

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00953

研究課題名（和文）食物に潜在する消費者が認識困難な甲殻類アレルギーリスク因子の同定と評価

研究課題名（英文）Risk assessment of unrecognized crustacean allergens.

研究代表者

臼井 将勝（Usui, Masakatsu）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・准教授

研究者番号：50399656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：魚類寄生甲殻類や食用昆虫など、学術的知識の応用から甲殻類アレルギー患者での交叉反応リスクが懸念されながらも実際に調査されていないものに目を向け、トロポミオシンという共通アレルギーの存在に焦点を絞って各食品やその調理品に含まれる濃度や含量を明確にするために研究を行った。その結果、魚類口腔内に寄生するウオノエ類とこれらが混入した調理品や食用昆虫等において、エビトロポミオシン様タンパク質が原材料表示義務の生じる濃度を超過して存在することを明らかにした。さらに、キダイ寄生ウオノエ類を例にLC-MS/MS分析によってトロポミオシン様タンパク質が真にトロポミオシンであることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食のグローバル化と食資源不足が同時進行する現在から未来においては、事故や事象に先行した新規・希少食材のリスク管理が必要である。本研究で明らかとなった汎甲殻類における甲殻類型トロポミオシンの存在と含有量は、寄生甲殻類や昆虫食に潜む甲殻類アレルギーリスクを科学的に裏付けとなるもので、この知見をもとに甲殻類の誤食防止や昆虫由来食材の汎用化などの未来に予測されるアレルギーリスクを軽減することが可能となると考える。食物アレルギー対策は、国民の食と健康に関わる最重要課題の一つであり続けるため、知見を増やし国民へ詳細な情報を提供することは食品研究分野が担うべき必須業務と考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated the tropomyosin concentration as a crustacean allergy risk factor, for fish parasitic crustaceans and edible insects. As a result, it was clarified that shrimp tropomyosin-like proteins exist in the fish worms that parasitize in the oral cavity of fish, their cooked products, and edible insects, and that these concentrations were higher than those required by the labeling of specific raw materials. Furthermore, LC-MS/MS analysis of a tropomyosin-like protein purified from the fish worms that parasitize in yellowback seabream proved that this protein is tropomyosin.

研究分野：食品科学

キーワード：トロポミオシン 甲殻類アレルギー 魚類寄生性甲殻類 食用昆虫 リスク管理

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エビ・カニに代表される甲殻類アレルギーは臨床型分類で特殊型の食物依存性運動誘発アナフィラキシー型に分類される危険度の高い食物アレルギーである。甲殻類アレルギー研究は症例の多さからエビを中心に行われてきた。甲殻類アレルギーの主要アレルゲンは筋肉を構成するタンパク質の一つであるトロポミオシンとされている。申請者らも、これまでにクルマエビトロポミオシンについて研究を行い、耐熱化機構とトロポミオシンの可逆性構造との関係を明らかにした。また、エビの調理や鮮度とトロポミオシン濃度の関係について調べ、加熱調理や高い鮮度ではリスク回避に有効でないことを報告してきた。なお、エビとカニを含む十脚目のトロポミオシンはアミノ酸配列の相同性がおおむね 90%以上で、高度に交叉反応を示すため一般に一括りを取り扱われる。さらに 1999 年に Reese らによってトロポミオシンが甲殻類およびゴキブリなどの昆虫を含む汎甲殻類において幅広い交叉性を示す汎アレルゲン (pan-allergen) であることが示され、無脊椎動物全体においてもその可能性が否定できない (Ref; Reese G et al, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 119, 247-258, 1999)。ゆえにトロポミオシンが原因のアレルギー患者には、より広い視野での予防対策が要求され、「魚類寄生甲殻類」「野菜付着昆虫」「食用昆虫」など様々な「食」の場面で認識困難なリスクが伴うことが予想されていた。

昆虫は現在の我が国では食物として一般的ではないが 2013 年に国際連合食料農業機関 (FAO) が発表した「食品及び飼料における昆虫類の役割に注目した報告書」から、加工食品原料として一般化する未来像が現実味を帯びてきた。ゆえに、甲殻類アレルギー患者にとっては、共通アレルゲンのトロポミオシンに対する一層の注意が必要となる可能性が高くなることが予想された。大豆加水分解物のように広く昆虫タンパク質が使用される未来に備えるためにも、甲殻類アレルギー患者の食の安全を保障できる体制 (表示と告知) づくりが必要であると考えた。

上述のように、甲殻類アレルギー患者にとっての誤食防止策は現状の原材料表示の範囲では十分とは言い難い状況であった。今日でも、認知度は低いが既に我々の食物に潜在する汎甲殻類は多く存在している。一例として魚類寄生甲殻類である等脚目のウオノエ類が挙げられる。海産魚の口腔内や鰓に寄生し一見したのみでは見落としてしまうこともある甲殻類である。申請者は 2015 年からウオノエの誤食リスクに関する予備的研究に取り組み、タイ科魚類の口腔に寄生するタイノエについて、共存した状態で加熱調理した場合では、加工品で表示義務が生じるの甲殻類トロポミオシンが含まれる可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では特定原材料表示の「えび」「かに」では対応できていない表示の穴を埋める、さらに食の多様性に対応できるアレルギーリスク管理のための基礎的および実用可能データを得ることを目的とした。エビ・カニ類以外の無脊椎動物、特に分子系統学に基づく系統樹で汎甲殻類に分類される種をエビアレルギー患者が摂食した場合では、エビトロポミオシンに類似したタンパク質を摂取することとなり、アレルギー発症のリスクがあると予想した。そこで、本研究では「汎甲殻類のトロポミオシン」をキーワードに研究を進め、摂食の可能性がある汎甲殻類 (魚類寄生性甲殻類と食用昆虫) に潜む甲殻類アレルゲンの存在とリスクを明らかにすることを目指した。得られた定量値をもとに、各食品の 1 食または 1 回の摂取に伴うエビアレルギー発症リスクを一般のエビアレルギー患者が容易に認識できる形でのリスクの評価と提示の方法を検討した。

3. 研究の方法

キダイ (*Dentex tumifrons*) 寄生ウオノエ類からアレルゲンの分離精製を行い、N 末端アミノ酸配列分析および LC-MS/MS 分析によるタンパク質同定を行った。同時に、魚類寄生甲殻類については調理時の拡散範囲や調理前の寄生甲殻類除去によるリスク解消の可能性についても検討した。誤食被害が懸念される各種汎甲殻類について、抗エビトロポミオシン抗体と交叉反応性を示すタンパク質 (エビトロポミオシン様タンパク質) の存在を確かめた。対象とした汎甲殻類は、魚類寄生性甲殻類のキダイまたはカンパチ (*Seriola dumerili*) 寄生ウオノエ類、食用昆虫のイナゴ、カイコガ、トビケラ幼虫、ハチ幼虫、さらにオオグソクムシを対象とした。魚類寄生性甲殻類では、ウオノエ類およびウオノエ類共存下での調理品について、食用昆虫では市販される甘露煮加工食品、オオグソクムシは市販の米菓を試料としてアレルゲンの抽出を試みた。ウエスタンプロット分析またはイムノクロマト分析により定性的にエビトロポミオシン様タンパク質を検出し、各サンプル抽出液中のエビトロポミオシン様タンパク質濃度の測定は、FA テスト EIA-甲殻類 II 「ニッスイ」(日水製薬株式会社、東京) を用いて、同マニュアルに沿って行い、各調理サンプル中のウオノエ類トロポミオシン濃度を算出した。リスクの評価は、指標となる加工食品としてエビ含有スナック菓子 1 本分と比較して行った。

4. 研究成果

4-1) キダイ寄生ウオノエ類からのエビトロポミオシン様タンパク質の分離精製と同定

キダイ口腔内より採取したキダイ寄生ウオノエ類 (Fig. 1) のタンパク質抽出液をイムノクロマトキットに供した結果、数 ppm を超える濃度でエビトロポミオシン様タンパク質が存在することを意味する陽性反応が確認された。同イムノクロマトキットはエビトロポミオシンに特異的に反応するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方と結合した分子を検出する

ように構成されていることから、キダイ寄生ウオノエ類にエビトロポミオシンに類似するタンパク質が存在することが強く示唆された。しかし、抗体と結合する分子の確認のみではキダイ寄生ウオノエ類におけるエビトロポミオシン様タンパク質の存在を証明するために不十分であったため、以降の実験にて詳細に検証することとした。

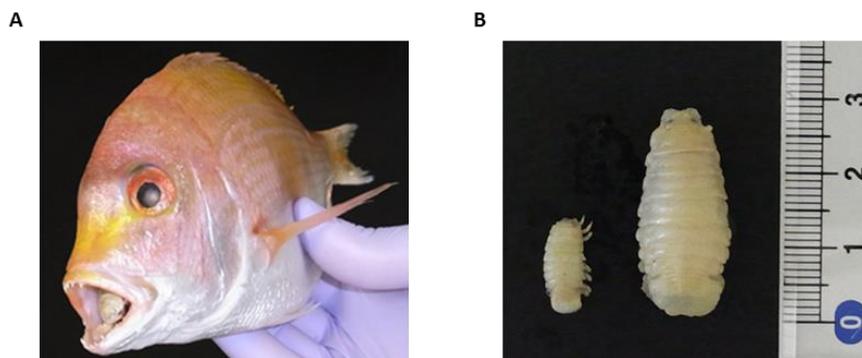


Fig. 1 Cymothoidae parasitized on yellowback seabream.

A) Yellowback seabream with parasitized cymothoidae. B) Cymothoidae removed from the oral cavity.

キダイ寄生ウオノエ類におけるエビトロポミオシン様タンパク質の存在を明確にするために、同タンパク質の分離精製を試みた。キダイ寄生ウオノエ類を煮沸したのちに凍結乾燥させてえた粉砕を原料として、1 M 塩化カリウムおよび 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に可溶性タンパク質を回収し、これを粗抽出液とした。同溶液に含まれるタンパク質組成を SDS-PAGE にて解析した結果、約 37 kDa 付近にエビトロポミオシン様タンパク質と予想される主要なバンドが確認され、ウサギ由来抗エビトロポミオシンポリクローナル抗体との結合活性を示した。粗抽出液を硫酸分画およびイオン交換クロマトグラフィーに供して、約 37 kDa の精製エビトロポミオシン様タンパク質を得た。同タンパク質のエビアレルギー患者に対する抗原性をウエスタンブロット解析にて検討した。その結果、実験に用いた 3 名分の全てでエビアレルギー患者血清中 IgE との結合が確認された (Fig. 2)。

精製した 37 kDa エビトロポミオシン様タンパク質がエビトロポミオシンと同様のアミノ酸配列を有することを確認するために、同タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を試みたが、N 末端は何らかの修飾によりブロックされており解析不能であった。そこで LC-MS/MS 分析およびデータベース検索を試みた。トリプシン消化物の LC-MS/MS 分析により、Table 1 に示した 9 種のアミノ酸配列が同定された。これらは全てクルマエビトロポミオシンのアミノ酸配列に含まれており、MASCOT Server の同定基準による同定率は 100% であった。また、これら 9 種のうち 7 種がエビトロポミオシンの IgE エピトープと重複していた。加えて、データベース検索の結果、シャコ類 (*Squilla oratoria*) およびヨコエビ類 (*Hyalella azteca*) のトロポミオシンに対しても同定率 100% となった。

これらの結果より、精製した 37 kDa エビトロポミオシン様タンパク質はキダイ寄生ウオノエ類のトロポミオシンであると結論づけた。以上の結果より、エビトロポミオシンとウオノエ類トロポミオシンは、エピトープを含むアミノ酸配列が高度に保存されており、アレルギー表示で指定された種を超えて共通するリスク因子であることが証明された。

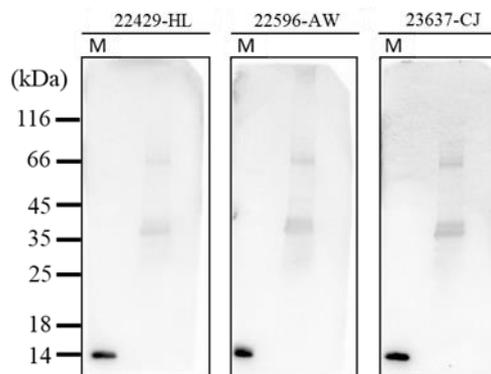


Fig. 2 Binding of shrimp allergy patient's serum IgE to purified shrimp tropomyosin-like protein.

Table 1 Sequence of identified peptides as kuruma prawn tropomyosin.

Conform sequence	Conform range (epitope)	
RIQLLEDLSEER	91-105	(+)
LAEASQAADER	113-125	(-)
SLSDEERMDALENQLK	134-149	(+)
FLAEEADRK	153-161	(+)
KLAMVEADLERAEER	168-182	(+)
IVELEEELR	190-198	(+)
SLEVSEERKANQREEAYKEQIK	206-226	(-)
EVDRLLEDLVNEK	252-264	(+)
SITDELQTFSELSGY	269-284	(+)

4-2) 調理品への魚類寄生性甲殻類混入に伴うエビアレルギーリスク

本検証の目的に沿ってキダイを次の3種に分類した。口腔内にキダイ寄生ウオノエ類が寄生していた個体をウオノエ有キダイとし、寄生していたキダイ寄生ウオノエ類を除去した個体をウオノエ除去キダイ、寄生されていない個体をウオノエ無キダイとした。

検証に用いる調理品は、一般的にあら汁または潮汁と呼ばれる調理品をモデルとして実験を行った。その結果をTable 2に示した。ウオノエ有キダイを用いて調理したキダイあら汁では、あら汁筋肉とあら汁液体の両方において、ウオノエ無キダイおよびウオノエ除去キダイのあら汁筋肉、あら汁液体に比べて高濃度のウオノエ類トロポミオシンが検出された。このことから、キダイ寄生ウオノエ類のトロポミオシンは加熱調理品によって容易に溶出・拡散することが明らかになった。しかしながら、溶出拡散した後でも、ウオノエ類トロポミオシンは2.20 ppm程度に留まり表示義務が生じる最小限度であった。ウオノエ有キダイのキダイ寄生ウオノエ類およびウオノエ除去キダイのキダイ寄生ウオノエ類においては、非常に高濃度のトロポミオシンが検出されており、エビアレルギー患者がキダイ寄生ウオノエ類そのものを摂食することには高いアレルギー発症リスクが伴うことが明確であった。キダイ寄生ウオノエ類を含まない調理サンプル（ウオノエ無キダイおよびウオノエ除去キダイのあら汁筋肉、あら汁液体）では、抗原濃度が1.00 ppm未満と微量であることから、アレルギーリスクは低いと判断した。加えて、調理前にキダイの口腔内から寄生したウオノエ類を除去することがリスク回避に有効であることが証明された。

キダイあら汁一食分（あら汁筋肉 15.00 g, あら汁液体 200.00 mL）を摂食した場合は、アレルギーの総摂取量が約491.63 µgに及ぶことが判明した。同様の方法で定量した市販のエビ含有スナック菓子に含まれるエビトロポミオシン濃度は約160 ppmであり、同スナック菓子1本（平均重量約0.50 g）を摂食した場合のエビトロポミオシン総摂取量は80.5 µgであった。上述したLC-MS/MS分析の結果から、今回定量されたエビトロポミオシン様タンパク質がエビトロポミオシンと同等の抗原性を有すると仮定される。故に、キダイあら汁一食摂食時の甲殻類アレルギーリスクは、エビ含有スナック菓子約6本分と同等であると考察した。

Table 2 Concentration of shrimp tropomyosin-like protein contained in each cooked yellowback seabream.

parasitized fish	muscle	2.20 ±	1.95 ppm (n=10)
	soup	2.29 ±	1.10 ppm (n=10)
parasite-removed fish	muscle	0.31 ±	0.32 ppm (n= 8)
	soup	0.03 ±	0.08 ppm (n= 8)
unparasitic fish	muscle	0.63 ±	0.67 ppm (n=10)
	soup	0.20 ±	0.27 ppm (n=10)
cooked parasite		6669.68 ±	1783.42 ppm (n= 8)
general shrimp snacks		160.98 ±	9.19 ppm (n= 6)

養殖魚として重要な魚種であるカンパチにおいても、高頻度に口腔内へのウオノエ類の寄生が確認されている。そこで、キダイと同様にして調理品へのウオノエ類混入に伴うエビアレルギーリスクについて検証した。カンパチは、あら汁調理されることは少なく、あら煮と呼ばれる調理品が一般的であるため同調理品をモデルとして実験を行った（Table 3）。カンパチあら煮では、ウオノエ有カンパチのあら煮液体から、他のあら煮筋肉およびあら煮液体に比べて高濃度のエビトロポミオシン様タンパク質が検出された。とはいえ、その濃度は2.00 ppm程度に留まった。ウオノエ有カンパチのあら煮液体を除く、他のあら煮筋肉、あら煮液体では、抗原濃度が1.00 ppm未満と微量であった。

Table 3 Concentration of shrimp tropomyosin-like protein contained in each cooked greater amberjack.

parasitized fish	muscle	0.35 ±	0.22 ppm (n=10)
	soup	2.00 ±	1.14 ppm (n=10)
parasite-removed fish	muscle	0.02 ±	0.03 ppm (n= 9)
	soup	0.03 ±	0.02 ppm (n= 9)
unparasitic fish	muscle	0.07 ±	0.11 ppm (n=10)
	soup	0.05 ±	0.05 ppm (n=10)
cooked parasite		12660.46 ±	2411.54 ppm (n=10)

キダイの例と同様に、エビトロポミオシン様タンパク質の一食当たりの摂取量でアレルギー発症リスクについて検討した結果、カンパチあら煮一食（あら煮筋肉 7.00 g, あら煮液体 170.00 mL）を摂食した場合は、一食当たりのエビトロポミオシン様タンパク質の総摂取量が約342.99 µgに及ぶことが判明した。前途の通り、エビ含有スナック菓子1本（平均重量約0.50 g）を摂食した場合のエビトロポミオシンの総摂取量は80.49 µgである（Table 3）。キダイの場合と同様に、

エビ含有スナック菓子を基準にすると、カンパチあら煮一食摂食時の甲殻類アレルギーリスクは、エビ含有スナック菓子約4本分に相当することが判明した。

以上の結果より、カンパチ寄生ウオノエ類においてもキダイの例と同様に、トロポミオシンは加熱調理品において溶出・拡散することが明らかとなった。被寄生魚であっても調理前にカンパチ寄生ウオノエ類を除けば調理品中のエビトロポミオシン様タンパク質を表示が必要でない濃度まで低減化できる点においても、カンパチとキダイの例で一致した。これらの事実は、ウオノエ科甲殻類の寄生は、宿主の魚類に関係なく、被寄生魚の調理品にエビアレルギーリスクを付加することを示唆していた。トロポミオシンは耐熱性アレルゲンであり、加熱調理によるアレルギーリスク軽減は不可能と予測されることから、エビアレルギー患者は被寄生魚の調理品は食べるべきではないと判断した。

4-3) その他の汎甲殻類の摂食に伴うエビアレルギーリスク

ウオノエ類以外の汎甲殻類摂食に伴うエビアレルギーリスクについて考察するために、食用昆虫4種と深海に生息するオオグソクムシを加工したオオグソクムシ含有米菓について、ウオノエ類と同様にしてエビトロポミオシン様タンパク質濃度を測定した。

食用昆虫では、全てのサンプルでアレルギー表示が必要となる10 ppmを上回るエビトロポミオシン様タンパク質が検出された(Table 4)。エビトロポミオシン様タンパク質含有量は、成虫(イナゴ)から幼虫(トビケラ, ハチ), 蛹(カイコガ)の順に高値を示し、一見すると昆虫の活動性や運動能力と比例している様に見えたが、実験対象とした食用昆虫の種類が少なく詳細は不明であった。

エビ含有スナック菓子と比較した場合では、イナゴ甘露煮1/2.5匹(約0.40 g)でエビ含有スナック菓子約1本分、カイコガ蛹5匹(4.30 g)でエビ含有スナック菓子約1本分、ハチ幼虫甘露煮4匹(約0.64 g)でエビ含有スナック菓子約1本分、トビケラ幼虫甘露煮4匹(約1.33 g)でエビ含有スナック菓子約1本分と同等のアレルギーリスク因子が含まれることになる(Table 7)。いずれの昆虫食も一般的には一回の食事において多量に摂取されるものではないと思われるが、摂取量制限を設けることは困難であるため、他の加工食品と同様にアレルゲン濃度に基づいたアレルギー情報の表示が必要であると考えた。通常、消費者は甲殻類と昆虫類は全く異なるものとして認識しており、エビアレルギー患者であっても昆虫類を摂食する可能性は否定できない。不幸なアレルギー被害を未然に防ぐためにも、消費者にエビアレルギーと汎甲殻類の関係について周知することは重要であると考えた。

Table 4 Concentration of shrimp tropomyosin-like protein contained in each soy sauce stewed insect.

grasshopper	209.26 ± 132.23 ppm (n=6)
silkworm pupa	18.86 ± 14.44 ppm (n=6)
caddis fly larva	120.34 ± 17.28 ppm (n=6)
bee larva	62.14 ± 17.98 ppm (n=6)

オオグソクムシ含有米菓から検出されたエビトロポミオシン様タンパク質の濃度は34.04 ppmであった。また、オオグソクムシ含有米菓1枚(約15.8 g)には538.9 µgのエビトロポミオシン様タンパク質が含まれることが明らかになった。これはエビ含有スナック菓子約6.7本分と同等のアレルギーリスクを伴うことから、同食品の販売・供給時にはエビアレルギー患者へ向けた正確でわかりやすいアレルギー情報の提供が必須であると考えた。

以上の結果より、十脚目以外の汎甲殻類もエビトロポミオシンに類似したタンパク質を有しており、エビアレルギー患者が摂食した場合にはアレルギー発症のリスクを伴うことが示唆された。これら汎甲殻類は食べないことが最大のアレルギー予防策であるため、消費者に潜在する汎甲殻類のアレルギーリスクについて積極的に発信していく必要がある。とはいえ、キダイやカンパチに寄生したウオノエ類のように魚を一見しただけでは判断が困難な場合があるため研究情報の発信のみでは防止困難と思われる。ゆえに、寄生例の多い魚類を販売する際には「本製品の口腔内、鰓および体表には甲殻類が共生しています」などの注意喚起表示をすることでアレルギー被害を防ぐ必要があり、昆虫加工食品についても「原材料の昆虫はエビやカニに類似したタンパク質を有しています」といった注意喚起表示の励行が欠かせないと結論づけた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 臼井将勝, 出水聡之, 窪田暉, 杉浦義正, 河邊真也, 近藤昌和, 宮崎泰幸
2. 発表標題 魚類寄生性甲殻類におけるエビアレルゲン交叉性タンパク質の分離同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井将勝, 出水聡之, 杉浦義正, 河邊真也, 近藤昌和, 宮崎泰幸
2. 発表標題 甲殻類に寄生された魚類が有するアレルギーリスク
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井将勝, 出水聡之, 窪田暉, 鈴木彩花, 河邊真也, 杉浦義正, 宮崎泰幸
2. 発表標題 等脚目甲殻類のアレルギーリスク
3. 学会等名 日本食品化学学会 第25回総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水産大学校ホームページ ニュース&トピックス「本校学生3名が学会賞を受賞」
http://www.fish-u.ac.jp/cgi-bin/ns_dtl.pl?1374

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----