、36kDaはPVより高分子量のタンパク質で陽性の免疫反応が確認されたことより、PVの重合体のタンパク質またはPVのIgG認識部位と類似した構造を有するタンパク質であると推定した。しかし、マダラ36kDaタンパク質は、PV抗体や患者血清とのIgE反応とどちらに対しても陽性であったことから、すでに報告されているPVとは異なった魚アレルゲンであると推定された。さらに、わが国の魚摂食状況から、多種類のアレルゲンの存在が考えられ、魚アレルゲンとして他国以上の複雑な問題が予測される。

次に、アレルゲンの性質は一般的に、熱、酵素処理に対して安定していると言われている<sup>17)</sup>。しかし、分離したマダラⅢ画分についてpH2～6の酸性領域で100℃に加熱すると、mAb PVに対する結合性の低下が認められ、60分で40～50%の低下を示した。また、pH7～10では、100℃で加熱してもほとんど低下を示さなかったことから、耐アルカリ性であると考えられた。

## 要 約

新鮮なマダラ(Cod)から、塩可溶性画分(Ⅰ画分、Ⅱ画分)、アルカリ可溶性画分(Ⅲ画分)、酸可溶性画分(Ⅳ画分)のアレルゲン性を確認したところ、36kDaと12.3kDaタンパク質のみにアレルゲン性を確認した。この結果から、12.3kDaタンパク質は、すでに報告されている<sup>8)9)</sup>パルプアルブミン(PV)であると推定した。しかし、魚アレルギー患者血清のIgE反応では、Ⅲ画分の36kDaのみに陽性反応が認められた。従って、本研究に供した魚アレルギー患者はPVと異なったタンパク質を原因と

したアレルギーであると推定した。また、36kDaアレルゲンは、mAb PVによる免疫反応に陽性であったことから、mAb PVと免疫交叉性を有するタンパク質であると推定した。

同様にサケ、マイワシ、サンマ、カレイのアルカリ可溶性画分(Ⅲ画分)についてmAb PV及び患者血清による免疫反応を行った。しかし、マダラⅢ画分のように明確なアレルゲンは認められなかった。

マダラⅢ画分は、酸性溶液(pH2～6)において100℃で加熱すると抗体結合性が約50%低下したが、アルカリ溶液(pH7～10)においては同条件で加熱しても大きな変化は認められなかった。従って、本アレルゲン画分はアルカリ性での加熱に対して耐性であると推定した。

## 参考文献

- 1) 海老澤元宏, 臨床栄養, **106**(4), 438-443(2005)
- 2) 朝倉洋治, 「食物アレルギー対策検討委員会:平成8年度報告」厚生省, 東京
- 3) 朝倉洋治, 「食物アレルギー対策検討委員会:平成9年度報告」厚生省, 東京
- 4) 宇理須厚雄, 徳田玲子, 名務美智子ら, アレルギー科, **10**(3), 191-195(2000)
- 5) 濱田友貴, 源河えりな, 大平倫敏ら, 食衛誌, **41**(1), 38-43(2000)
- 6) 塩見一雄, *New Food Industry*, **44**, 33-40(2002)
- 7) 塩見一雄, 日本水産学会誌, **70**(5), 806-807(2004)
- 8) Galland A.V., Dory D., Pons L. *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **706**, 63-71(1998)
- 9) Mata E, Favier C, Moneret-Vautrin DA *et al.*, *Allergy*, **49**, 442-447(1994)
- 10) 濱田友貴, 塩見一雄, 日本小児アレルギー学会誌, **15**(1), 47-53(2001)
- 11) Ishikawa, M., Nagashima, Y., Shiomi, K., *Fish. Science.*, **64**, 854-855(1998)
- 12) Laemmli U.K., *Nature*, **227**, 680-685(1970)
- 13) Towbin H., Steehelin T., Gordon J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354(1979)
- 14) Takahashi, K., Kitao, S., Tashiro, M. *et al.*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 539-601(1994)
- 15) Takahashi, K., Terada, C., Tashiro, M. *et al.*, *J. Food Biochem.*, **27**, 423-434(2003)

(儀保・鎌田・中地・一橋・大室・高橋)

- 16) 高橋享子, 鎌田陽子, 寺田慎子ら, *Bull. Mukogawa Women's Univ. Nut. Sci.*, **50**, 97-102(2002)
- 17) 中村 晋, 飯倉洋治, 最新食物アレルギー, 永井書店, 大阪, 第1版. pp.425-433(2002)