報 文

魚肉ねり製品及びスケトウダラすり身のアレルゲン性

(平成 11 年 9 月 17 日受理)

濱田 友貴* 源河 えりな* 大平 倫敬*
長島 裕二* 塩見 一雄*

Allergenicity of Fish Meat Paste Products and Surimi from Walleye Pollack

Yuki HAMADA, Erina GENKA, Michitaka OHIRA, Yuji NAGASHIMA and Kazuo SHIOMI

(Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries:
4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan)

Six kinds of fish meat paste products (kamaboko, tubular kamaboko called chikuwa, boiled kamaboko called hampen, square shaped fried kamaboko called satsuma-age, fish ball called tsumire and fish sausage) and surimi from walleye pollack were evaluated for allergenicity by ELISA using sera from two fish-sensitive patients, patient 1 recognizing parvalbumin as an allergen and patient 2 recognizing a higher-molecular-weight substance (referred to as unidentified allergen). Patient 1 serum was positive only to the extract from fish ball, which contained a large amount of unwashed sardine meat. Furthermore, parvalbumin was detected only in fish ball by both ELISA using a monoclonal antibody against carp parvalbumin and SDS-PAGE. These results suggested that fish meat paste products made of surimi from walleye pollack and/or fully washed fish meat can be served as hypoallergenic foods to fish-sensitive patients recognizing parvalbumin, since parvalbumin in fish meat can be mostly removed by washing. On the other hand, patient 2 serum reacted to all the extracts from fish meat paste products and surimi. When myofibrillar protein and myostromal protein fractions prepared from surimi were subjected to ELISA with patient 2 serum, the unidentified allergen was found in the latter fraction. SDS-PAGE, immuno-blot and amino acid analysis demonstrated that the unidentified allergen in the myostromal protein fraction is collagen.

(Received September 17, 1999)

Key words: アレルゲン allergen; パルブアルブミン parvalbumin; 魚類アレルギー fish allergy; 魚肉ねり製品 fish meat paste products; すり身 surimi; コラーゲン collagen

緒 言

近年、食物アレルギーは増加傾向にあり、致命的なケースもあることから社会問題になっている。アレルギー原因食品としては卵、牛乳、米、大豆といった農畜産物が世界的に有名で、これら食品中のアレルギー原因物質（アレルゲン）に関しては、単離同定、エピトープ解析など詳細な研究が行われてきた。更に、米などでは低アレルゲン食品が開発され、市販されている。一方、魚貝類の摂取量の多い我が国では魚貝類アレルギーも無視できない。実際、厚生省食物アレルギー対策検討委員会が平成9年度に実施した我が国における食物アレルギーの実態調査により、成人のアレルギーでは原因食品の約50%を魚貝類が占めることが明らかにされている¹⁾。

本研究で対象とする魚類のアレルゲンに関しては、まず

北欧のタラ類 *Gadus callarias* で検討され、アレルゲンとして筋形質タンパク質のパルブアルブミンが同定された^{2), 3)}。その後、サケ類 *Salmo salar*⁴⁾ 及びマアジ⁵⁾ のアレルゲンもパルブアルブミンであることが示され、魚類の主要アレルゲンはパルブアルブミンであるという結論に達していた。しかし最近、著者らがウナギとメバチのアレルゲンを5名の魚類アレルギー患者について調べたところ、主要アレルゲンは2名の患者に対しては従来どおりパルブアルブミンであるが、2名の患者に対してはパルブアルブミンとは異なる高分子成分（以下未同定アレルゲンと記す）で、残りの1名の患者に対してはパルブアルブミンと未同定アレルゲンの両者であることが判明した⁶⁾。

一方、魚類アレルゲンに関するこれまでの研究の大部分は鮮魚で行われ、加工品について検討した例はない。我が国では魚類を加工品として摂取する機会も多いので、加工品のアレルゲン性を明らかにすることは魚類アレルギー患

* 東京水産大学食品生産学科: 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

Table 1. Fish Meat Paste Products Used and Their Raw Materials

Fish meat paste product	Raw material
Kamaboko	Walleye pollack (Suketoudara)
Chikuwa (Tubular kamaboko)	Walleye pollack (Suketoudara), shark, egg white, plant protein
Hampen (Boiled kamaboko)	Walleye pollack (Suketoudara), shark, egg white, yam (Yamaimo)
Satsuma-age (Square shaped fried kamaboko)	Walleye pollack (Suketoudara), Pacific herring (Nishin), horse mackerel (Aji), croaker (Guchi)
Tsumire (Fish ball)	Sardine, shark
Fish sausage	Walleye pollack (Suketoudara), threadfin bream (Itoyori), atka mackerel (Hokke), plant protein

者に対する危険性を評価するために重要であり、また低アレルゲン化技術の開発にとっても基礎資料となる。そこで本研究では、代表的な魚類加工品であるねり製品とその主原料であるスケトウダラすり身について、パルブアルブミンと未同定アレルゲンの両者を念頭においてアレルゲン性を調べた。更にその過程ですり身中の未同定アレルゲンがコラーゲンであるという知見も得られたので、以下に併せて報告する。

実験方法

1. 試料

市販の6種魚肉ねり製品（かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつまあげ、つみれ、魚肉ソーセージ）及び東京水産大学食品加工学研究室から供与されたスケトウダラすり身（洋上すり身SA級、陸上すり身C級）を試料とした。魚肉ねり製品の主原料（原料魚のほかに、一般的にアレルギー原因食物となるものを含む）はTable 1にまとめた。各製品に共通に使われているデンプンと調味料（食塩、砂糖、アミノ酸など）、一部製品に使われている着色料などはアレルギーには関与しないので省略した。

2. 試薬及び器具

ウシ血清アルブミン (BSA) は Chemicon 社製又は Pentax 社製、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgEは Kirkegaard & Perry Laboratories 社製、ペルオキシダーゼ標識ラット抗マウスIgGは Zymed 社製、抗コイパルブアルブミンのモノクローナル抗体、*o*-フェニレンジアミン二塩酸塩及び3,3'-ジアミノベンチジンは Sigma 社製、分子量マーカーとしての Molecular weight calibration kit (MW 2,512-16,949) 及び HMW-SDS calibration kit (MW 53,000-212,000) は Pharmacia Biotech 社製を購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

ELISA用の96ウェルマイクロプレート (ELISA Plate H Type) は住友ベークライト社製、電気泳動用のゲル

Fig. 1. Scheme for the fractionation of surimi proteins

(PhastGel Gradient 10-15 及び High Density) とバッファーストリップス (PhastGel SDS Buffer Strips) 及びイムノプロット用のニトロセルロース膜 (0.2 μ m) は Pharmacia Biotech 社製を購入した。

3. 試験液の調製

1) 魚肉ねり製品及びすり身からの加熱及び非加熱抽出液の調製

各試料に3倍量の0.15 mol/L NaCl-0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてホモジナイズした。ホモジネイトを二分し、一方はそのまま冷却遠心分離 (0°C, 18,000 $\times g$, 20 分間) し、他方は加熱 (100°C, 10 分間) 後同様に冷却遠心分離し、得られた上清をそれぞれ非加熱抽出液及び加熱抽出液とした。

2) スケトウダラすり身からの筋原繊維タンパク質と筋基質タンパク質の分離

スケトウダラすり身 (洋上すり身SA級) からの筋原繊維タンパク質と筋基質タンパク質の分離は、Sato ら⁷⁾の方法に準じた。概略を Fig. 1 に示すが、抽出操作は低温室 (4°C) 又はホモジナイザーカップを氷水で冷やしながら行った。すり身 30 g に3倍量 (90 mL) の 0.6 mol/L KCl-0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてホモジナイズ後、超遠心分離 (4°C, 100,000 $\times g$, 1 時間) によって上清 A (筋原繊維タンパク質画分) と沈殿を分離した。上清 A の一部は加熱 (100°C, 10 分間) し、冷却遠心分離 (0°C, 18,000 $\times g$, 20 分間) で得られた上清を上清 B と

した。沈殿には筋基質タンパク質結合性タンパク質を除去するために 100 mL の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムを加えて 2 時間以上かくはんし、冷却遠心分離により上清と沈殿に分けた。この操作を 4 回行い、4 回分の上清を合して 1 mol/L 酢酸で中和後、蒸留水に対して十分透析した。透析内液を凍結乾燥後、90 mL の 0.6 mol/L KCl-0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、上清 C とした。一方、アルカリ抽出後の沈殿は 50 mL の蒸留水で 2 回洗浄後、90 mL の 0.5 mol/L 酢酸とともに 3 日間かくはんし、冷却遠心分離によって得られた上清を上清 D (筋基質タンパク質画分) とした。

4. 血 清

患者血清としては神奈川県立子供医療センターから供与された患者 1 (3 歳, 女性) の血清及び札幌医科大学付属病院から供与された患者 2 (19 歳, 男性) の血清を用いた。2 名の患者はいずれも魚類摂取によって即時型のアレルギー反応を示すが、ほかの食物によるアレルギーの経験はない。また、RAST 試験においても魚類抽出液に対して陽性で、魚に対する血清 IgE 含量の多い魚類アレルギー患者であると医師に診断されている。著者らも、両患者の血清は各種魚類抽出液と強い ELISA 反応を示すことを確認している⁶⁾。更に、魚類アレルギー患者にはアレルギーとしてパルブアルブミンを認識する患者とパルブアルブミンとは異なる未同定アレルギーを認識する患者がいることを著者らは認めているが⁶⁾、患者 1 は前者、患者 2 は後者に属する。なお、対照血清は、魚類を含めたすべての食物に対して、また食物以外のものに対してもアレルギー反応を示さない人から採血して調製した。これらの血清は使用するまで -20°C で保存した。

5. ELISA

ELISA は Ishikawa ら⁸⁾ の方法に準じて次のように行った。試料溶液は固相化緩衝液 (0.05 mol/L 炭酸ナトリウム緩衝液, pH 9.5) で適宜希釈した後、ELISA プレートの各ウェルに 100 μ L ずつ加えた。プレートを 37°C, 2 時間インキュベイトした後、400 μ L の洗浄液 (0.05% の Tween 20 を含むリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS): 136.9 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) で、マイクロプレートウォッシャー (Bio-Rad Laboratories 社製 1250 型) を用いて 5 回洗浄した (以下の洗浄操作はすべて同様に行った)。続いて、抗原を固相化したプレートのブロッキングのため、各ウェルに 350 μ L の 1% BSA の PBS 溶液を加えて、37°C, 2 時間インキュベイトした後、洗浄した。ここで、一次抗体となる血清を抗体希釈液 (0.1% BSA の PBS 溶液) で 1:100 に希釈して 100 μ L ずつウェルに加え、37°C, 1 時間インキュベイトした後、洗浄した。更に、二次抗体となるペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE を抗体希釈液で 1:2,500 に希釈したものを 100 μ L 加え、37°C, 1 時間インキュベイトした後、洗浄した。最後に、各ウェルに 100 μ L の基質溶液 (0.1% のフェニ

レンジアミン二塩酸塩及び 0.03% H₂O₂ を含む 0.05 mol/L リン酸-クエン酸緩衝液, pH 5.0) を加え、暗所で 37°C, 30 分間反応させた。100 μ L の 1 mol/L 硫酸添加により反応を停止させた後、各ウェルの 490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio Rad 社製 405 型) を用いて測定した。

パルブアルブミンの定量のための ELISA は、一次抗体を抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体 (1:10,000 希釈) に、二次抗体をペルオキシダーゼ標識ラット抗マウス IgG (1:1,000 希釈) に変えた以外は上述と同じ条件で行った。標準パルブアルブミンとしては、著者らが先にメバチ筋肉からアレルゲンとして単離したパルブアルブミン (*Thu o* 1.01)⁶⁾ を用いた。*Thu o* 1.01 (0.003 ~ 1 μ g/mL) を固相化した ELISA により検量線を作成し、試料で得られた吸光度を検量線に当てはめて試料中のパルブアルブミン含量を求めた。

ELISA は各試料について少なくとも 3 回行い、データはすべて平均値で示した。

6. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry ら⁹⁾ の方法に従って行った。

7. SDS-PAGE

SDS-PAGE には PhastSystem 装置 (Pharmacia Biotech 社製) を用い、泳動条件、クーマシーブリリアントブルー R-250 による染色条件及び脱色条件はすべて Phast-System の取り扱い説明書によった。泳動に先立ち、各試料を凍結乾燥後、2% SDS-1% 2-メルカプトエタノール溶液に溶解し、沸騰水浴中で 10 分間加熱して変性させた。ただし、筋基質タンパク質の場合は、3.5 mol/L 尿素-1% SDS-0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解後、そのまま泳動に供した。

8. イムノプロット

上記の方法で電気泳動を行ったタンパク質を Phast-System の取り扱い説明書に従ってニトロセルロース膜に転写した。転写されたタンパク質の検出は、一次抗体として患者 2 の血清、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgE を用いる ELISA により行った。なお、酵素反応の基質溶液には 0.05% 3,3'-ジアミノベンチジン-0.1% H₂O₂-0.05 mol/L リン酸-クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。

9. アミノ酸組成分析

アミノ酸組成分析用試料として、筋基質タンパク質画分である上清 D (Fig. 1 参照) の一部 (タンパク質として 40 μ g を含む) を凍結乾燥した。乾燥物に 0.2% 3-(2-アミノメチル) インドールを含む 4 mol/L メタンスルホン酸を 50 μ L 加え、減圧封管後、115°C において 24 時間加水分解した。反応液は 50 μ L の 3.5 mol/L 水酸化ナトリウムで中和し、更に 0.2 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 2.2) 500 μ L で希釈し、希釈液 400 μ L をアミノ酸自動分析計 (アトー社製 MLC-703 型) に供した。

Fig. 2. Analysis by ELISA of the reactivity of the crude extracts from six kinds of fish meat paste products, SA grade surimi (ship-processed frozen surimi) and C grade surimi (land-processed frozen surimi) with patient and control sera

Protein concentrations (mg/mL) of the heated extracts: kamaboko, 2.08; chikuwa, 6.44; hampen, 4.33; satsuma-age, 7.31; tsumire, 5.87; fish sausage, 10.74; SA grade surimi, 14.82; C grade surimi, 12.31. Protein concentrations (mg/mL) of the non-heated extracts: kamaboko, 0.98; chikuwa, 0.91; hampen, 1.36; satsuma-age, 1.34; tsumire, 2.01; fish sausage, 5.89; SA grade surimi, 2.09; C grade surimi, 4.41

Each crude extract was diluted 1:10 and applied to ELISA.

結 果

1. 各種ねり製品及びスケトウダラすり身のアレルゲン性

6種ねり製品及びスケトウダラすり身からの抽出液と患者血清との反応性をELISAで調べた結果をFig. 2に示した。患者血清の量に限りがあるので抽出液はすべて10倍希釈のみでELISAに供した。また、対照血清との反応はほとんど認められないので、患者血清での結果はすべて特異的な反応と判断された。パルブアルブミンは耐熱性であるので、パルブアルブミンを認識する患者1の血清との反応性は加熱抽出液のみで調べた。その結果、つみれ抽出液とは吸光度0.14とやや強い反応が認められたが、かまぼこ、はんぺん及び魚肉ソーセージの抽出液との反応は吸光度0.02程度とごくわずかで、ちくわ、さつまあげ及びすり身の抽出液との反応は陰性であった。

一方、未同定アレルゲンを認識する患者2の血清は、6種ねり製品の抽出液とは加熱、非加熱にかかわらずかなり強い反応を示し、特につみれ、さつまあげ、ちくわでの反応性は吸光度0.5~0.6と高かった。ちくわとはんぺんには卵白が、ちくわと魚肉ソーセージには植物タンパク質が

Fig. 3. SDS-PAGE of the heated extracts from six kinds of fish meat paste products and two kinds of surimi

Lanes: 1, standard proteins; 2, kamaboko; 3, chikuwa; 4, hampen; 5, satsuma-age; 6, tsumire; 7, fish sausage; 8, SA grade surimi; 9, C grade surimi

Fig. 4. Analysis by ELISA of the reactivity of supernatants A-D from SA grade surimi with patient 2 serum

Each supernatant was diluted 1:10 and applied to ELISA.

使われており (Table 1), 血清が卵白や植物タンパク質の成分と反応した可能性はある。しかし、かまぼこ、さつまあげ及びつみれのように魚肉のみを主原料とした製品の抽出液でも強い反応がみられたことから、ちくわ、はんぺん及び魚肉ソーセージでの反応も主として魚肉成分によるものと考えられる。患者2の血清とすり身抽出液の反応性は、加熱抽出液ではある程度高かったが、非加熱抽出液では明らかに低く、ねり製品での結果と違いが認められた。

抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体を一次抗体とするELISAでは、つみれ中のパルブアルブミン含量は0.4 µg/gと測定されたが、その他のねり製品及びすり身にはパルブアルブミンは検出されなかった (0.012 µg/g未満)。また、ねり製品及びすり身の加熱抽出液をSDS-PAGE分析に供したところ、つみれの場合にのみパルブアルブミンに相当する分子量約10,000のバンドが認められた (Fig. 3)。これらの結果は、パルブアルブミンをアレルゲンとして認識する患者1の血清を用いたELISAにお

Fig. 5. Analysis of the supernatant D from surimi by SDS-PAGE (a) and immuno-blot (b)
Lanes: 1 and 3, supernatant D; 2, standard proteins

いて、つみれ抽出液とのみやや強い反応がみられたという結果 (Fig. 2) とよく対応した。

2. スケトウダラすり身から分離した筋原繊維タンパク質と筋基質タンパク質のアレルゲン性

洋上すり身から Fig. 1 の方法で調製した上清 A～D について、未同定アレルゲンを認識する患者 2 の血清を用いた ELISA を行ったところ、上清 D (筋基質タンパク質画分) で最も強い反応が認められた (Fig. 4)。上清 A (筋原繊維タンパク質画分) 及びその加熱で得られた上清 B は同程度の弱い反応を示したが、上清 C の反応性はごくわずかであった。

未同定アレルゲンを含む上清 D の SDS-PAGE (Fig. 5a) では分子量 120,000 と 230,000 の 2 本のバンドが検出され、イムノブロット (Fig. 5b) でも両バンドが染色されたことからアレルゲン成分であることが判明した。魚類筋肉から Fig. 1 の方法で抽出すると上清 D にはほぼ純粋のコラーゲンが得られる⁷⁾ ことを考慮すると、分子量 120,000 の成分はコラーゲンの α 鎖、分子量 230,000 の成分は α 鎖の 2 量体である β 鎖と推定された。両成分は、クーマシーブリリアントブルー R-250 による染色では標準タンパク質の青色とは異なるやや赤っぽい色調に染色され、いわゆるメタクロマジーが観察されたが、メタクロマジーもコラーゲンの特徴であることが知られている⁷⁾。コラーゲンであることを更に確認するために、上清 D のアミノ酸組成を調べた。Table 2 に示すように、上清 D のタンパク質にはコラーゲンに特異的なヒドロキシプロリンとヒドロキシリジンが検出された。また、グリシン含量が高くシステイン及びトリプトファンを含まないというコラーゲンの一般的な特徴も認められた。スケトウダラについては、筋肉コラーゲンのアミノ酸組成は報告されていないので、真皮コラーゲンの組成¹⁰⁾ を比較のために Table 2 に並記したが、上清 D と真皮コラーゲンの組成は非常に類似していた。以上の結果より、未同定アレルゲンはコラーゲンであると推定された。

Table 2. Amino Acid Compositions of the Supernatant D from Surimi and Collagen from Skin of Walleye Pollack

Amino acid	Mol %	
	Supernatant D	Walleye pollack collagen*
Hyp	4.4	5.5
Asp	5.4	5.1
Thr	2.4	2.5
Ser	6.6	6.3
Glu	7.6	7.4
Pro	8.0	9.5
Gly	40.8	35.8
Ala	9.8	10.8
Val	1.2	1.8
Cys (half)	0	0
Met	0.7	1.6
Ile	0.8	1.1
Leu	2.1	2.0
Tyr	0.4	0.3
Phe	1.1	1.2
Hylys	0.8	0.6
Lys	2.4	2.6
His	0.7	0.8
Trp	0	0
Arg	4.7	5.1

* Cited from Kimura *et al.*¹⁰⁾

考 察

スケトウダラすり身の製造に当たっては水さらしという工程が含まれている。水さらしは、ねり製品の坐りにとって好ましくない筋形質タンパク質の除去を主な目的としているが、この工程中に筋形質タンパク質の一種であるパルブアルブミンは除かれていることが予想された。実際、パルブアルブミンを認識する患者 1 の血清を用いた ELISA では、すり身抽出液は陰性であった (Fig. 2)。また抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体を用いた ELISA 並びに SDS-PAGE 分析でもすり身にはパルブアルブミンは検出されなかった。つみれを除く魚肉ねり製品の主原料はスケトウダラすり身であるが、患者 1 の血清はこれらねり製品の抽出液とはほとんど反応しなかった。かまぼこの原料魚はスケトウダラすり身のみであるので当然の結果と言える。ちくわ、はんぺん及びさつまあげの場合にはサメやグチも添加されているが、これら魚肉は水さらし後に用いられるのでパルブアルブミンは除去されていると考えられた。魚肉ソーセージに添加されているイトヨリとホッケはミンチ肉をそのまま用いられていると予想されるが、反応がほとんどみられなかったのはスケトウダラすり身に対する添加量が少ないためと推定された。一方、つみれ抽出液の場合のみやや高い ELISA 反応がみられたが、つみれには水さらしが施されていないイワシ肉が相当量含まれており、イワシ肉に由来すると思われるパルブアルブミンが抗コイパルブアルブミンモノクローナル抗体を用いた ELISA 及び SDS-PAGE による分析で確認された。本研究結果から、パルブアルブミンをアレルゲンとする魚類アレルギー患者は、つみれのように水さらしが施されていない

い魚肉を多量に含むねり製品には注意が必要であるが、スケトウダラすり身のみ、あるいはスケトウダラすり身に十分に水さらしをした他の魚肉を加えて製造されているねり製品は摂取しても大きな危険はないと判断される。なお、魚肉の水さらし条件は業者によって異なるので、低アレルゲン食品として有望な魚肉ねり製品の安全性確保のためには、パルブアルブミンの完全除去を目指した水さらし条件の確立が望まれる。

パルブアルブミンを認識する患者にとって好ましい結果とは対照的に、未同定アレルゲンはすべての魚肉ねり製品及びすり身に含まれていた (Fig. 2)。本研究により未同定アレルゲンはコラーゲンであると推定されたが、コラーゲンは水に不溶なタンパク質であるので水さらしでは除去できなかったといえる。すり身のアレルゲンに関しては Mata ら¹¹⁾ により分子量 63,000 の筋原繊維タンパク質の存在が報告されている。しかし、Mata らが用いた患者血清はタラのパルブアルブミンと最も強く反応し、弱い反応を示した 63,000 のタンパク質がすり身に残存することを示したものであった。パルブアルブミンとは異なるタンパク質をアレルゲンとして認識する患者血清を用い、しかもそのアレルゲンがコラーゲンであることを示唆したのは本研究が最初の例である。

コラーゲンは未変性状態では水に不溶であるが、加熱などにより変性を受けると可溶化する。患者 2 の血清を用いた ELISA では、ねり製品の加熱抽出液と非加熱抽出液とでは反応性に差がみられなかったが (Fig. 2)、製品中のコラーゲンの大部分が製造工程中の加熱により変性し、抽出されやすくなったためと判断される。患者 2 の血清とすり身の非加熱抽出液や上清 A、B との弱い反応は、コラーゲン以外のマイナーアレルゲンの存在を示唆しているかもしれない。しかし、魚類コラーゲン、特にスケトウダラのような寒海性の魚類のコラーゲンは 20~30℃ 程度でも容易に変性することが知られているので¹²⁾、一部変性を受けて可溶化したコラーゲンによる反応の可能性も考えられる。この点については今後確認したい。

以上のように、魚肉ねり製品はパルブアルブミンを認識する魚類アレルギー患者にとっては低アレルゲン食品として有望であることが判明した。一方、新しい魚類アレルゲンとしてコラーゲンが示唆されたが、コラーゲンを認識する患者にとって魚肉ねり製品は安全な食品とはいえない。コラーゲンの低アレルゲン化を図るためには、コラーゲンのアレルゲンとしての性状解明、すなわちコラーゲンを構成する複数のサブユニット (スケトウダラ筋肉のコラーゲン分子は $\alpha 1 \sim 3$ の 3 種類のサブユニットで構成されている^{10), 12)} のそれぞれのアレルゲン性の検討、コラーゲン分子中の IgE 結合エピトープの解析などが今後望まれる。

謝 辞

本研究に当たり、貴重な魚類アレルギー患者の血清をご

提供いただきました神奈川県立子供医療センターの高松哲也博士、札幌医科大学付属病院の高橋裕樹博士、スケトウダラすり身を供与いただきました東京水産大学食品加工学研究室の田中宗彦教授、石崎松一郎博士、コラーゲンについて種々のご助言を賜りました生物資源化学研究室の木村茂教授、またアミノ酸組成分析を行って下さいました学習院女子大学の品川 明博士に深謝いたします。なお本研究の一部は、平成 11 年度文部省科学研究費により行われた。

文 献

- 1) 厚生省食物アレルギー対策検討委員会 (代表 飯倉洋治) “平成 9 年度報告書” 平成 10 年 3 月 31 日。
- 2) Elsayed, S., Aas, K., Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **40**, 428-438 (1971).
- 3) Elsayed, S., Bennich, H., The primary structure of allergen M from cod. *Scand. J. Immunol.*, **4**, 203-208 (1975).
- 4) Lindstrøm, C. D.-V., van Dø, T., Hordvik, I., Endresen, C., Elsayed, S., Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand. J. Immunol.*, **44**, 335-344 (1996).
- 5) Shiomi, K., Hayashi, S., Ishikawa, M., Shimakura, K., Nagashima, Y., Identification of parvalbumin as an allergen in horse mackerel muscle. *Fisheries Sci.*, **64**, 300-304 (1998).
- 6) Shiomi, K., Hamada, Y., Sekiguchi, K., Shimakura, K., Nagashima, Y., Two classes of allergens, parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel and bigeye tuna. *Fisheries Sci.*, **65**, 943-948 (1999).
- 7) Sato, K., Yoshiyama, R., Sato, M., Ikeda, S., A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 889-893 (1986).
- 8) Ishikawa, M., Shimakura, K., Nagashima, Y., Shiomi, K., Isolation and properties of allergenic proteins in the oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Sci.*, **63**, 610-614 (1997).
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 10) Kimura, S., Ohno, Y., Fish skin type I collagen: tissue-specific existence of two molecular forms, ($\alpha 1$)₂ $\alpha 2$ and $\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$, in Alaska pollack. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 409-413 (1987).
- 11) Mata, E., Favier, C., Moneret-Vautrin, D. A., Nicolas, J. P., Han Ching, Gueant, J. L., Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63-kDa protein. *Allergy*, **49**, 442-447 (1994).
- 12) Kimura, S. “Gyokairui No Saibougai Matorikkusu (The extracellular matrix of fish and marine invertebrates)”, Kimura, S. *et al.* eds., Tokyo, Kouseisyu Kouseikaku, 1997, p. 9-17. (ISBN 4-7699-0854-7)