

平成 23 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700752

研究課題名（和文）アレルギー食中毒の原因物質を家庭で検出・評価する方法の検討

研究課題名（英文）Detection of histamine in foods by using immunochromatography

研究代表者

新田陽子（Nitta Yoko）

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：70403318

研究成果の概要（和文）：アレルギー食中毒はヒスタミン食中毒とも呼ばれ、食品内在菌が産生するヒスタミンを多量に摂取することが原因とされている。ヒスタミンは通常の加熱によって分解されないため、多量に含まれていることが確認されたら、その食品は食べないことが最善の対策になる。本研究では、食品中に含まれるヒスタミンを、個人・家庭・飲食施設で評価するための、簡便・迅速な検出法について検討することを目的とし、イムノクロマト法によるヒスタミンの検出について検討した。

研究成果の概要（英文）：Detection of histamine in foods was examined by using immunochromatography in order to check the histamine level in foods prior to serving in the home, restaurants and other food service facilities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ヒスタミン、アレルギー食中毒、イムノクロマト

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー食中毒はヒスタミン食中毒と

も呼ばれ、食品内在菌が産生するヒスタミンを多量に摂取することが原因とされている。

ヒスタミンはアミノ酸であるヒスチジンから生成される生理活性アミンで、生体中ではアレルギー反応の化学伝達物質として知られている。ヒスタミンが多量に生成された食品を食すと、人によっては発疹や顔面の紅潮といったアレルギー様症状が現れる。赤身魚はヒスチジンを多く含むためヒスタミンが作られやすく、赤身魚によるヒスタミン食中毒が日本では大半で、毎年数件報告されている。ただし、症状が比較的軽いことから報告に至らないケースがあり、実際には高い頻度で発生していると考えられている。海外ではワインやチーズなどでヒスタミン食中毒が発生しており、HACCPを導入して加工品製造における衛生管理を徹底するなど、ヒスタミンの管理がなされている国もある。日本ではヒスタミンは検査対象とはなっていないため、行政による食品中のヒスタミン量の確認はされていない。

## 2. 研究の目的

アレルギーが深刻化するなか、アレルギー反応の化学伝達物質であるヒスタミンの摂取を少しでも減らすことは重要である。ヒスタミンは通常の加熱によって分解されないため、多量に含まれていることが確認されたら、その食品は食べないことが最善の対策になる。そのため、各家庭で食する直前に食品中のヒスタミンを検出・評価できることが望ましいと思われる。本研究では、食品中に含まれるヒスタミンを、個人・家庭・飲食施設で評価するための、簡便・迅速な検出法について開発・検討することを目的とした。本研究では保存安定性、迅速測定、判定の容易さ、特別な付属装置が不要等の様々な点で優れている、イムノクロマト法によるヒスタミンの検出について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒスタミン検出用の試験紙の試作

ヒスタミンを認識する抗体を用意し、金コロイド粒子を標識しておく。図1に示す通り、金コロイド標識抗体をパッドに取り込み乾燥させておき、ヒスタミンは膜のテストラインと呼ばれる領域に塗布・固定しておく。試験溶液をサンプルパッドに吸収させ、展開する。試験溶液中にヒスタミンが存在しない場合には、金コロイド標識抗体がテストライン上の固定化ヒスタミンに捕捉され、その結果テストラインにおいて、金コロイドの赤色の呈色が観察される。一方、試験溶液中にヒスタミンが存在する場合、金コロイド標識抗体を取り込んだパッドに浸透した時点でヒスタミン-金コロイド標識抗体複合体が形成され、テストラインにおける金コロイド標識抗体の集積が起こらないため、呈色しない。確認ラインでは、金コロイド標識抗体を補足できる抗体を塗布・固定して、試験溶液が十分浸透したことを確認できるようにしてお

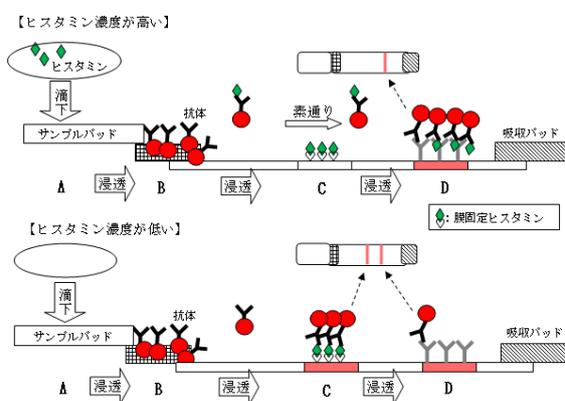


図1 イムノクロマト法によるヒスタミンの検出

- A. サンプル溶液がサンプルパッドに浸透する
- B. 金コロイド標識抗体を含むパッドにサンプル溶液が浸透して混合状態となる  
このときサンプル中のヒスタミンと金コロイド標識抗体が結合する
- C. 膜固定されたヒスタミンと金コロイド標識抗体が結合する（テストライン）  
サンプル中のヒスタミンが多ければ膜固定されたヒスタミンとは結合せず、呈色しない
- D. 金コロイド標識抗体に対する抗体によって捕捉され、呈色する（確認ライン）

く。膜として、ニトロセルロース膜を用いる。ヒスタミンに対する抗体として市販のポリクローナル抗体を用いる。

#### (2) 抗ヒスタミンモノクローナル抗体の作成

市販の抗ヒスタミンモノクローナル抗体は、ヒスタミンとタンパク質の結合体を認識するが、ヒスタミン単独を認識する抗体はなかったため、自作を試みる。ヒスタミンとヘモシアニンとをグルタルアルデヒドで結合させて、抗原タンパク質を作成し、マウスへ免疫を行う。抗体価を ELISA により確認し、抗体が産生されたらそのマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。その後クローニングを繰り返し、モノクローンを得る。目的の細胞を増殖させてその上清から抗体アイソタイプを決定し、IgG 型であれば無血清培養に切り替えて抗体精製を行う。

### 4. 研究成果

#### (1)

金コロイド標識抗体をパッドに取り込み乾燥させる前に、抗体を標識させた金コロイド溶液にメンブレンの先を浸し、毛細管現象により溶液を浸透させて、ラインが見えるかどうかを確認した。

図2に示す通り、ヒスタミンを含まない場合にはテストラインに呈色がみられた。また確認ラインにも呈色がみられた。このメンブレンを画像として取り込むことで、呈色の強度を定量することができた。

抗体を標識させた金コロイド溶液にヒスタミンを添加して同じように浸透させたところ、呈色が弱まったことから、テストラインの呈色度合いによりヒスタミン量を把握できることが示唆された。しかし、使用していた抗体が販売停止となったことや、他の市販されている抗体では同じような結果が得

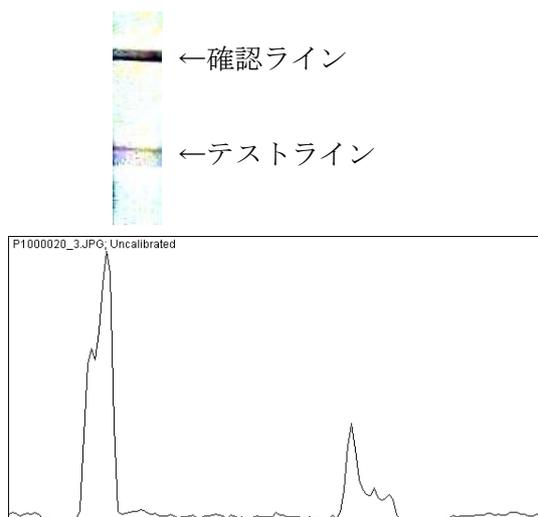


図2 試験紙の例(上)とラインの定量(下)

られなかったことから、更なる検討はできなくなった。適した抗体があればイムノクロマト法でヒスタミン検出が可能であるということが本研究で確認できた。

#### (2)

モノクローナル抗体は、抗体産生細胞を確保すれば半永久的に抗体を得ることが可能であることから、ヒスタミンを認識するモノクローナル抗体作成に取り組んだ。免疫期間が2カ月程度のマウスからは、ヒスタミンを認識する IgM 抗体が得られた。免疫期間が4か月程度のマウスからはヒスタミンを認識する IgG 抗体が得られた(図3)。

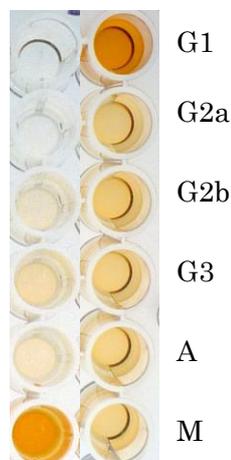


図3 アイソタイプ決定のための ELISA

IgG 抗体については精製を行い、現在ヒスタミン定量を行っている段階である。今後 ELISA において定量ができるようであればイムノクロマトに応用する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[その他]

ホームページ

<http://www.u-hyogo.ac.jp/shse/nitta/index.html>

<http://www.u-hyogo.ac.jp/shse/nitta/sub4.html>

<http://www.u-hyogo.ac.jp/shse/nitta/sub8.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新田 陽子 (NITTA YOKO)  
兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：70403318

### (2) 研究協力者

加藤 陽二 (KATO YOJI)  
兵庫県立大学・環境人間学部・准教授