



Title	植物性食物アレルギーに対する分析法開発による食品の安全性確保のための研究
Author(s)	清田, 恭平
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70706
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

植物性食物アレルギーに対する分析法開発による
食品の安全性確保のための研究

2018 年

清田恭平

目次

緒論	1
第 1 章 ミカン属果実におけるプロフィリン濃度分布の解明.....	6
第 1 節 抗 rBet v 2 抗体の作製とその反応性確認	7
第 2 節 profilin-ELISA の開発と果皮果肉別のプロフィリン定量	14
第 3 節 小括.....	20
第 2 章 オレンジの生鮮品と加工品におけるプロフィリン定量.....	21
第 1 節 抗 rCit s 2 抗体の作製とその反応性確認.....	22
第 2 節 Cit s 2-ELISA の開発と生鮮品と加工品における Cit s 2 定量	29
第 3 節 小括	40
第 3 章 調理現場におけるオレンジアレルギー衛生管理のための研究.....	41
第 1 節 orange-ELISA の開発	42
第 2 節 調理器具材における残留オレンジ果汁の評価	48
第 3 節 小括	53
総括と展望	54
謝辞	55
引用文献	56
発表論文	62
参考論文	63

緒論

我々は、健康的な食生活において、食物の摂取により体内に取り入れた栄養素を生命活動の維持に利用している¹⁾。一方、人によっては食物が原因となって抗原特異的な免疫学的機序を介して生体に不利益な症状を呈し、健康危害が発生することがある。このような現象は食物アレルギーと呼ばれ²⁾、その発症原因である食物アレルゲンには、栄養素のひとつであるタンパクが主に関与している^{3,4)}。

食物アレルギーは、症状等の特徴から [即時型症状]、[新生児・乳児消化管アレルギー]、[食物アレルギーの関与する乳児アトピー性皮膚炎]、および [特殊型] の 4 つの臨床型に分類される²⁾。従来、鶏卵や牛乳等の食物アレルギーによる即時型症状が最も典型的なタイプであり、患者数の多さや症状の重篤さから問題となっていた。これに加えて、最近、特殊型である花粉-食物アレルギー症候群 (pollen-food allergy syndrome⁵⁾、以下 PFAS) が新しいタイプの食物アレルギーとして顕在化し、問題となっている⁶⁾。

PFAS の発症機序は 2 段階に分けられる (図 1)。第 1 に、花粉アレルゲンに対する経気道感作が成立し、花粉症を罹患する段階である。第 2 に、花粉アレルゲンと類似した果物アレルゲンの経口摂取により、花粉に対する IgE 抗体が果物アレルゲンと交差反応し、症状を呈する段階である。具体的な症状は、食

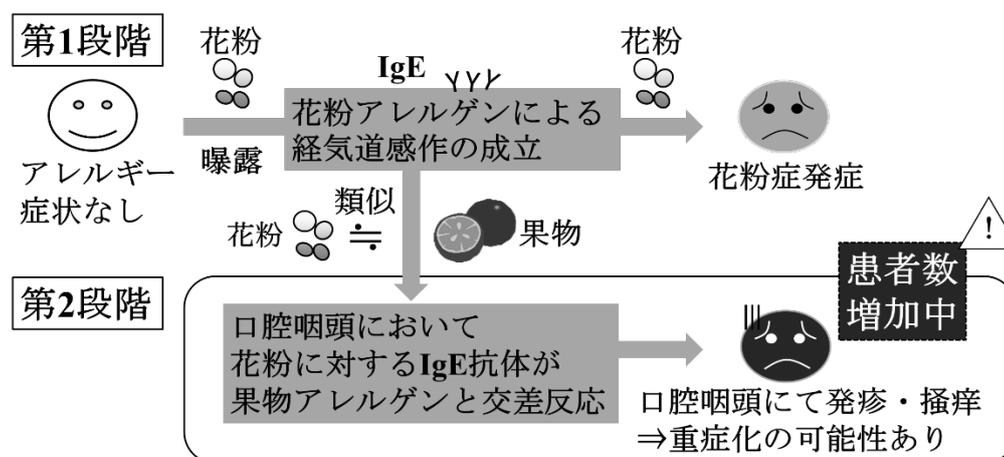


図 1. PFAS の発症について.

物摂取後 15 分以内に口腔咽頭粘膜に限局して発疹、掻痒、刺痛感等の軽症が認められ、多くは軽快するものの、アナフィラキシーショックを引き起こし重症化する可能性がある。

PFAS の代表的なアレルゲンには、感染特異的タンパクやプロフィリン等が挙げられる^{2,7)}。これらは植物間でよく保存されたタンパクであり、アミノ酸配列の共通性が高いため、患者において交差反応を引き起こす^{8,9)}。これらのアレルゲンを共通抗原として、PFAS の原因となる花粉と果物の組合せは多数存在する²⁾。具体的には、[カバノキ科 (ハンノキ属、シラカンバ属) 花粉-バラ科果物 (リンゴ、モモ)]、[イネ科花粉-オレンジ]、[キク科花粉-キウイフルーツ、バナナ] 等のような組合せが報告されている^{2, 10, 11)}。また、樹木種の植生や花粉の飛散状況、食習慣は地域によって異なるため、PFAS の罹患率や原因果物には地域差がある¹²⁾。

食物アレルギー発症防止の施策を講じるためには、食物アレルギーの患者や原因食材の実態を解明することが必要である。こうした情報を的確に得るために、我が国では 1996 年から食物アレルギーの全国調査が定期的に行われている¹³⁾。最新の全国調査¹⁴⁾によると、低年齢児においては鶏卵と牛乳のアレルギーが主であるが、成長とともに自然に耐性化してこれらのアレルギーを克服する例が多いことが示された。4-6 歳頃になると、鶏卵や牛乳に代わって果物のアレルギーを発症し始める (果物は新規発症の原因食物として第 1 位)。さらに成人年齢においては、果物アレルギーの患者数が一定数存在するようになる (果物は誤食による発症の原因食物として第 4 位)。PFAS が関連する果物アレルギーについては、国内外で 1990 年頃から報告され始めたが¹⁵⁻¹⁷⁾、現在では幅広い年齢層で PFAS 患者が存在することが知られている。PFAS は、自然に耐性化する可能性は低いと考えられており、その罹患率は花粉症の罹患期間と比例関係にある¹⁸⁾。また、花粉症患者の低年齢化が進み¹⁹⁾、花粉症の罹患期間が長期化している。これらのことから、今後、花粉症患者数の増加²⁰⁾とともに果物アレルギー患者数が増加する可能性が高い。

現在までに、食物アレルギーの根本的な治療法はないため、食物アレルギーの発症防止対策は、原因と特定された食物を除去することが中心となる³⁾。そのため、食物アレルギー患者が食品を選択する際、原因食物の有無の確認に資する情報は非常に重要である。そこで、前述の全国調査を受け、我が国では食物アレルギー発症防止の施策として、2001年から世界に先駆けて食品原材料のアレルギー表示制度を開始した(表1)³⁾。この制度では、重篤度が高く症例数の多い7品目について、内閣府令で「特定原材料」として表示義務を課している。また、一定頻度で症例の報告があった20品目について、通知で「特定原材料に準ずるもの」として表示を推奨している。

表示の信頼性を担保するためには、原材料やアレルゲンの非意図的な混入の有無の判定を可能とする何らかの分析法が必要である。特定原材料7品目については、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法、PCR法、ウェスタンブロット法から構成される公定分析法が確立され、食品企業の品質管理や行政検査等で運用されている^{22, 23)}。一方、特定原材料に準ずる品目については、公定分析法は無く、品目の見直しと追加が行われたこともあり、速やかな開発が望まれながらも多くの品目で分析法開発が途上である。特定原材料に準ずる果物5品目は、いずれもPFASの原因果物である¹¹⁾。オレンジを除く果物4品目については、ELISA法またはPCR法に基づく分析法が開発されつつあり、そのいずれかの市販試薬キットを活用して食品中の混入の有無を判定することが可能である。しかし、オレンジはバナナとリンゴに次いで生産量が多く、世界的

表1. アレルギー表示制度に関わる食品.

特定原材料 (計7品目) 表示の義務あり	卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに
特定原材料に準ずるもの (計20品目) 表示の推奨あり	オレンジ ^{a)} 、キウイフルーツ、バナナ、モモ、リンゴ、カシューナッツ、くるみ、ごま、大豆、まつたけ、やまいも、あわび、いか、いくら、さけ、さば、牛肉、鶏肉、豚肉、ゼラチン

^{a)}日本標準商品分類²¹⁾に基づき品種としてネーブルオレンジとバレンシアオレンジが指定されている

に需要の高い果物であるが²⁴⁾、オレンジについては具体的な分析法が無い。そのため、食品中のオレンジのアレルゲン量が不明で、アレルゲン混入を防止するための食品衛生学的な知見が不足していた。したがって、オレンジアレルゲン摂取量の制御が困難な状況であり、オレンジアレルギー発症防止対策が遅れていた。同様に、表1の果物だけでなく、他のPFASの原因果物^{2,11)}に関しても分析法は十分に確立されていないため、これらの分析法開発は今後発展が望まれる研究領域であると考えられる。

なお、遺伝子またはアミノ酸配列が同定されたアレルゲンは、World Health Organization/International Union of Immunological Society (WHO/IUIS) が定義した命名法²⁵⁾に基づいて国際分類されている。個々のアレルゲンは、[由来生物の属名の最初の3文字、スペース、種小名の最初の1文字、スペース、報告順のアラビア数字]という表記で、それぞれデータベース化されている²⁶⁾。このデータベースによると、現在までにネーブルオレンジ (*Citrus sinensis*) には4種類のアレルゲンが命名されている。そのひとつであるプロフィリン (分子量14,000、以下 Cit s 2) は、PFASの代表的なアレルゲンであり、かつオレンジの主要アレルゲンである²⁷⁾。

以上より本研究では、オレンジの主要アレルゲン (Cit s 2) に着目し、その分析法を開発し、Cit s 2の濃度実態と調理時のアレルゲンに対する衛生管理に役立つ情報を明らかにすることを目的とした。本分析法を用いてオレンジにおける Cit s 2の果実内濃度分布を解明できれば、オレンジアレルギー患者のアレルゲン摂取リスクの高い部位が判明し、Cit s 2の局在部位の除去により摂取リスクの回避が可能となる。また、本分析法により、調理器具材に付着したオレンジ果汁を検出できれば、調理現場におけるオレンジアレルゲンに対する衛生管理に役立つ情報が明らかになる。このような知見を積み重ねることで、患者や食生活を共にする家族の生活の質が向上すると考えられる。

本論文は、その成果をとりまとめたもので全3章から構成される。まず、第1章では、オレンジアレルギー患者にとってアレルゲン摂取リスクのより高い果実部位を見出すために、複数品種のミカン属果実に適用可能なプロフィリン

定量法を開発し、果実内のプロフィリン濃度分布を明らかにした。次に、第 2 章では、患者にとって回避すべきアレルゲン摂取リスクの高い食品を見出すために、ネーブルオレンジの生鮮品だけでなく加工品においても適用可能な Cit s 2 の高感度な定量法を開発し、Cit s 2 濃度を明らかにした。さらに、第 3 章では、調理器具を介したオレンジアレルゲンの混入を防止するために、調理現場に導入されやすい簡便で安価な残留オレンジ果汁評価法を開発し、調理器具材に付着したオレンジ果汁の残留性を明らかにした。最後に、本論文の総括と展望をまとめた。

第1章 ミカン属果実におけるプロフィリン濃度分布の解明

食物アレルギーの根本的な治療法は確立していないため、その発症を防止するためには、日常の食生活において原因食物を摂取しないことが重要である³⁾。オレンジのアレルゲンが果実の特定部位に局在するのであれば、オレンジアレルギー患者はその局在部位の除去によりアレルゲン摂取リスクを抑制することができる。したがって、果実部位別にアレルゲン濃度を調べることで、オレンジアレルギー患者がアレルゲン摂取を回避するための有用な情報が得られると考えられる。しかしながら、これまでにミカン属果実アレルゲンの分析法に関する報告は無く、果実内のアレルゲン濃度分布に関しては具体的な情報が不足していた。

オレンジの主要アレルゲンであるプロフィリンは、細胞内でアクチン重合の調節を担い、植物間でよく保存されたタンパクである⁷⁾。花粉と果物におけるプロフィリンは、アミノ酸配列の類似性がおおよそ70%–90%と高く²⁸⁾、交差反応性を有することから、PFASの代表的なアレルゲンとなっている。したがって、プロフィリンの交差反応性を利用すれば、広範囲の品種においてプロフィリンを検出することが可能である。また、近縁のミカン属果実間のプロフィリンは、アミノ酸配列の類似性が特に高いことが考えられるため、オレンジアレルギー患者の共通抗原となる可能性がある²⁹⁾。

そこで本章では、オレンジアレルギー患者にとってアレルゲン摂取リスクが高い果実部位を見出すために、複数品種のミカン属果実に適用可能なプロフィリン定量法を開発し、ミカン属果実においてプロフィリン濃度分布を明らかにすることを目的とした。

第1節では、Cit s 2のホモログタンパクであるrBet v 2に対する抗体を作製し、プロフィリンに対する抗体の反応性を確認した。第2節では、作製した2種類の抗体を組み合わせ、プロフィリン定量法（profilin-ELISA）を開発し、実試料の果実を果肉と果皮に分けてプロフィリン濃度を測定した。

第1節 抗 rBet v 2 抗体の作製とその反応性確認

ミカン属果実のプロフィリンに対する抗体は市販されていないため、研究を遂行するために抗体を新規に作製することを試みた。

リコンビナントタンパクは十分な量と純度を確保できることから、免疫抗原として合理的な材料であり、抗食物アレルギー抗体の作製でよく使用されている^{30, 31)}。そこで、Cit s 2 のホモログタンパクである、シラカバ花粉プロフィリン (Bet v 2) のリコンビナントタンパク (rBet v 2) を免疫抗原として利用することとした。Bet v 2 は PFAS の原因花粉抗原であり、オレンジアレルギー患者は、rBet v 2 に対して高い IgE 抗体価を示すことが明らかになっている³²⁾。また、Bet v 2 と Cit s 2 のアミノ酸配列の類似性は 78%^{26, 33)} と高いため、抗 Bet v 2 抗体はミカン属果実プロフィリンにも広い交差反応性を示すことが予想される。加えて、市販品として入手が可能な rBet v 2 は、抗体作製に必要な十分な量と純度を容易に確保できることから使用における利点大きい。

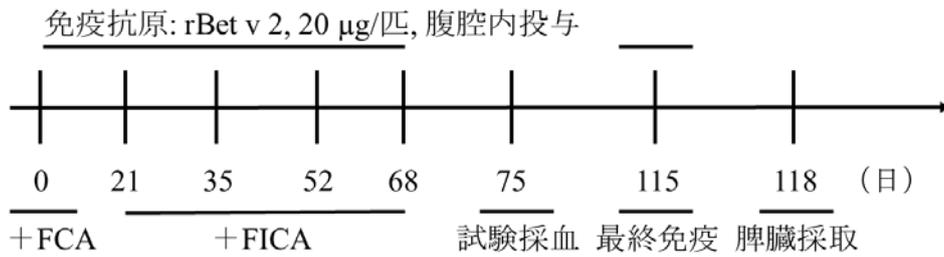
一般的に、より優れたサンドイッチ ELISA を開発するためには、異なるエピトープを持つ 2 種類以上の抗体を用意し、その組合せを多く検討することが望ましい。本節では、マウスモノクローナル抗体およびラットポリクローナル抗体の作製をそれぞれ試みた。

実験材料および方法

1. マウス 抗 rBet v 2 モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は、川津らの方法^{34, 35)}を一部改変して作製した。図 2 に示したスケジュールに従って免疫を行った。rBet v 2 (Biomay、Vienna、Austria) 溶液と Freund's complete adjuvant (FCA) (和光純薬工業、大阪) を 1:2 で混合後、免疫抗原を調製した。5 匹の BALB/c マウス (7 週齢、雌、日本 SLC、浜松) の腹腔内に、1 匹あたり 20 μ g の rBet v 2 が含まれるよう免疫抗原を接種して初回免疫を行った。次いで、rBet v 2 溶液と Freund's incomplete adjuvant (FICA) (和光純薬工業) を混合し (1:2、v/v)、初回免疫から 21、35、52、68 日後に

初回免疫と同量の rBet v 2 を腹腔内に接種し、追加免疫した。75 日後に、各マウスに産生した抗 rBet v 2 抗体量を測定するために、マウスの尾静脈から試験採血を行い、抗血清における rBet v 2 に対する抗体価を直接吸着法 ELISA により測定した。高い抗体価を示したマウスを 1 匹選定し、初回免疫から 115 日後、その腹腔内に 20 µg の rBet v 2 が含まれる PBS 溶液を注射して最終免疫した。最終免疫から 3 日後、マウスから脾臓を採取し、ClonaCell-HY Hybridoma Kit (ベリタス、東京) を用いて、回収したマウス脾細胞と P3U1 マウスミエローマ細胞を融合し、メチルセルロースの半固形培地上に展開して 37°C、5%CO₂ の条件で培養した。10 日後にコロニーを分離して、96 ウェルプレートで 8-10 日間の培養後、ハイブリドーマ細胞の培養上清における rBet v 2 への結合能について、直接吸着法 ELISA による一次スクリーニング評価を行い、クローンを選定した。24 ウェルプレートで 3 日間培養後、これらクローンの培養上清におけるオレンジ、メロン、モモ、トマト、スイカの各抽出物への結合能について、直接吸着法 ELISA による二次スクリーニング評価を行った。クローンの選定後、メチルセルロースの半固形培地に展開して再クローニングを行った。12 日後にコロニーを分離して、96 ウェルプレートで 4-5 日間、24 ウェルプレートで 3 日間それぞれ培養し、ハイブリドーマ細胞株を選定した。樹立したハイブリドーマ細胞株の懸濁液の 1 mL (細胞濃度 1×10^7 /mL) をプリスタン (フナコシ、東京) で処理した BALB/c マウス (8 週齢、雄、日本 SLC) の腹腔内に投与した。10 日後、腹水を回収し、プロテイン A カラム (Bio-Rad Laboratories、Hercules、USA) により腹水からモノクローナル抗体を精製した。精製したモノクローナル抗体 (mAb) の濃度は、Bradford 法 (Bio-Rad Laboratories) により測定した。また、抗体のアイソタイピングの同定には、モノクローナル抗体アイソタイピングキット (ロシュ・ダイアグノスティックス、東京) を用いた。以上の動物実験は、大阪府立公衆衛生研究所 (動物実験委員会) による承認後 (No. 21-10、22-11) 、その指針に従って実施した。



供試動物: BALB/c雌マウス, 7週齢

FCA: Freund's complete adjuvant

FICA: Freund's incomplete adjuvant

図 2. マウス抗 rBet v 2 モノクローナル抗体作製における免疫スケジュール.

2. ネイティブ Cit s 2 の精製

プロフィリンは、poly-L-proline と相互作用する構造を持つ^{36, 37)}。この相互作用を利用した Lopez-Torrejón らの方法²⁷⁾に従って、ネーブルオレンジからネイティブ Cit s 2 (nCit s 2) を精製した。アフィニティー精製カラムのリガンドとして、100 mg の poly-L-proline (分子量 1,000–10,000、Sigma-Aldrich、St Louis、MO、USA) を選択し、臭化シアンで活性化した 15 mL のセファロース 4B (GE Healthcare、Pittsburgh、USA) に結合させた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いてネーブルオレンジ抽出液 (1:3 w/v) を調製し、10,000 g、4°C、10 分間で遠心し、その上清をカラムに負荷した。その後、10 カラム容量の PBS、4 カラム容量の 2 mol/L 尿素 (和光純薬工業) を含む PBS の順にカラムを洗浄した。nCit s 2 は、6 mol/L 尿素を含む PBS で溶出させた。フラクション溶液を 4°C で精製水にて透析し、凍結乾燥後、-20°C で保存した。nCit s 2 の精製度は、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行い、Comassie Brilliant Blue 染色 (Bio-Rad Laboratories) により確認した。

3. ラット抗 [rBet v 2 + nCit s 2] ポリクローナル抗体の作製

またはラット抗 rBet v 2 抗体は、ブロッキング溶液で 8,000 倍、1,000 倍にそれぞれ希釈して 60 分間処理した。続いて、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) で 60 分間、またはビオチン標識ヤギ抗ラット IgG ポリクローナル抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) をそれぞれ 4,000 倍希釈して 60 分間処理した。次いで、ラット抗 rBet v 2 抗体を用いた転写膜のみストレプトアビジンペルオキシダーゼ溶液 (Vector Laboratories) で 30 分間処理した。最終的に、発色基質である 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を転写膜に添加して、バンドを発色させた。転写膜を精製水で洗浄して風乾させ、画像を取得した。各処理段階の間に転写膜を 0.1% Tween 20 TBS で 10 分間洗浄し、計 3 回洗浄した。

結果と考察

1. 作製した抗体

免疫抗原に rBet v 2 を用いて BALB/c マウスに免疫した結果、2304 クロンのハイブリドーマ細胞株が得られた (表 2)。これら細胞株から、一次スクリーニング評価により 26 クローンを選定し、さらに、二次スクリーニング評価により 3 クローン (2-1 株、3-3 株、26-4 株) を選定した。2-1 株と 3-3 株については、二次スクリーニング評価において同様の反応性を示したため、3-3 株を後続の実験で使用した。3-3 株と 26-4 株を用いて作製したマウス腹水から抗体を精製後、それぞれ mAb 3-3、mAb 26-4 とした。両者のアイソタイプは IgG₁ であった。また、2 匹のラットから得られた抗血清のうち、rBet v 2 と nCit s 2 に対する抗体価が高い方を選定し、その抗血清から抗体を精製した。以上の抗体を profilin-ELISA の構築に用いた。

2. 作製した抗体の反応性確認

ネーブルオレンジ抽出物および精製した nCit s 2 に対する mAb 3-3 とラット抗 rBet v 2 抗体のそれぞれの反応性を確認するために、rBet v 2 を陽性対照としてイムノブロットィングを行った (図 4)。その結果、いずれの抗体においても、すべてのレーンで分子量 14,000 付近に陽性対照と同等の明瞭なバンドが認められた。

表 2. マウス 抗 rBet v 2 モノクローナル抗体の作製結果について.

	細胞融合後	スクリーニング評価後		抗体精製後
		一次	二次	
ハイブリドーマの クローン数	2304	26	3	2
得られた mAb	- ^{a)}	-	-	mAb 3-3 mAb 26-4
mAb の アイソタイプ	-	-	-	すべて IgG ₁

^{a)}- : 該当なし

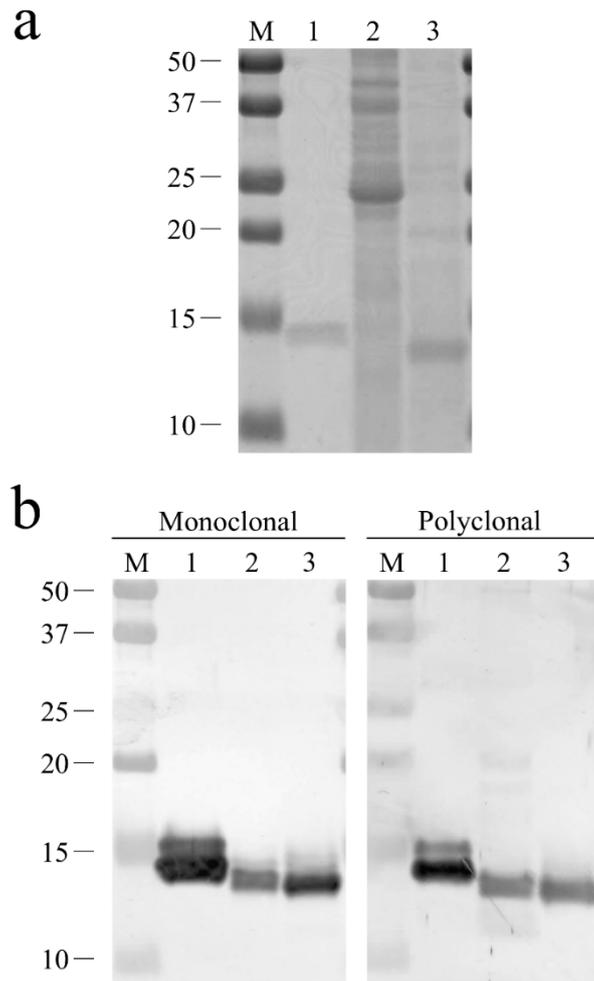


図4. Cit s 2 の検出. (a) SDS-PAGE, (b) mAb 3-3 およびラット抗 rBet v 2 抗体を用いたイムノブロッティング, 左 ; mAb 3-3, 右 ; ラット抗 rBet v 2 抗体. レーン 1, rBet v 2 ; レーン 2, ネーブルオレンジ抽出物, レーン 3, poly-L-proline アフィニティー精製 nCit s 2 ; レーン M, 分子量マーカー (分子量 $\times 10^{-3}$) .

第2節 profilin-ELISAの開発と果皮果肉別のプロフィリン定量

第1節で作製した抗 rBet v 2 抗体を用いて profilin-ELISA を構築するため、検出感度の高い捕捉抗体と検出抗体の組合せを検討して最適化した。次いで、profilin-ELISA の定量法としての分析性能を確認した後、複数品種のミカン属果実においてプロフィリンの定量を試みた。

実験材料および方法

1. profilin-ELISA の方法

ミカン属果実の果皮と果肉におけるプロフィリン濃度は、サンドイッチ ELISA を用いて測定した。底平面の 96 ウェルプレート（住友ベークライト、東京）に、炭酸緩衝液（pH 9.5）で調製した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mAb 3-3 溶液を 1 ウェルあたり 50 μL ずつ添加して 4°C で一晩、固相化した。ウェルに 20% ウマ血清（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）を含む PBS を 150 μL ずつ添加して 1 時間のブロッキング処理を行い、0.05% Tween 20 を含む PBS（PBST）で 3 回洗浄した。以後のウェルへの添加量は 50 μL とした。次いで、試料溶液と rBet v 2 標準溶液をウェルに添加して 1 時間インキュベートし、ウェルを PBST で 5 回洗浄した。0.05% Tween 20 を含むブロッキング溶液を用いてラット抗 rBet v 2 抗体を 2,000 倍希釈し、ウェルに添加して 1 時間反応させ、PBST で 5 回洗浄した。同様にビオチン標識ヤギ抗ラット IgG ポリクローナル抗体（Vector Laboratories）を 8,000 倍に希釈して、ウェルに添加して 1 時間反応させ、ウェルを PBST で 5 回洗浄した。ストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ（Vector Laboratories）を 1 時間処理後、ウェルを PBST で 8 回洗浄後、発色基質である 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（Thermo Fisher Scientific）を添加して 10 分間発色反応させた。その後、1 mol/L 硫酸を添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（SH-1200、コロナ電気株式会社、茨城）を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した。測定値には、1 試料につき 3 ウェルの平均値を用いた。検量線は、4-parameter logistic curve を使用して

作成した。プロフィリン濃度は、試料 1 g あたりのプロフィリン量 (μg) とし
て示した。

2. profilin-ELISA の性能確認

profilin-ELISA の定量法としての性能を確認するため、profilin-ELISA で陰性
反応を示したリンゴ抽出物に 100 ng/mL の rBet v 2 を添加して、 $n = 5$ で 3 日間
測定して平均添加回収率、日内および日間変動をそれぞれ算出した。また、ブ
ランク ($n = 22$) の吸光度の 10 倍を定量下限値とした。

3. 試料

大阪市内の小売店にて購入した、次のミカン属果実 13 品種の抽出物を試料と
した。ネーブルオレンジ、ブラッドオレンジ (*Citrus sinensis*)、アンコール
(*Citrus nobilis* \times *C. deliciosa*)、ミネオラオレンジ (*Citrus tangelo*)、日向夏
(*Citrus tamurana*)、不知火 [(*Citrus unshiu* \times *C. sinensis*) \times *C. reticulata*]、河
内晩柑 (*Citrus kawachiensis*)、セミノール (*Citrus* \times *tangelo* cv. *Seminole*)、温
州ミカン (*Citrus unshiu*)、レモン (*Citrus limon*)、八朔 (*Citrus hassaku*)、ホ
ワイトグレープフルーツ、ピンクグレープフルーツ (*Citrus paradisi*)。

これらの果実は水洗した後、ミキサーで破碎し、破碎物 2 g を 14 mL の抽出
液 [0.5% SDS、0.04% BSA、2% 2-mercaptoethanol、0.15M Tris-HCl および 0.04%
Tween 20 を含む溶液 (日本ハム、茨城) と PBS の 1:6 混液] でタンパクを抽出
した。抽出物は、15,000 g、4°C、10 分間で遠心して、その上清を 0.45 μm フィ
ルター (アドバンテック東洋、東京) でろ過して抽出物とした。抽出物は
-28°C で保存した。

4. 統計解析

得られたデータは、エクセルアドインソフトウェア (Statcel3、オーエムエス
出版、埼玉) を用いてウェルチの t 検定により解析した。

結果と考察

1. profilin-ELISA の開発

標準品 rBet v 2 を用いて profilin-ELISA における抗体の組合せを最適化したところ、捕捉抗体に mAb 3-3、検出抗体にラット抗 rBet v 2 抗体を用いることとした。検出感度をさらに高めるために、検出抗体に次いでビオチン標識二次抗体を使用することとし、ビオチン-HRP 標識ストレプトアビジンの相互作用を利用して定量法を構築した。

profilin-ELISA において rBet v 2 を標準品に用いたところ、0.78–400 ng/mL の範囲で検量線を作成することが可能であった ($r > 0.99$) (図 5)。定量下限値は 10.0 ng/mL であり、100 ng/mL の rBet v 2 を添加したときの平均回収率、日内および日間変動 (CV%) は、それぞれ 83%、5.5%、7.3%であった。これらの結果より、profilin-ELISA は定量法として良好な分析性能を有することを確認した。

2. ミカン属果実におけるプロフィリン定量

今回測定したミカン属果実 13 品種は、ミカン属で共通していることからプロフィリンのアミノ酸配列の類似性が高いと推測される。オレンジアレルギー患者は、これらの果実にも反応してアレルギー症状を誘発する可能性があるため^{28, 29)}、アレルギー分析法を開発し、アレルギー摂取量を制御することが必要である。profilin-ELISA は、複数品種のミカン属果実プロフィリンの濃度測定を可能とした初めての分析法である。

ネーブルオレンジ ($n = 19$) およびその他 12 品種 ($n = 3$) におけるプロフィリン濃度を果肉と果皮に分けて測定し、それぞれの結果を表 3 にまとめた。Cit s 2 濃度は、ネーブルオレンジの果肉で 0.75 $\mu\text{g/g}$ から 2.99 $\mu\text{g/g}$ (平均値 $1.81 \pm 0.74 \mu\text{g/g}$)、果皮で 0.51 $\mu\text{g/g}$ から 3.42 $\mu\text{g/g}$ (平均値 $1.19 \pm 0.87 \mu\text{g/g}$) であり、果肉の方が約 1.5 倍高かった ($p < 0.05$)。果肉濃度の方が高い傾向は、Lopez-Torrejon ら²⁷⁾の報告と一致したが、ネーブルオレンジにおける Cit s 2 の濃度分布には顕著な差は見られなかった。ネーブルオレンジ果肉中の Cit s 2 濃度は、

ニンジンのプロフィリン濃度 (1.27 $\mu\text{g/g}$ 、1.81 $\mu\text{g/g}$)³⁸⁾と同程度であり、大豆のプロフィリン濃度 (数 mg/g レベル)³⁹⁾と比較すると、1000分の1未満の濃度であった。また、Cit s 2 がネーブルオレンジの総タンパク中 (9,100 μg /生鮮重量 g)⁴⁰⁾で占める割合は約 0.02%であり、この割合はメロンの約 0.16%⁴¹⁾や様々な花粉の 0.003–0.050%⁴²⁾と同程度であったことから、今回の定量結果は妥当な結果であると考えられる。

他のミカン属果実 12 品種については、レモン、ホワイトおよびピンクグレープフルーツを除いて、果肉のプロフィリン濃度の方が約 1.5–4 倍高い傾向にあった。また、温州ミカンと八朔については、果肉と果皮のいずれも定量下限値未満であった。今回、過去の報告例⁴³⁻⁴⁵⁾のように、profilin-ELISA では測定対象のホモログタンパク (rBet v 2) を標準品に用いて検量線を作成し、ミカン属果実のプロフィリンを測定した。プロフィリンは、その細胞内での役割から常に一定量発現しているタンパクであり⁴⁶⁾、アレルギー患者血清を用いて温州ミカンにおけるプロフィリンの存在が確認されている⁴⁷⁾。したがって、温州ミカンと八朔の 2 品種が profilin-ELISA で定量下限値未満であった理由は、プロフィリンに対する抗体の結合力が特に弱かったためと考えられる。測定対象品種のアレルゲンごとに適した抗体と標準品を用いて ELISA を開発することで、より適切なプロフィリン定量が可能になると考えられる。

プロフィリンと同じく果物アレルゲンである脂質輸送タンパクは、果皮に局在しているため^{43, 48)}、果皮の除去によるアレルゲン摂取リスクの抑制が有効とされる。一方、ミカン属果実のプロフィリンは、果実部位別に顕著な濃度差は見られず果実全体に分布していることが明らかとなった。ミカン属果実は果肉と果皮のいずれも加工品として広く利用されているため、患者は生鮮品だけでなく加工品の摂取にも注意が必要と考えられる。

今回開発した profilin-ELISA の利用により、ミカン属果実においてプロフィリン低含有量の品種や部位を客観的に判断することが可能となり、オレンジアレルギー患者のアレルゲン摂取回避に貢献するものと考えられる。

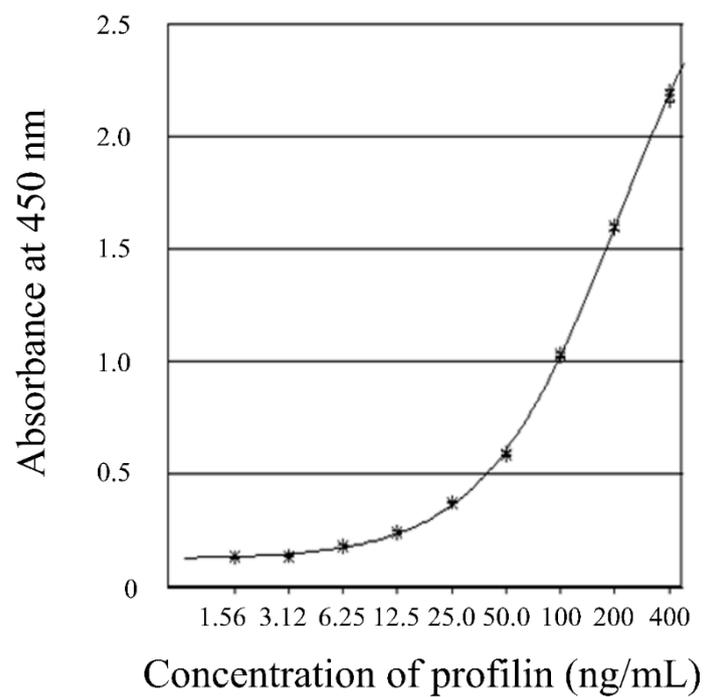


図 5. profilin-ELISA における検量線. 定量範囲 : 10.0–400 ng/mL ($r > 0.99$) .

表 3. ミカン属果実 13 品種の果肉と果皮におけるプロフィリン濃度.

品種		プロフィリン濃度 平均値 ± SD (μg/g)	
		果肉	果皮
ネーブルオレンジ	<i>Citrus sinensis</i>	1.81 ± 0.74 ^{a)}	1.19 ± 0.87 ^{b)}
アンコール	<i>Citrus nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>	3.12 ± 0.58	0.91 ± 0.89
ミネオラオレンジ	<i>Citrus tangelo</i>	2.18 ± 1.50	0.56 ± 0.35
ブラッドオレンジ	<i>Citrus sinensis</i>	2.12 ± 1.61	N.D. ^{c)}
日向夏	<i>Citrus tamurana</i>	0.99 ± 0.15	N.D.
不知火	(<i>Citrus unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	0.81 ± 0.23	0.54 ± 0.24
河内晩柑	<i>Citrus kawachiensis</i>	0.52 ± 0.04	0.28 ± 0.24
セミノール	<i>Citrus x tangelo</i> cv. <i>Seminole</i>	0.48 ± 0.07	N.D.
レモン	<i>Citrus limon</i>	N.D.	0.47 ± 0.28
温州ミカン	<i>Citrus unshiu</i>	N.D.	N.D.
ピンクグレープ フルーツ	<i>Citrus x paradisi</i>	N.D.	0.84 ± 0.24
八朔	<i>Citrus hassaku</i>	N.D.	N.D.
ホワイトグレープ フルーツ	<i>Citrus x paradisi</i>	N.D.	0.67 ± 0.13

^{a, b)} 有意差あり ($p < 0.05$, ウェルチの t 検定)

^{c)} N.D.: 定量下限値未満 (< 0.40 μg/g)

第3節 小括

第1章では、オレンジアレルギー患者のアレルゲン摂取リスクがより高い果実部位を明らかにするために、複数品種のミカン属果実に適用可能なプロフィリン定量法 **profilin-ELISA** を開発した。**profilin-ELISA** の開発では、プロフィリンの交差反応性を利用することとし、**rBet v 2** を免疫抗原としてマウスおよびラットから抗プロフィリン抗体を作製し、その組合せを最適化した。構築した **profilin-ELISA** は、定量法としての妥当性を有しており、11品種のミカン属果実に適用可能であった。**profilin-ELISA** を用いてプロフィリン濃度分布の解明を行った。

プロフィリン濃度は、ネーブルオレンジの果肉では $1.81 \pm 0.74 \mu\text{g/g}$ 、果皮では $1.19 \pm 0.87 \mu\text{g/g}$ であり、果肉が果皮より約1.5倍高かった。レモン、温州ミカン、八朔、ピンクおよびホワイトグレープフルーツを除いて、他のミカン属果実7品種においても果肉のプロフィリン濃度の方が約1.5–4倍高い傾向にあった。測定したミカン属果実11品種において、果実部位別のプロフィリン濃度に顕著な差は見られず、プロフィリンは果実全体に存在していた。そのことから、オレンジアレルギー患者は果実だけでなく、果実全体が使用される加工品の摂取にも注意する必要があると考えられる。これらの結果を受け、加工品中におけるプロフィリン濃度の実態解明について、次章の研究課題とした。

第2章 オレンジの生鮮品と加工品におけるプロフィリン定量

第 1 章より、ミカン属果実のプロフィリンは果実全体に存在していたことから、果肉と果皮のいずれも原材料とする加工品においてもプロフィリン濃度の実態解明が重要である。加工品のうち、オレンジジュースは世界中で消費量が最も多く、食生活に馴染み深い加工品である⁴⁹⁾。オレンジジュースの製造工程では、果汁の濃縮と清澄および品質保持のために加熱処理や膜透過処理等が実施されており、オレンジの総タンパク量は低下するが^{50, 51)}、アレルゲン濃度実態は不明である。したがって、ジュース等の加工品においてプロフィリン濃度を測定するためには、定量法のさらなる高感度化が必要である。第 1 章で開発した **profilin-ELISA** は、市販のオレンジ加工品に対しては感度不足であったため適用不可と判断した。この理由として、**profilin-ELISA** が抗 **rBet v 2** 抗体の交差反応を利用した方法であったこと、また **ELISA** システムの更なる高感度化が困難であったことが挙げられる。

そこで第 2 章では、加工品でよく使用され、特定原材料に準ずるものとして指定された品種であるネーブルオレンジの **Cit s 2** に着目した。高感度な **Cit s 2** 定量法 (**Cit s 2-ELISA**) を開発し、オレンジの生鮮品と加工品における **Cit s 2** 濃度を明らかにすることを目的とした。第 1 章の抗 **rBet v 2** 抗体よりも **Cit s 2** に特異的な抗体を作製すれば、**Cit s 2** の検出感度が向上した定量法開発が可能となり、オレンジ加工品中の **Cit s 2** 濃度を測定できると考えられる。

第 1 節では、ミカン属果実の塩基配列データベースを利用して、**Cit s 2** に対するリコンビナントタンパクを作製し、これを免疫抗原としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体の作製を試みた。得られた抗体の組合せを最適化し、**Cit s 2-ELISA** の構築を試みた。また、第 1 章の **profilin-ELISA** の開発時と比較して、マウスへの免疫、**ELISA** 構築および試料調製の段階を見直し、それぞれ簡略化を試みた。第 2 節では、**Cit s 2-ELISA** の定量法としての妥当性を確認した上で、ネーブルオレンジ生鮮品とオレンジ加工品において、**Cit s 2** の濃度実態を解明した。

第1節 抗 rCit s 2 抗体の作製とその反応性確認

Cit s 2 に対して第 1 章の抗 rBet v 2 抗体よりも検出感度の高い抗体を新たに作製するために、まず、免疫抗原として使用する Cit s 2 のリコンビナントタンパク (rCit s 2) の作製を試みた。rCit s 2 に SUMO (small ubiquitin-like modifier) タグを融合することで、発現タンパクの安定化と可溶化を図った。次に、マウスへの免疫では、SUMO タグが融合した rCit s 2 (rCit s 2-SUMO) を免疫抗原に用いた。後続のハイブリドーマ細胞株の選定の際に、SUMO タグに反応性を示すクローンを除外することで、抗 rCit s 2 抗体の作製を試みた。

実験材料および方法

1. rCit s 2-SUMO の発現と精製および rCit s 2 の作製

後述の抗体作製時に必要な免疫抗原として、Cit s 2 のリコンビナントタンパクを作製した。まず、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Germany) を使用して、キットの操作マニュアルに従ってネーブルオレンジから全 RNA を抽出した。次いで、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ、滋賀) を使用して、Random 6 mers と Oligo dT Primer の両プライマーを用いた逆転写反応を 37°C、15 分間行い、85°C、5 秒間の処理で逆転写酵素を失活させ、全 RNA から cDNA を得た。プライマーとして、5'-ATG TCG TGG CAA GCT TAC GTC-3' および 5'-CTA AAG ACC CTG ATC AAT GAG A-3' および酵素として KOD -Plus- Neo (東洋紡、大阪) を用いた PCR において、cDNA を鋳型 DNA として、Cit s 2 をコードする領域³³⁾を増幅した。増幅した PCR 産物 (396 bp) のアガロースゲル電気泳動後、そのゲルから PCR 産物を切り出して精製し、TA クローニングキット Target Clone™ -Plus- (東洋紡) に付属の 10×A-attachment mix を用いて PCR 産物を 60°C、30 分間処理して、その 3' 末端にデオキシアデニン (dA) を付加した。続いて、Champion™ pET SUMO Expression System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、dA 付加後の PCR 産物を TA クローニングベクターである pET-SUMO に導入した。このベクターを 42°C、30 秒間の条件で One Shot® Mach1™-T1R Competent

Cells に導入し、形質転換させた。培養後、プラスミド DNA を精製し、その DNA 配列について DNA シーケンサー (ABI 3130、Thermo Fisher Scientific) に より解析を行い、目的遺伝子の導入を確認した。その後、プラスミド DNA を 42°C、30 秒間の条件で *E.coli* BL21 (DE3) 株 (Thermo Fisher Scientific) に導入 し、形質転換させた。

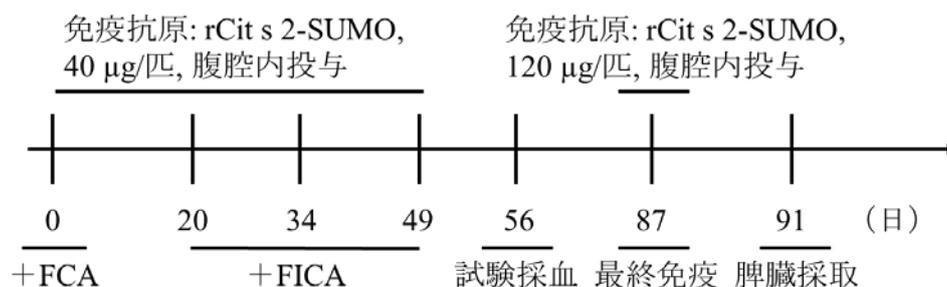
10 mL の 1% グルコースと 50 µg/mL カナマイシンを添加した LB ブロス (Becton, Dickinson and Company) に *E.coli* BL21 (DE3) 株を播種して、37°C で一晩振とう培養した。0.5 mL の培養液を 50 mL の LB ブロスに加え、37°C で振とう培養し、650 nm の吸光度が 0.4–0.6 の間になるよう培養した。その後、1 mmol/L の イソプロピル-β-d-チオガラクトピラノシド (Thermo Fisher Scientific) を添加して、rCit s 2-SUMO (His タグが付加された SUMO タグ) を発現させた。rCit s 2-SUMO の発現は、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE と抗 His-tag 抗体 (Thermo Fisher Scientific) および第 1 章で作製した mAb 3-3 をそれぞれ用いたイムノブロットティングにより確認した。次いで、HisTrap HP カラム (GE Healthcare) を使用して、操作マニュアルに従って培養上清から rCit s 2-SUMO をアフィニティー精製した。さらに、rCit s 2-SUMO を His タグ付き SUMO プロテアーゼ (Thermo Fisher Scientific) で処理して、rCit s 2-SUMO から SUMO を切断した。SUMO プロテアーゼと切断した SUMO には His タグが付いているため、両者は HisTrap HP カラムに結合する。これを利用して、SUMO プロテアーゼ処理後の溶液を負荷した HisTrap HP カラムのフロースルー液を回収し、スピンカラム (MWCO: 3500、Merck、Germany) で濃縮および PBS で緩衝液の交換を行った。mAb 3-3 を用いたイムノブロットティングでバンドを確認し、rCit s 2 を得た。rCit s 2 濃度を Bradford 法 (Bio-Rad Laboratories) で測定後、使用時まで -20°C で保存した。以上の組換え DNA 実験は、大阪府立公衆衛生研究所 (組換え DNA 実験安全管理審査部会) による承認後 (No. 1698)、その指針に従って実施した。

2. マウス抗 rCit s 2 モノクローナル抗体の作製

抗体作製では、同一の免疫抗原を複数匹マウスに複数回投与し、後続のハイブリドーマ細胞株のスクリーニング評価でも免疫抗原を使用するため、1 mg 以上の免疫抗原量が必要であった。そこで、作製したリコンビナントタンパクのうち、十分な量を確保できた rCit s 2-SUMO を選択し、これを免疫抗原として使用することとした。抗体は、第 1 章と同様に川津らの方法^{34, 35)}を一部改変して作製した。

図 6 に示したスケジュールに従って免疫を行った。rCit s 2-SUMO 溶液と FICA (和光純薬工業) を混合 (3:4, v/v) し、免疫抗原を調製した。5 匹の BALB/c マウス (8 週齢、雌、日本 SLC) の腹腔内に、1 匹あたり 40 µg の rCit s 2-SUMO が含まれるよう免疫抗原を接種して初回免疫を行った。次いで、rCit s 2-SUMO と FICA (和光純薬工業) を混合して (3:4, v/v) 、追加免疫用の免疫抗原を調製した。初回免疫から 20、34、49 日後に、それぞれ初回免疫と同量の rCit s 2-SUMO を腹腔内に接種し、追加免疫した。初回免疫から 56 日後には、マウス尾静脈から試験採血を行い、抗血清を得た。各マウスに産生した抗 rCit s 2-SUMO 抗体量を測定するために、抗血清における rCit s 2-SUMO に対する抗体価を直接吸着法 ELISA により測定した。初回免疫から 87 日後、最も高い抗体価を示したマウス 1 匹に対して、その腹腔内に 120 µg の rCit s 2-SUMO が含まれる PBS 溶液を注射し、最終免疫した。最終免疫から 4 日後、マウスから脾臓を採取し、ClonaCell-HY Hybridoma (ベリタス) を用いて、回収したマウス脾細胞と P3U1 マウスミエローマ細胞を融合し、メチルセルロースの半固形培地に展開して 37°C、5%CO₂ の条件で培養した。11 日後にコロニーを分離して、96 ウェルプレートで 6 日間の培養後、ハイブリドーマ細胞の培養上清における rCit s 2-SUMO への結合能について一次スクリーニング評価を行い、クローンを選定した。さらに 3 日間培養後、rCit s 2-SUMO、リコンビナント SUMO タグ³⁵⁾、rCit s 2、ネーブルオレンジ抽出物への結合能について直接吸着法 ELISA による二次スクリーニング評価を行った。リコンビナント SUMO タグに反応したクローンを除外し、選択したクローンをメチルセルロースの半固形培地に展開して再クローニングを行った。13 日後にコロニーを分離して、96 ウェルプレートで 4 日

間、24 ウェルプレートで3日間それぞれ培養した。その後、ハイブリドーマ細胞の培養上清における rCit s 2 およびそのホモログタンパク : rBet v 2 と rHev b 8 (リコンビナントラテックス由来プロフィリン、Biomay) への結合能について、直接吸着法 ELISA による三次スクリーニング評価を行い、ハイブリドーマ細胞株を選定した。樹立したハイブリドーマ細胞株の懸濁液 (1×10^7 /mL) をプリスタン (フナコシ) 処理した BALB/c マウス (8 週齢、雄、日本 SLC) の腹腔内に、それぞれ 1 mL 投与した。9-15 日後に腹水を回収し、プロテイン A カラム (Bio-Rad Laboratories) により腹水からモノクローナル抗体を精製した。精製したモノクローナル抗体 (mAb) は、Bradford 法 (Bio-Rad Laboratories) で濃度を測定し、アイソタイピングキット (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いてアイソタイプを同定した。また、mAb に対して、EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) を用いてビオチン標識化を行い、直接吸着法 ELISA によりビオチン標識 mAb の rCit s 2-SUMO に対する反応性を確認した。以上の動物実験は、大阪府立公衆衛生研究所 (動物実験委員会) による承認後 (No. H25-4) 、その指針に従って実施した。



供試動物: BALB/c雌マウス, 8週齢
 FCA: Freund's complete adjuvant
 FICA: Freund's incomplete adjuvant

図 6. マウス抗 rCit s 2 モノクローナル抗体作製における免疫スケジュール.

3. nCit s 2 の精製

nCit s 2 は、次の 2 種類のアフィニティーカラムを用いて生鮮のネーブルオレンジから精製した。① [poly-L-proline アフィニティー精製] 180 mg の poly-L-proline (分子量 1,000–10,000、Sigma-Aldrich) を臭化シアンで活性化した 7.5 g のセファロース 4B (GE Healthcare) に結合させたカラムを用いた。このカラムにネーブルオレンジ抽出物を負荷して、第 1 章の通り nCit s 2 を溶出させた。② [mAb アフィニティー精製] 作製したモノクローナル抗 rCit s 2 抗体 mAb 56-1 を HiTrap NHS-activated HP Column (GE Healthcare) に結合させたカラムを用いた。このカラムにネーブルオレンジ抽出物を負荷して、操作マニュアルに従って nCit s 2 を溶出させた。

①②から得たそれぞれの溶出液は、Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters (NMWL: 3,000、Merck) を用いて濃縮し、PBS で緩衝液を交換し、使用時まで -20°C で保存した。

4. タンパク定量と SDS-PAGE およびイムノブロットティング

タンパクの定量は、Bradford 法 (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。試料および分子量マーカー (Bio-Rad Laboratories) は、Mini-PROTEAN TGX Precast Any kD Gel (Bio-Rad Laboratories) を用いた SDS-PAGE にて 200V、35 分間の条件で分離した。Coomassie Brilliant Blue (Bio-Safe CBB G-250、Bio-Rad Laboratories) により、電気泳動後のゲルを染色して、バンドを可視化することで nCit s 2 の精製を確認した。SDS-PAGE の後、24V、30 分間の条件でタンパクを polyvinylidene fluoride membrane (GE Healthcare) の転写膜に転写した。続いて、ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを含む TBST) を用いて、転写膜を 1 時間ブロッキング処理した。転写膜を洗浄後、ブロッキング溶液で調製した $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の mAb を 1 時間処理した。次いで、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (1:10,000、Sigma-Aldrich) で 30 分間処理した。発色基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine peroxidase substrate solution (Kirkegaard & Perry Laboratory) を転写膜に添加して 10 分間処理した後、バンドを発色させた。

転写膜を精製水で洗浄して風乾させ、画像を取得した。各処理段階の間に、転写膜を 0.1% Tween 20 TBS で 10 分間、計 3 回の洗浄操作を行った。

結果と考察

1. 作製した抗体

本節での BALB/c マウスへの免疫では、第 1 章と比較してマウス 1 匹あたりの免疫抗原量を 20 μg から 40 μg に各回増量し、免疫回数を 5 回から 4 回に減少させた。その結果、初回免疫から脾臓採取までの期間を 3 週間短縮し、以下のように抗体作製が可能であった (表 4)。免疫抗原に rCit s 2-SUMO を用いて BALB/c マウスに免疫した結果、1536 クローンのハイブリドーマ細胞株が得られた。これら細胞株から、一次スクリーニング評価により 72 クローン、二次スクリーニング評価により 17 クローン、三次スクリーニング評価により 5 クローン (30-1 株、38-1 株、47-1 株、56-1 株、63-3 株) をそれぞれ選定した。各株からマウス腹水をそれぞれ作製し、抗体精製後 mAb 30-1、mAb 38-1、mAb 47-1、mAb 56-1、mAb 63-3 とし、そのアイソタイプはすべて IgG₁ であった。mAb とビオチン標識 mAb をそれぞれ Cit s 2-ELISA の構築に供した。

2. 作製した抗体の反応性確認

ネーブルオレンジ抽出物および精製した nCit s 2 に対する抗体の反応性を確認するために、rCit s 2 を陽性対照としてイムノブロッティングを行った (図 7)。その結果、mAb 38-1 と mAb 47-1 のいずれにおいても、すべてのレーンで分子量 14,000 付近に陽性対照と同等の明瞭なバンドが確認された。

表 4. マウス 抗 rCit s 2 モノクローナル抗体の作製結果について.

	細胞融合後	スクリーニング評価後			抗体精製後
		一次	二次	三次	
ハイブリドーマの クローン数	1536	72	17	5	5
得られた mAb	- ^{a)}	-	-	-	mAb 30-1 mAb 38-1 mAb 47-1 mAb 56-1 mAb 63-3
mAb の アイソタイプ	-	-	-	-	すべて IgG ₁

^{a)}- : 該当なし

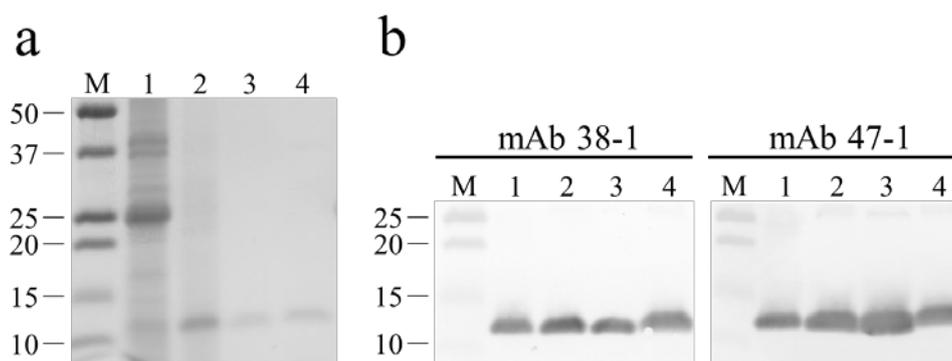


図 7. Cit s 2 の検出. (a) Coomassie Brilliant Blue 染色; (b) イムノブロッティング, mAb 38-1 (左); mAb 47-1 (右). レーン 1, ネーブルオレンジ抽出物; レーン 2, poly-L-proline アフィニティー精製 nCit s 2; レーン 3, mAb アフィニティー精製 nCit s 2; レーン 4, rCit s 2; レーン M, 分子量マーカー (分子量 $\times 10^{-3}$).

第2節 Cit s 2-ELISA の開発と生鮮品と加工品における Cit s 2 定量

Cit s 2-ELISA では、性能評価や以後の研究で使用することを考慮して、十分な量が確保された rCit s 2 を標準品に用いて検量線を作成した。標準品 rCit s 2 と測定対象物質 nCit s 2 は異なるものであるため、Cit s 2-ELISA で得た測定値を補正して nCit s 2 濃度に換算し、より適切な定量値を算出した。

実験材料と方法

1. Cit s 2-ELISA の構築

Cit s 2-ELISA を構築するために、捕捉抗体として 5 種類の mAb および検出抗体として 5 種類のビオチン標識 mAb から成る全 25 通りの抗体組合せについて検討を行った。ネーブルオレンジ、オレンジジュース、温州ミカン、ホワイトグレープフルーツ、リンゴ、メロン、トマトの PBS 抽出物（PBS で 200 倍希釈、オレンジジュースのみ 20 倍希釈）を用いてスクリーニング評価を行った。ネーブルオレンジとオレンジジュースに対する反応性と特異性に基づいて、サンドイッチ ELISA における最適な抗体組合せを選択し、Cit s 2-ELISA と命名した。

2. Cit s 2-ELISA の方法

炭酸緩衝液（15 mmol/L Na₂CO₃、35 mmol/L NaHCO₃、pH 9.6）で調製した 5 µg/mL の mAb 38-1 溶液を平底 96 穴プレート（住友ベークライト）に、1 ウェルあたり 50 µL ずつ添加し、4°C で一晩静置して抗体を固相化した。その後、抗体溶液を除去して、20% ウマ血清（Thermo Fisher Scientific）を含む PBS を 150 µL ずつ添加して、ウェルを 1 時間ブロッキング処理した。0.05% Tween 20 を含む PBS（PBST）を用いて 3 回洗浄した。ビオチン標識 mAb 47-1 溶液（1:2,000）を 1 ウェルあたり 25 µL 添加し、続いて試料または標準品 rCit s 2 溶液を等量ずつ添加し、1 時間反応させた。PBST でウェルを 5 回洗浄後、ストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ（Vector Laboratories）を 50 µL ずつ添加して、45 分間反応させた。PBST でウェルを 8 回洗浄後、発色基質である 3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine (Thermo Fisher Scientific) をウェルに 50 μ L ずつ添加して、遮光下で 10 分間発色反応させた。1 mol/L H₂SO₄ をウェルに 50 μ L ずつ添加して、発色反応を停止させた。450 nm (副波長 620 nm) における吸光度を測定し (MTP-300、コロナ電気株式会社)、SF5 ソフトウェア (コロナ電気株式会社) でデータを解析した。実験はすべて室温で行い、1つの試料につき3ウェル単位で測定した。検量線は 4-parameter logistic curve を使用して作成し、Cit s 2 濃度はオレンジの生鮮品または加工品の重量 1 g あたりの Cit s 2 量 (ng) として示した。

3. Cit s 2-ELISA の性能確認

ネーブルオレンジ抽出物またはオレンジジュースにおいて、濃度が 2.50 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL となるよう rCit s 2 をそれぞれ添加した。濃度測定は、5 日間で1日2回独立して行った。添加回収率を算出後、枝分かれ分散分析により、日内および日間変動を算出した。定量範囲の設定にあたっては、15 回の独立した実験において、変動係数 CV 値が 10%未滿かつ吸光度 0.1 以上が確保された濃度点を採用した。

4. 試料調製

すべての試料は、大阪市内の小売店で購入した。以下に示すように試料のうち、ミカン属果実は 11 品種、その他野菜果実は 11 品種であった。ミカン属果実：ネーブルオレンジ、レモン、ホワイトおよびピンクグレープフルーツ、温州ミカン、セミノール、河内晩柑、日向夏、アンコール、ブラッドオレンジ、清見オレンジ (*Citrus unshiu* × *sinensis*)。その他野菜果実：サクランボ (*Prunus avium*)、リンゴ (*Malus domestica*)、モモ (*Prunus persica*)、パイナップル (*Ananas comosus*)、キウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、セロリ (*Apium graveolens*)、トマト (*Solanum lycopersicum*)、イチゴ (*Fragaria ananassa*)、メロン (*Cucumis melo*)、パプリカ (*Capsicum annuum*)。これらの試料は、果実全体を水洗して水分を拭き取った後、ジュエ

サーで破砕処理した。破砕物 1 g に 9 mL の PBS を加え、30 分間振とう処理した。

オレンジの加工品についても生鮮品と同様に処理した。以下のオレンジ加工品を Cit s 2 濃度測定または添加回収試験に用いた。オレンジジュース 6 種類：1 種類は 100% ストレートジュース、他は濃縮還元 100% ジュースで、これらは様々な産地や品種の混合原材料であった。オレンジジャム 5 種類：ジャムには、果肉や果皮を含んでいた。原材料にネーブルオレンジを使用しているものを選択し、他にはグレープフルーツなどのミカン属果実の数種類や砂糖、酸味料等の食品添加物がそれぞれ使用されていた。オレンジシラップ漬 2 種類：ネーブルオレンジがシラップ液（レモン果汁や酒を含む）に漬け込まれたものであった。これらの試料は、ジュースサーで破砕処理し、破砕物 1 g に 9 mL の PBS を加え、30 分間振とう処理した。

振とう処理後の PBS 溶液は、15,000 g で 4°C、10 分間遠心処理し、その上清を試料抽出物とし、実験に供するまで -20°C で保存した。また、試料抽出物は、0.05% Tween 20 を含むブロッキング溶液を用いて希釈し、Cit s 2-ELISA に供した。

結果と考察

1. Cit s 2-ELISA の開発

抗体の組合せを最適化した結果、捕捉抗体に mAb 38-1 を、検出抗体にビオチン標識 mAb 47-1 をそれぞれ用いて Cit s 2-ELISA を構築した。Cit s 2-ELISA では、試料溶液とビオチン標識 mAb 47-1 溶液を同時にウェルに添加し、二次抗体処理を省略することで、profilin-ELISA と比較して操作時間を 2 時間短縮した。

rCit s 2 を標準品に用いて検量線を 15 回作成したところ、検量線の精度プロファイルは Deckwart らの報告⁵²⁾のように典型的な曲線であった（図 8）。1.25–40 ng/mL の範囲で変動係数 CV% が 10% 未満であり、吸光度を考慮して 2.5–40

ng/mL を Cit s 2-ELISA の定量範囲と設定した (図 8) 。なお、定量下限値は profilin-ELISA の 4 分の 1 であった。

本章では、過去のアレルギー定量報告³⁸⁾と比較しやすくするため、PBS を用いた振とうによる試料抽出法を採用し、第 1 章の抽出法を簡略化した。これにより Cit s 2-ELISA の定量法としての性能確認では、以下に示すように添加回収率、日内変動、日間変動の各項目において良好な結果が得られた。

5.0 ng/mL の rCit s 2 を生鮮品のネーブルオレンジおよび加工品のオレンジジュースに添加したとき、回収率は生鮮品で 88–106% (希釈倍率：100、150、200、250、400) 、加工品で 115–156% (希釈倍率：5、10、15、20、40) であった (図 9) 。いずれの希釈倍率でも試料由来マトリックスの影響を受けずに良好な回収率が得られたことから、Cit s 2-ELISA は定量法として高い真度を有していることが示された。

Cit s 2 定量においては、生鮮品では 200 倍希釈溶液、加工品では 10 倍希釈溶液を測定に供した。これらの希釈溶液に対して 2.50 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL の rCit s 2 をそれぞれ添加し、5 日間で 1 日 2 回独立して rCit s 2 濃度を測定した (表 5) 。その平均回収率を算出したところ、生鮮品では 107%–114%、加工品では 124–132% の良好な回収率が得られ、Cit s 2-ELISA の高い真度が示された。また、日内変動は 3.1–8.8%、日間変動は 4.4–11% であったことから、Cit s 2-ELISA の高い精度が示された。

次いで、ミカン属果実 10 品種および野菜果実 11 品種の計 21 品種を用いて、Cit s 2-ELISA の特異性を検証した (表 6) 。ミカン属果実 10 品種はネーブルオレンジの近縁種で、野菜果実 11 品種は WHO/IUIS²⁶⁾によりプロフィリンがアレルギーと公的認定されたものである。検証の結果、Cit s 2-ELISA は、計 18 品種の Cit s 2 のホモログタンパクには反応しなかった (500 ng/g 未満) 。一方、Cit s 2-ELISA は、ブラッドオレンジ、清見オレンジ、パプリカの 3 品種に陽性反応を示した。これら 3 品種について、捕捉抗体 mAb 38-1 と検出抗体 mAb 47-1 をそれぞれ用いたイムノブロットングを行ったところ、分子量 14,000 付近に nCit s 2 と同等のバンドが検出された。この理由として、Cit s 2 ホモログタンパ

ク（プロフィリン）はアミノ酸配列の類似性が高く³⁶⁾、mAbが交差反応したためと考えられる。特に、ブラッドオレンジはネーブルオレンジと同じオレンジ類に分類され、清見オレンジはオレンジ類とミカン類の掛け合わせたタンゴール類に分類されている。ゆえに、これら2品種のプロフィリンとCit s 2の相同性が高いことが交差反応の原因になったと考えられる。また、profilin-ELISAは、清見オレンジを除いた同ミカン属果実9品種のうち、8品種に陽性反応を示したことから（表3）、Cit s 2-ELISAでは特異性が向上した。

Cit s 2-ELISAの検量線で用いた標準品rCit s 2は、試料中のnCit s 2とは異なるものである。したがって、より適切な定量値を得るために、Cit s 2-ELISAで得た測定値を補正して、nCit s 2に換算した値を算出する必要がある。そこで、Cit s 2-ELISAにおいてrCit s 2とnCit s 2の用量-反応曲線を比較したところ、両者は重複なしの並行した曲線であり（図10）、rCit s 2とnCit s 2のmAbエピソードが同質的であると考えられた。また、両者の濃度相関性は良好（ $R^2 = 0.989$ ）であったことから（図10）、得られた濃度補正式 $y = 0.8080x - 1.6542$ を定量値の算出に利用した。

2. オレンジの生鮮品と加工品におけるCit s 2定量

ネーブルオレンジ生鮮品におけるCit s 2濃度は、1,171 ng/g から 2,152 ng/g（平均値 $1,800 \pm 430$ ng/g）であり、第1章で得られたCit s 2濃度⁵³⁾、あるいはニンジンのプロフィリン濃度³⁸⁾と同程度であった（表7）。Cit s 2-ELISAで得られた生鮮品の測定値を補正してnCit s 2換算値にすると、18,600 ng/g から 30,700 ng/g（平均値 $26,400 \pm 5,300$ ng/g）であった。一方、測定した加工品12試料のCit s 2濃度については、10試料が定量下限値未満であった。他ジュース2試料のみが定量可能でそれぞれ84 ng/g（nCit s 2換算値で1,240 ng/g）、176 ng/g（nCit s 2換算値で2,380 ng/g）で生鮮品の1/10未満であった。加工品が低濃度であった原因として、ジュースの製造工程における膜透過処理や殺菌処理によりオレンジジュースの総タンパク量が減少したことが考えられる⁵⁰⁾。さらに、加工品には、風味や保存性を保持するために他のミカン属果実をはじめ、糖類

や酸味料等の食品添加物も加えられており、それゆえ Cit s 2 濃度が希釈されたことが考えられる。

Ibanez らの報告³²⁾によると、オレンジアレルギー症状を引き起こしたオレンジ果実の摂取量は、20 g–100 gであった。このことから、Cit s 2 の摂取を原因とするオレンジアレルギーの場合、nCit s 2 濃度 26,400 ng/g を考慮すると、Cit s 2 の発症閾値は 528,000–2,640,000 ng 程度であると推測される。オレンジジュース中の最大 Cit s 2 濃度は 2,380 ng/g であり、Cit s 2 の発症閾値 528,000 ng を考慮して、次式： $528,000 \text{ (ng)} / 2,380 \text{ (ng/g)} \doteq 220 \text{ (g)}$ より、ジュースの発症閾値は約 220 g と推測される。アレルギーの発症閾値については、個人差があるため慎重な推測が求められるが、オレンジアレルギー患者はコップ 1 杯程度のジュース摂取で発症し得ることが考えられる。また、ジャムやシラップ漬けの加工品については、ジュースよりも Cit s 2 濃度が低いことから、アレルゲン摂取リスクはさらに小さいと考えられる。オレンジジュース中の Cit s 2 摂取によってアレルギーを惹起する可能性が指摘されていたが⁵⁴⁾、本研究結果はそのことを支持するものである。したがって、引き続きオレンジアレルギー患者はオレンジ加工品の摂取にも注意が必要である。

オレンジには、Cit s 2 に加えて Cit s 1 や Cit s 3 のような他のオレンジアレルゲンも存在する^{29, 54, 55)}。オレンジアレルギー患者の発症を防止するためには、他のアレルゲンについても食品中の濃度実態の解明が必要であり、今回用いた分析アプローチが有用であると考えられる。

本節で開発した Cit s 2-ELISA は、現在までに、特定原材料に準ずるオレンジに対して唯一、簡便で分析性能が高い分析法である。Cit s 2-ELISA は、食品において Cit s 2 含有量を明らかにできる有用な測定手法であり、オレンジアレルギー患者向けの食品製造において Cit s 2 含有量の管理に貢献できる。また、オレンジアレルギー等の PFAS の診断では、補助診断として prick-to-prick test、確定診断として経口負荷試験がそれぞれ行われる^{3, 32)}。診断では新鮮なオレンジやその抽出液が試験材料としてアレルゲン濃度不明のまま用いられている。より正確な診断結果を得るためには、診断に使用される試験材料のアレルゲン含

有量が標準化される必要がある。本章で開発した Cit s 2-ELISA は、その標準化に資する信頼性の高い測定手法としても役立つことが期待される。

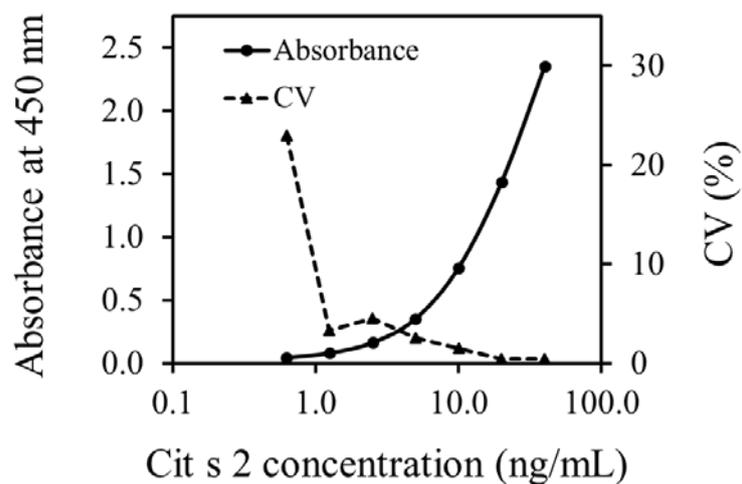


図 8. Cit s 2-ELISA における検量線（実線）とその精度プロファイル（点線）。定量範囲：2.5–40 ng/mL (CV < 10%)。

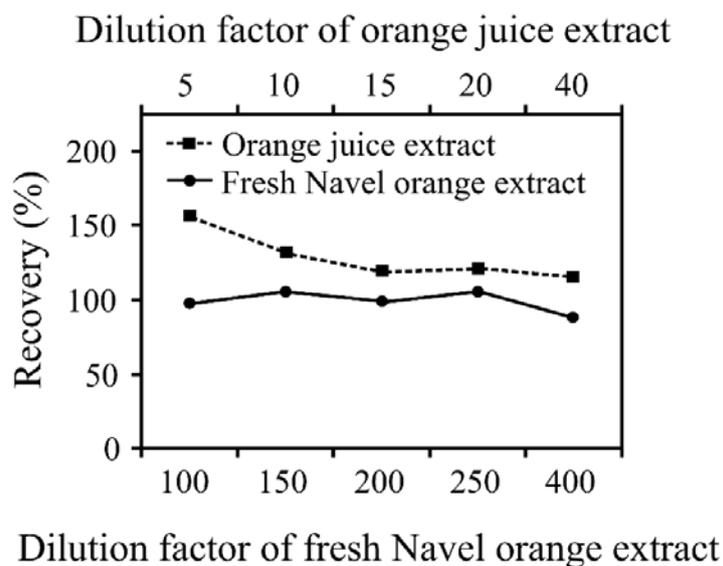


図9. Cit s 2-ELISA において 100–400 倍希釈した生鮮品（直線）および 5–40 倍希釈した加工品（点線）に 5 ng/mL の rCit s 2 を添加したときの回収率（%）。

表 5. Cit s 2-ELISA における妥当性確認.

	rCit s 2 添加濃度 (ng/mL)	平均回収率 (%) ^{a)}	変動係数 CV (%)	
			日内変動	日間変動
	0	- ^{b)}	7.7	11
ネーブルオレンジ (1:200 dilution)	2.50	107	6.0	7.9
	5.00	109	4.2	5.6
	10.0	114	3.1	5.1
	0	-	-	-
オレンジジュース (1:10 dilution)	2.50	132	8.8	9.5
	5.00	124	6.9	7.5
	10.0	125	3.1	4.4

^{a)} 5 日間で 1 日 2 回独立して実験を行ったときの平均回収率 (%)

^{b)} -: 該当値なし

表 6. Cit s 2-ELISA における特異性評価.

試料 (1:200 dilution, n = 1)			Cit s 2 濃度 (ng/g) ^{a)}	
ミカン属果実	レモン	<i>Citrus limon</i>	N.D. ^{b)}	
	ピンクグレープ フルーツ	<i>Citrus × paradisi</i>	N.D.	
	ホワイトグレープ フルーツ	<i>Citrus × paradisi</i>	N.D.	
	温州ミカン	<i>Citrus unshiu</i>	N.D.	
	セミノール	<i>Citrus × tangelo cv.</i> <i>Seminole</i>	N.D.	
	河内晩柑	<i>Citrus kawachiensis</i>	N.D.	
	日向夏	<i>Citrus tamurana</i>	N.D.	
	アンコール	<i>Citrus nobilis × C.</i> <i>deliciosa</i>	N.D.	
	ブラッドオレンジ	<i>Citrus sinensis</i>	512	
	清見オレンジ	<i>Citrus unshiu × sinensis</i>	752	
	他の果実	サクランボ	<i>Prunus avium</i>	N.D.
	および野菜	リンゴ	<i>Malus domestica</i>	N.D.
		モモ	<i>Prunus persica</i>	N.D.
パイナップル		<i>Ananas comosus</i>	N.D.	
キウイフルーツ		<i>Actinidia deliciosa</i>	N.D.	
トウモロコシ		<i>Zea mays</i>	N.D.	
セロリ		<i>Apium graveolens</i>	N.D.	
トマト		<i>Solanum lycopersicum</i>	N.D.	
イチゴ		<i>Fragaria ananassa</i>	N.D.	
メロン		<i>Cucumis melo</i>	N.D.	
パプリカ		<i>Capsicum annuum</i>	1,460	

^{a)} ブラッドオレンジを除く試料は Cit s 2 のホモログタンパク濃度である

^{b)} N.D. : 定量下限値未満 (< 500 ng/g)

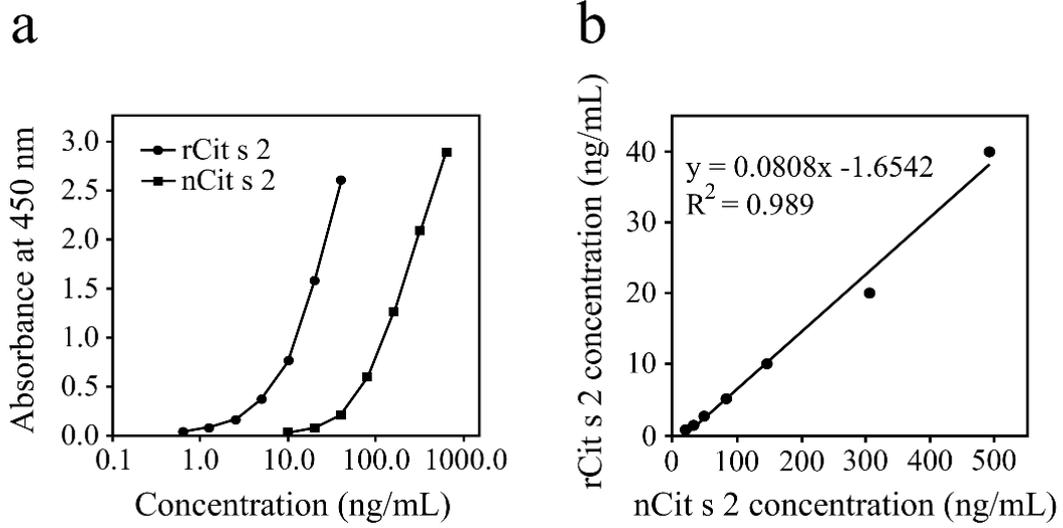


図 10. Cit s 2-ELISA における rCit s 2 と nCit s 2 の濃度相関性. rCit s 2 と mAb アフィニティー精製 nCit s 2 の (a) 用量-反応曲線と (b) 濃度相関図. 濃度補正式 : $y = 0.0808x - 1.6542$.

表 7. ネーブルオレンジ生鮮品とオレンジ加工品における Cit s 2 濃度.

試料	製品 No. ^{a)}	Cit s 2 濃度 (ng/g)	nCit s 2 換算濃度 (ng/g) ^{b)}
ネーブルオレンジ生鮮品 (1:200 dilution, <i>n</i> = 5)	-	1,800 ± 430 ^{c)}	26,400 ± 5,300
	1	N.D. ^{e)}	- ^{f)}
オレンジジュース ^{d)} (1:10 dilution, <i>n</i> = 1)	2	N.D.	-
	3	N.D.	-
	4	84	1,240
	5	176	2,380
	7A	N.D.	-
オレンジジャム (1:10 dilution, <i>n</i> = 1)	7B	N.D.	-
	7C	N.D.	-
	8	N.D.	-
	9	N.D.	-
ネーブルオレンジシラップ漬 (1:10 dilution, <i>n</i> = 1)	10	N.D.	-
	11	N.D.	-

^{a)} 数字は異なる製造者を示し，大文字アルファベットは同一製造者における異なる製品を示す

^{b)} 図 10 より得られた濃度補正式を用いて換算された濃度

^{c)} Cit s 2 濃度，平均値 ± SD

^{d)} No. 3 は 100% ストレートジュース，他は 100% 濃縮還元ジュース

^{e)} N.D. : 定量下限値未満 (< 25 ng/g)

^{f)} - : 該当値なし

第3節 小括

第2章では、ネーブルオレンジ生鮮品とオレンジ加工品における Cit s 2 濃度実態を明らかにするために、Cit s 2 の高感度な定量法 Cit s 2-ELISA を開発した。

Cit s 2-ELISA の開発では、SUMO タグを融合させた rCit s 2 を作製し、これを免疫抗原としてマウスから5種類の抗 rCit s 2 抗体を作製し、その組合せを最適化することでサンドイッチ ELISA を構築した。Cit s 2-ELISA は、Cit s 2 の定量法としての妥当性を有しており、ネイティブアレルゲンに換算した定量値の算出が可能であった。また、profilin-ELISA と比較して、操作時間を2時間短縮化し、定量下限値が4分の1で、Cit s 2 に高い特異性を示した。

Cit s 2-ELISA を用いて Cit s 2 濃度を測定したところ、ネーブルオレンジ生鮮品で $26,400 \pm 5,300$ ng/g であった。一方、オレンジ加工品12試料中、10試料で定量下限値未満、オレンジジュース2試料で生鮮品の1/10未満であった。一部の加工品においてもアレルゲン摂取リスクが存在したため、オレンジアレルギー患者は加工品にも注意が必要である。

Cit s 2-ELISA は、信頼性の高い分析法であり、食品中の Cit s 2 含有量を明らかにできる有用な測定手法である。また、Cit s 2-ELISA は、食品製造における Cit s 2 含有量の管理やアレルギー診断で使用される試験材料のアレルゲン含有量の標準化に役立つことが期待される。加えて、オレンジアレルギー患者は、Cit s 2 に加えて他のオレンジアレルゲンにも複数反応し得る。患者の発症を防止するためには、これらのアレルゲンについても濃度実態の解明が必要であり、今回用いた分析アプローチが有用であると考えられる。

第3章 調理現場におけるオレンジアレルギー衛生管理のための研究

オレンジを調理して提供する場合、まな板、果物ナイフ、皿等の調理器具や食器に果汁が付着する。付着した果汁は、調理後すぐに水で洗い流せば簡単に除去される。しかし、オレンジの果汁には多糖類であるペクチンを含み粘度が高いため⁵⁶⁾、付着後しばらく時間が経過すれば調理器具に残留し、調理器具を介して食品への混入が起こり得る。また、使用後の果物フォーク等の食器が洗浄不足であれば、その食器を介して残留果汁の摂取が起こり得る。食物アレルギー患者は、個人差はあるが微量のアレルゲン摂取でも発症し得るため⁵⁷⁾、調理現場でのオレンジアレルギーに対する衛生管理が必要である。しかし現在までに、調理現場に残留した食物アレルギーの洗浄方法に関しては報告例が少ない^{58, 59)}。特に、調理現場における果汁の残留挙動については具体的な評価法がないため、効率的な洗浄方法等の衛生管理に有用な情報が不足していた。

残留オレンジ果汁評価法の開発では、評価法の調理現場への導入のしやすさや今後の研究への波及効果を考慮して、簡便で安価に構築可能であることが望まれる。検出指標として、第1章よりオレンジの果実全体に存在することが判明したプロフィリンの利用が可能である。mAbより安価に作製できるポリクローナル抗体は、複数の認識部位を持つため陽性反応を示しやすく、検出の見逃しが少ないと期待される。また、1種類のポリクローナル抗体の交差反応を利用して、果実間で相同性の高いプロフィリンを検出できれば、様々な果実を取り扱う調理現場に適した汎用性の高い評価法の構築が期待される。

そこで第3章では、調理器具を介したオレンジアレルギーの混入を防止するために、プロフィリンを検出指標として残留オレンジ果汁評価法を開発し、調理器具に付着したオレンジ果汁の残留性を明らかにすることを目的とした。

残留オレンジ果汁評価法は、オレンジ果汁定量法 (orange-ELISA) と拭き取り試験から構成される。第1節では、第2章で使用した rCit s 2-SUMO を免疫抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製し、その反応性を確認した。次いで、この抗体を用いて orange-ELISA を構築した。

実際の調理現場においては、調理器具に付着するオレンジ果汁量の制御が難しいため、科学的に残留性を評価することは難しい。第 2 節では、実験室規模において調理現場を模した拭き取り試験を実施した。拭き取り試験では、調理器具材にオレンジ果汁の一定量を付着させ、回収した拭き取り液を orange-ELISA に供してオレンジ果汁の残留性を評価した。

第1節 orange-ELISA の開発

本節では、現場への導入しやすさを考慮して、安価に大量の抗体作製が可能なポリクローナル抗体を選択し、簡便なオレンジ果汁定量法 (orange-ELISA) の開発を試みた。

実験材料および方法

1. ウサギ抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体の作製

orange-ELISA を構築するために、第 2 章で作製した rCit s 2-SUMO を免疫抗原として、ウサギ抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体の作製を行った。図 11 に示したスケジュールに従って免疫を行った。日本白色種ウサギ 1 羽 (6 か月齢、雄) に、FCA と混合した 0.2 mg の rCit s 2-SUMO を 2 週間ごとに計 4 回注射した。初回免疫から 49 日後に全血を採取し、得られた抗血清において Cit s 2 に対する抗体価を直接吸着法 ELISA により測定し、抗体の産生を確認した。ここまでの操作をジャパン・バイオシーラム (広島) に委託した。次いで、第 1 章および第 2 章のモノクローナル抗体作製と同様に、得られた抗血清からプロテイン A カラム (Bio-Rad Laboratories) を用いて抗体を精製し、ポリクローナル抗体を得た。抗体濃度は Bradford 法により測定し、小分けして -80°C で保存した。

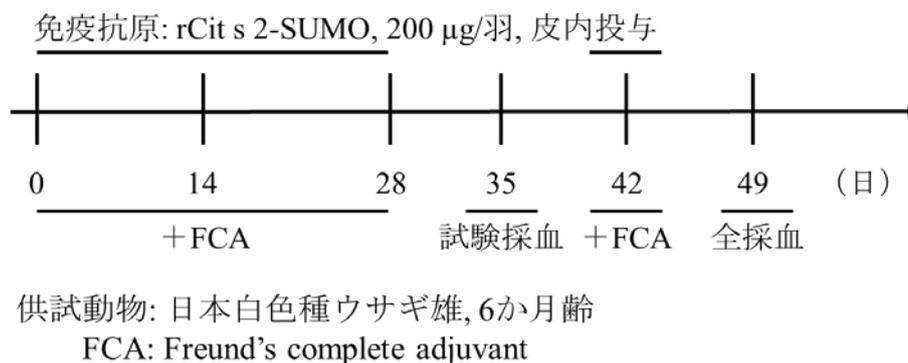


図 11. ウサギ抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体作製における免疫スケジュール.

2. 試料調製

ネーブルオレンジは大阪市内の小売店で購入した。ネーブルオレンジの果皮と種子を除去して果肉を破碎後、15,000 g で 4°C、10 分間遠心して -28°C で保存した。遠心上清は、後述の調理器具材への拭き取り試験の滴下試料として使用した。また、同遠心上清を PBS で希釈して 100 mg/mL の標準品を調製し、orange-ELISA における検量線の作成に使用した。

3. nCit s 2 の精製

作製したポリクローナル抗体は、rCit s 2-SUMO に対する抗体であったため、nCit s 2 に対する抗体の反応性を確認する必要がある。そこで、第 2 章と同じ方法により、生鮮のネーブルオレンジから poly-L-proline アフィニティーカラムを用いて nCit s 2 を精製し、使用時まで -20°C で保存した。これを後続のイムノブロットティングに供した。

4. SDS-PAGE およびイムノブロットティング

抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体の反応性を確認するため、免疫抗原である rCit s 2-SUMO と rCit s 2 を陽性対照として、poly-L-proline アフィニティー精製 nCit s 2 とネーブルオレンジ抽出物中の nCit s 2 に対する反応性をイムノブロッ

ッティングで確認した。rCit s 2-SUMO、rCit s 2、poly-L-proline アフィニティー精製 nCit s 2、ネーブルオレンジ抽出物、分子量マーカー (Bio-Rad Laboratories) は、NuPAGE™ Novex™ 12% Bis-Tris protein gels (Thermo Fisher Scientific) を用いた SDS-PAGE で分離した。200V、35 分間の電気泳動後、一方の SDS-PAGE のゲルは Coomassie Brilliant Blue 染色 (Bio-Rad Laboratories) を行い、他方の SDS-PAGE のゲルは、iBlot® western blotting system (Thermo Fisher Scientific) を用いて処理し、polyvinylidene fluoride membrane (Thermo Fisher Scientific) の転写膜にタンパクを転写した。その後、ブロッキング溶液 [0.1% Tween 20 を含む TBS (TBST) に 0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) を添加した溶液] を用いて、転写膜のブロッキング処理を 1 時間行った。続いて、1.25 µg/mL のウサギ抗 rCit s 2-SUMO 抗体を含む抗体溶液をブロッキング溶液で調製し、抗体溶液で転写膜を 1 時間処理した。転写膜を TBST で 5 分間 3 回洗浄した後、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) をブロッキング溶液で 8,000 倍に希釈し、二次抗体溶液を 1 時間処理した。転写膜を TBST で 5 分間 3 回洗浄後、発色基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine peroxidase substrate solution (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を転写膜に添加して 10 分間処理した。バンドの発色後、転写膜を水洗して風乾させ、画像を取得した。

5. orange-ELISA の方法

orange-ELISA を用いてオレンジ果汁を定量した。炭酸緩衝液 (15 mmol/L Na₂CO₃、35 mmol/L NaHCO₃、pH 9.6) で調製した試料溶液を平底ウェルのプレート (住友ベークライト) に 50 µL ずつ添加して 4°C で一晩、固相化した。その後、ウェルに 20% ウマ血清 (Thermo Fisher Scientific) を含む PBS (ブロッキング溶液) を 150 µL ずつ添加して、ウェルを 1 時間ブロッキング処理した。以後のウェルへの添加量はそれぞれ 50 µL とした。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBST) の洗浄液でウェルを 3 回洗浄し、0.05% Tween 20 を含むブロッキング溶液で 10 µg/mL に調製したウサギ抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体溶液を

ウェルに添加して 1 時間処理した。PBST でウェルを 5 回洗浄した後、0.05% Tween 20 を含むブロッキング溶液で 2,000 倍に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Vector Laboratories) をウェルに添加して 1 時間処理した。PBST でウェルを 5 回洗浄後、ストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ (Vector Laboratories) をウェルに添加して 1 時間処理した。PBST でウェルを 8 回洗浄後、発色基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Thermo Fisher Scientific) をウェルに添加して遮光下で 10 分間静置して発色反応させ、1 mol/L の硫酸を添加して反応を停止させた。450 nm における吸光度を測定し、得られたデータは SF5 ソフトウェア (コロナ電気株式会社) で解析した。測定は、すべて 1 試料につき 3 ウェルで行った。また、検量線は 4-parameter logistic curve を使用して作成した。9 回の独立した実験において、変動係数 CV 値が 30% 未満の濃度点を検出下限値、CV 値 10% 未満の濃度点を定量範囲として設定した。

結果と考察

1. 作製した抗体とその反応性

免疫抗原として rCit s 2-SUMO を日本白色種ウサギに免疫した結果、得られた抗血清は良好な抗体価を示し、プロテイン A カラムで精製してウサギ抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体とした。ネーブルオレンジ抽出物および poly-L-proline アフィニティー精製 nCit s 2 に対する抗体の反応性を確認するために、rCit s 2 を陽性対照としてイムノブロッティングを行った (図 12)。その結果、rCit s 2-SUMO に単独のバンドが確認され、ネーブルオレンジ抽出物と精製 nCit s 2 のレーンにおいて、rCit s 2 の分子量 14,000 付近に明瞭なバンドが確認された。これにより、抗 rCit s 2-SUMO 抗体は Cit s 2 を認識することが確認され、この抗体を後続の実験に使用することとした。

2. orange-ELISA の開発

orange-ELISA において、ネーブルオレンジ果汁の遠心上清を使用して、1,250 – 10,000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線を作成したところ ($n = 9$)、検出下限値および定量下限値は、それぞれ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CV} < 30\%$)、2,500 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CV} < 10\%$) であった (図 13)。

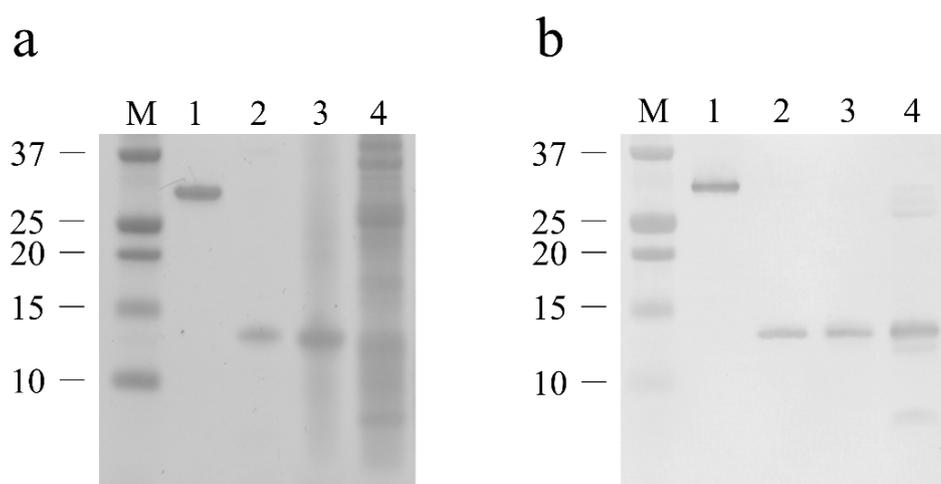


図 12. Cit s 2 に対する作製したウサギ抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体の反応性確認. (a) Coomassie Brilliant Blue 染色, (b) イムノブロッティング. レーン 1, rCit s 2-SUMO ; レーン 2, rCit s 2 ; レーン 3, poly-L-proline アフィニティー精製 nCit s 2 ; レーン 4, ネーブルオレンジ抽出物 ; レーン M, 分子量マーカー (分子量 $\times 10^{-3}$).

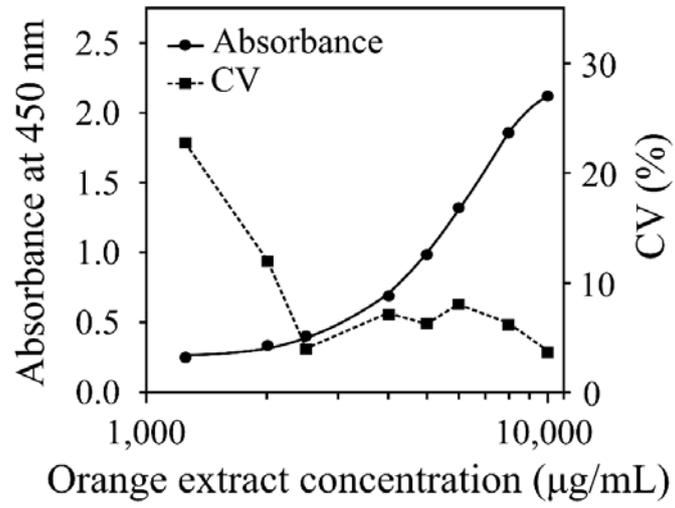


図 13. orange-ELISA における検量線（実線）とその精度プロファイル（点線）． 定量範囲: 2,500–10,000 µg/mL (CV < 10%) ．

第2節 調理器具材における残留オレンジ果汁の評価

本節では、拭き取り試験と orange-ELISA から構成される残留オレンジ果汁評価法を用いて、調理器具材のオレンジ果汁の残留性評価を試みた。

実験材料および方法

1. 拭き取り試験

調理器具における果汁の残留性を評価するために、調理器具材としてガラス製、ステンレス製、木製の調理器具を大阪市立環境科学研究所附属栄養専門学校から入手し、ポリプロピレン製の調理器具は大阪市内の小売店で購入し、それぞれ用意した。これら調理器具材の縦 5 cm × 横 5 cm の水平面に対し、マイクロピペットを用いて、検量線の標準品と同じネーブルオレンジ果汁を塗布した。次いで、調理器具材を 30°C、30 分間でインキュベートして塗布した果汁を乾燥させた。その後、調理器具に対して次のように処理を行った。1) [洗浄なし]、2) [水洗浄]：28°C の 1L の水を 5–10 秒かけて、果汁の塗布面に流した。3) [洗剤洗浄]：家庭台所用液体洗剤溶液（洗剤 0.75 μ L/水 1 mL、ライオン株式会社、東京）を含んだ台所用スポンジ（スリーエムジャパン株式会社、東京）で塗布面を 10 回こすった後、2) と同様に水洗した。PBS で予め湿らせた不織布の綿棒（BM フキトレール A、株式会社 GSI クレオス、東京）を用いて塗布面の残留果汁を縦横 20 回ずつ拭き取り、拭き取り液を 1 mL の PBS に懸濁して回収した。この懸濁液は炭酸緩衝液で 2–20 倍に希釈し、塗布に用いたネーブルオレンジ果汁は炭酸緩衝液で 400 倍に希釈し、それぞれ orange-ELISA に供した。

2. 残留オレンジ果汁の評価

拭き取り試験では 5 回の独立した試験を実施し、その平均果汁量 (mg) を結果とした。塗布したネーブルオレンジ果汁を標準品として検量線を作成し、残

留した果汁量を算出した。拭き取り試験における塗布した果汁の残留率と除去効率は、次式のように算出した。

$$\cdot \text{ネーブルオレンジ果汁残留率 (\%)} = C_s / C_0 \times 100$$

$$\cdot \text{除去効率 (\%)} = (C_s [\text{水洗なし}] - C_s [\text{水洗のみ}]) / C_s [\text{水洗なし}] \times 100$$

C_0 : 拭き取り試験において各調理器具材に塗布したネーブルオレンジ果汁の量 (mg)、 C_0 (mg) = orange-ELISA で得られた試料の果汁濃度 ($\mu\text{g/mL}$) $\times 400$ (希釈倍率) $\times 0.05 \text{ mL}$ (塗布量) $\times 10^{-3}$

C_s : 拭き取り液におけるネーブルオレンジ果汁量、 C_s (mg) = orange-ELISA で得られた試料の果汁濃度 ($\mu\text{g/mL}$) $\times [2-20]$ (希釈倍率) $\times 1 \text{ mL} \times 10^{-3}$

3. 統計解析

得られたデータは、エクセルアドインソフトウェア (Statcel3、オーエムエス出版、埼玉) を用いて、パラメトリック多重比較検定 Tukey-Kramer test およびノンパラメトリック多重比較検定 Steel-Dwass test により解析した。

結果と考察

1. 調理器具材におけるオレンジ果汁の残留性

ガラス、ステンレス、木、ポリプロピレンのそれぞれに付着したオレンジ果汁に対して拭き取り試験を実施し、その残留性評価を表 8 にまとめた。

[洗浄なし] の場合、オレンジ果汁の残留率は、木 (43%) については、ステンレス (105%) とガラス (91%) よりも低かった ($p < 0.05$ 、Tukey-Kramer test)。また、ポリプロピレン (68%) については、ステンレスよりも低い結果であった ($p < 0.05$ 、Tukey-Kramer test)。木とポリプロピレンで果汁の残留率が阻害された理由として、木では素材の吸収性に加え、経年使用による包丁傷から果汁の吸収が促進されたこと、ポリプロピレンでは滑り止め目的で施された凹凸加工により果汁が留められたことがそれぞれ考えられる。

〔水洗浄〕の場合、木とポリプロピレンの洗浄効率はそれぞれ 41%、48%であった。一方、ステンレスとガラスでは洗浄効率が 95%以上であり、Wang ら⁶⁰⁾の報告のように、小麦アレルギーであるグリアジンと同様に、十分な洗浄効果が得られた。また、ネーブルオレンジ果汁の残留性は木ではガラスよりも高く、ポリプロピレンではステンレスとガラスよりも高かった ($p < 0.05$ 、Steel-Dwass test)。橋本ら⁶¹⁾は、ポリプロピレンに付着した鶏卵液に対して、水洗浄では十分な洗浄効果は得られないことを報告した。今回の研究結果においては、水洗浄後の木とポリプロピレンでは 17 mg–68 mg のネーブルオレンジ果汁が残留し、ステンレスやガラスと比較して洗浄効果が低かったと考えられる。Alvarado ら⁴⁵⁾の報告によると、アレルギー症状を惹起するヤシ花粉プロフィリンの閾値は 0.074 μg であった。第 2 章の結果から、ネーブルオレンジ果汁中の Cit s 2 濃度が 0.0264 $\mu\text{g}/\text{mg}$ で、残留オレンジ果汁量を 17–68 mg とすると、0.449–1.795 μg の Cit s 2 が残留することになる。アレルギー発症閾値については個人差があるため慎重な閾値の推測が求められるが、木とポリプロピレンにおける水洗浄では、閾値を十分に上回るオレンジ果汁が残留する可能性があり、果物アレルギーに対する衛生管理の要注意点と考えられる。

〔洗剤洗浄〕の場合、付着したオレンジ果汁は、いずれの調理器具材においても残留した果汁は検出されなかったことから、すべて除去されたと考えられる。しかし、ポリプロピレン、ステンレス、ガラスではそれぞれ検出下限値未満であったのに対して、木では 5 回の拭き取り試験のうち、2 回は定量下限値未満であった。木における食品残留物はカビの発生原因にもなり得るため⁶²⁾、食品衛生や食物アレルギーの混入防止の観点から、木の調理器具はより綿密に洗浄を行うか、あるいは使用すべきでないと考えられる。

ステンレスやガラスは、果物向けの包丁、ジューサー、スクイザーのような洗浄が難しい調理器具材としてよく使用されている。ステンレスとガラスでは水洗浄だけで残留した果汁の洗浄効果が高かった。今回得られた知見から、ステンレス製やガラス製の調理器具の利用により果物の調理者や食品工場における過度の洗浄を回避し、オレンジアレルギーに対する衛生管理の負担軽減化

に貢献することが期待される。また、オレンジと同様に、メロンやスイカ等の果汁も粘度が高く、かつプロフィリンがアレルギーとして含まれていることから、本評価手法の応用が見込まれる。なお、本章で作製した抗 rCit s 2-SUMO ポリクローナル抗体は、スイカに交差反応を示し、オレンジと同様に調理器具材において拭き取り試験を実施したところ、残留スイカ果汁の定性的な評価が可能であった。これらの研究をさらに推進することで、多種類の果汁の残留挙動が解明され、様々な果物を取り扱う調理現場における果物アレルギーに対する総合的な衛生管理の構築に向けて有用な情報が得られると考えられる。

表 8. 拭き取り試験において 4 種類の調理器具材に残留したオレレンジ果汁の残留率の比較.

拭き取り 試験 No.	塗布した オレレンジ 果汁 (mg)	洗浄なし				水洗浄				洗剤洗浄			
		ポリブ ロピレ ン	木	ステン レス	ガラス	ポリブ ロピレ ン	木	ステン レス	ガラス	ポリブ ロピレ ン	木	ステン レス	ガラス
1	107	85	63	119	99	54	35	13	7	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
2	111	90	40	130	133	68	46	8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3	154	85	61	179	162	65	44	10	6	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
4	179	115	69	156	144	39	34	6	6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	143	93	63	147	90	17	18	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
平均値 ^{a)}	139	94	59	146	126	48	35	7	4	-	-	-	-
残留率 (%)	100	68	43	105	91	35	25	5	3	-	-	-	-
洗浄効率 (%)	-	0	0	0	0	48	41	95	97	-	-	-	-

LOD, 検出下限値 2,000 µg/mL; LOQ, 定量下限値 2,500 µg/mL

^{a)}LOD は 0 mg として計算した

-: 該当なし

第3節 小括

第3章では、調理器具を介したオレンジアレルゲンの混入を防止するために、orange-ELISA と拭き取り試験から構成される残留オレンジ果汁評価法を開発した。まず、orange-ELISA の開発では、rCit s 2-SUMO を免疫抗原としてウサギから作製した抗rCit s 2-SUMOポリクローナル抗体を直接吸着法ELISAに採用し、簡便で安価なオレンジ果汁定量法を構築した。次に、拭き取り試験において、調理器具材ごとにネーブルオレンジ果汁を塗布して付着させた後、その拭き取り液を orange-ELISA に供して果汁量を測定した。

残留した果汁を制御するためには、調理器具材の種類にかかわらず洗剤洗浄が必要であったが、ステンレスとガラスでは水洗浄だけで洗浄効率 95%以上の高い洗浄効果が得られた。ステンレスやガラスは、洗浄時に細心の注意が必要な包丁、ジューサー、スクイザー等の調理器具材としてよく使用されている。したがって、ステンレス製やガラス製の調理器具の利用により、果物の調理人や食品工場でのオレンジアレルゲンに対する衛生管理の負担軽減化に貢献することが期待される。

本章で開発した評価法は、調理器具を介したオレンジアレルゲンの混入防止に貢献すると考えられる。加えて、この評価手法は、オレンジと同様に果汁の粘度が高く、プロフィリンをアレルゲンとして含むメロン等の他の果物にも応用が見込まれ、果物アレルゲンに対する総合的な衛生管理の構築に役立つと考えられる。

総括と展望

本研究では、オレンジアレルギー Cit s 2 に対する以下の 3 種類の分析法を開発した。まず、①ミカン属果実 11 品種に対するプロフィリン定量法 (profilin-ELISA) を開発し、ミカン属果実におけるプロフィリンの濃度分布を明らかにした。プロフィリンは果実全体に存在し、果皮より果肉の濃度が約 1.5–4 倍高い傾向を示したが、顕著な濃度差はなかった。ミカン属果実は、果肉だけでなく果皮も加工品として利用されるため、オレンジアレルギー患者は加工品の摂取にも注意が必要である。そのため、次に、②ネーブルオレンジ生鮮品とオレンジ加工品に対するより高感度な Cit s 2 定量法 (Cit s 2-ELISA) を開発し、それらの Cit s 2 濃度実態を解明した。一部のオレンジ加工品には生鮮品の 1/20–1/10 程度の Cit s 2 が含まれており、Cit s 2 摂取リスクが存在することを明らかにした。そして、③調理器具材における残留オレンジ果汁評価法 (安価で簡便なオレンジ果汁定量法 orange-ELISA と果汁の拭き取り試験) を開発し、オレンジ果汁の残留性を明らかにした。ステンレスとガラスにおいて、残留オレンジ果汁に対して水洗のみで高い洗浄効果を示した。したがって、ステンレス製やガラス製の調理器具の利用により、オレンジのアレルゲンに対する衛生管理の負担軽減が期待される。

本研究で開発した分析法は、これまで未開発であった特定原材料に準ずるオレンジに対する具体的な分析法として有用である。本研究で開発した分析法やその手法は、次のように応用が期待される。profilin-ELISA や Cit s 2-ELISA は「プロフィリン低含有食品の製造」に、残留オレンジ果汁評価法は「果物アレルギーに対する総合的な衛生管理」に、それぞれ応用が期待される。また、PFAS 等のアレルギーの診断では、より正確な診断を可能にするために、試験材料のアレルゲン含有量の標準化が必要とされている。ミカン属果実の適用範囲が広い profilin-ELISA や Cit s 2 の分析性能が高い Cit s 2-ELISA は、臨床における「アレルギー診断の試験材料の標準化」への応用が期待される。

以上により、オレンジアレルギー患者の発症防止に貢献し、患者や食生活を共にする家族の生活の質を改善できるものと考えられる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御懇切な御指導および御高覧を賜りました大阪大学大学院薬学研究科応用環境生物学分野 平田收正教授に心より感謝いたします。また、論文作成にあたり多大な御助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科 高木達也教授、同 辻川和丈教授、および地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 山口進康生活環境課長に厚くお礼申し上げます。

実験の遂行にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました三重短期大学生生活科学科 橋本博行教授、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 山野哲夫衛生化学部長、同 梶村計志食品化学 1 課長、同 川津健太郎細菌課長、同 阿久津和彦主幹研究員、同 吉光真人主任研究員、同 紀雅美主任研究員、同 坂田淳子主任研究員、同 村上太郎主任研究員およびお世話になりましたすべての皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 原田勝寿. 食品中の機能性成分解析. 分析化学, 65(6), 309-319 (2016).
- 2) 海老澤元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫監修, 日本小児アレルギー学会食物アレルギー一委員会作成. 食物アレルギー診療ガイドライン 2016 (2016).
- 3) Ebisawa M., Ito K., Fujisawa T. Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergology International*, 66(2), 248-264 (2017).
- 4) Matricardi P.M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H.J., Valenta R., Hilger C., Hofmaier S., Aalberse R.C., Agache I., Asero R., Ballmer-Weber B., et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27(S23), 1-250 (2016).
- 5) Ma S., Sicherer S.H., Nowak-Wegrzyn A. A survey on the management of pollen-food allergy syndrome in allergy practices. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 784-788 (2003).
- 6) 浅海智之, 柳田紀之, 海老澤元宏. VI. 食物アレルギー: いつどのように対処するか. 日本内科学会雑誌, 105(10), 1966-1974 (2016).
- 7) Radauer C., Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 518-525 (2007).
- 8) Asero R., Monsalve R., Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(6), 1033-1037 (2008).
- 9) Weber R.W. Patterns of pollen cross-allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(2), 229-239 (2003).
- 10) 山本哲夫, 朝倉光司, 白崎英明, 氷見徹夫, 小笠原英樹, 成田慎一郎, 形浦昭克. 札幌のシラカバ花粉症と口腔アレルギー症候群. *アレルギー*, 53(4), 435-442 (2004).
- 11) Baker M.G., Sampson H.A. Phenotypes and endotypes of food allergy: A path to better understanding the pathogenesis and prognosis of food allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 120(3), 245-253 (2018).
- 12) 山本哲夫, 朝倉光司, 白崎英明, 氷見徹夫. シラカバ花粉関連食物を含む果物, 野菜, ナッツ類の摂取と過敏症に関するアンケート調査. 日本耳鼻咽喉科学会会報, 116(7), 779-788 (2013).

- 13) 今井孝成. 即時型食物アレルギー疫学調査. 日本小児アレルギー学会誌, 18(1), 53-58 (2004).
- 14) 今井孝成, 杉崎千鶴子, 海老澤元宏. 消費者庁 「食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業」 平成 23 年 即時型食物アレルギー全国モニタリング調査結果報告. アレルギー, 65(7), 942-946 (2016).
- 15) Amlot P.L., Kemeny D.M., Zachary C., Parkes P., Lessof M.H. Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clinical Allergy*, 17(1), 33-42 (1987).
- 16) Ortolani C., Ispano M., Pastorello E.A., Ansaloni R., Magri G.C. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 83(3), 683-690 (1989).
- 17) 山本哲夫, 朝倉光司, 形浦昭克. 北海道のシラカバ花粉症とリンゴ果肉過敏症について. アレルギー, 42(11), 1701-1706 (1993).
- 18) Asero R., Massironi F., Velati C. Detection of prognostic factors for oral allergy syndrome in patients with birch pollen hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97(2), 611-616 (1996).
- 19) 西間三馨, 小田嶋博, 太田國隆, 岡尚記, 岡崎薫, 金谷正明, 久田直樹, 熊本俊則, 古賀龍夫, 小林伸雄, et al. 西日本小学児童におけるアレルギー疾患有症率調査—1992, 2002, 2012 年の比較—. 日本小児アレルギー学会誌, 27(2), 149-169 (2013).
- 20) 馬場廣太郎. 鼻アレルギーの全国疫学調査 2008. *Progress in Medicine*, 28, 2001-2012 (2008).
- 21) 総務省. 日本標準商品分類 (平成 2 年 6 月改定) , http://www.soumu.go.jp/toukei_toukatsu/index/seido/syohuin/2index.htm Accessed on 16.3.2018. (2018).
- 22) 清田恭平, 吉光真人, 野村千枝, 栗津薫, 山口瑞香, 岡本(柿本)葉, 柿本幸子, 阿久津和彦, 梶村計志. 特定原材料検査における「小麦」と「えび」の検出事例について—平成 21 年度~平成 25 年度—. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 52, 27-29 (2014).
- 23) 小路正博. 食品企業と食物アレルギー. *ファルマシア*, 49(1), 57-62 (2013).

- 24) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Accessed on 30.3.2018. (2018).
- 25) King T.P., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A., Thomas W. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105(3), 224-233 (1994).
- 26) WHO/IUIS, Allergen Nomenclature Sub-Committee. Search The Database, <http://www.allergen.org/search.php> Accessed on 16.3.2018. (2018).
- 27) Lopez-Torrejón G., Ibanez M.D., Ahrazem O., Sanchez-Monge R., Sastre J., Lombardero M., Barber D., Salcedo G. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy*, 60(11), 1424-1429 (2005).
- 28) Iorio R.A., Del Duca S., Calamelli E., Pula C., Lodolini M., Scamardella F., Pession A., Ricci G. Citrus allergy from pollen to clinical symptoms. *PloS One*, 8(1), e53680 (2013).
- 29) Takamatsu N., Kondo Y., Tsuge I., Nakajima Y., Naruse N., Tanaka K., Inuo C., Hayashi T., Matsuda T., Yoshikawa T. A study of cross-reactivity between citrus fruit and pollen allergens in oral allergy syndrome and food-dependent exercise-induced anaphylaxis in Japan. *Fujita Medical Journal*, 2(1), 6-11 (2016).
- 30) Liu B., Teng D., Wang X., Wang J. Detection of the soybean allergenic protein Gly m Bd 28K by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4), 822-828 (2013).
- 31) Gao Z.S., Ma Y.T., Zhou X., Yang Z.W., Jia H.J., Gao L., Wu S.D., Han L.Y., Yi X.Y., Wang H.Y. Quantification of peach fruit allergen lipid transfer protein by a double monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Food Analytical Methods*, 9(4), 823-830 (2016).
- 32) Ibanez M.D., Sastre J., San Ireneo M.M., Laso M.T., Barber D., Lombardero M. Different patterns of allergen recognition in children allergic to orange. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(1), 175-177 (2004).
- 33) United States Department of Energy, Joint Genome Institute. Phytozome 12, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=2312&searchText=transcriptid:18104939> Accessed on 26.4.2018. (2018).
- 34) Kawatsu K., Kumeda Y., Taguchi M., Yamazaki-Matsune W., Kanki M., Inoue K. Development and evaluation of immunochromatographic assay for simple and rapid

- detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1226-1231 (2008).
- 35) Sakata J., Kawatsu K., Iwasaki T., Tanaka K., Takenaka S., Kumeda Y., Kodama H. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against *Vibrio parahaemolyticus* F0F1 ATP synthase's delta subunit and its application for rapid identification of the pathogen. *Journal of Microbiological Methods*, 88(1), 77-82 (2012).
- 36) Hauser M., Roulias A., Ferreira F., Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 6(1), 1 (2010).
- 37) Sun T., Li S., Ren H. Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. *Front Plant Sci*, 4, 512 (2013).
- 38) Foetisch K., Dahl L., Jansen B., Becker W.M., Lidholm J., van Ree R., Broll H., Kaul S., Vieths S., Holzhauser T. Development and in-house validation of allergen-specific ELISA tests for the quantification of Dau c 1.01, Dau c 1.02 and Dau c 4 in carrot extracts (*Daucus carota*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 935-943 (2011).
- 39) Amnuaycheewa P., de Mejia E.G. Purification, characterisation, and quantification of the soy allergen profilin (Gly m 3) in soy products. *Food Chemistry*, 119(4), 1671-1680 (2010).
- 40) United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA Food Composition Databases, <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09202?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=Navel+orange&ds=&qt=&qp=&qq=&qa=&qn=&q=&ing=> Accessed on 30.3.2018. (2018).
- 41) Lopez-Torrejón G., Crespo J.F., Sanchez-Monge R., Sanchez-Jimenez M., Alvarez J., Rodriguez J., Salcedo G. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clinical and Experimental Allergy*, 35(8), 1065-1072 (2005).
- 42) Asturias J.A., Arilla M.C., Aguirre M., Gomez-Bayon N., Martinez A., Palacios R., Sanchez-Gascon F., Martinez J. Quantification of profilins by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 229(1-2), 61-71 (1999).

- 43) Ahrazem O., Jimeno L., Lopez-Torrejon G., Herrero M., Espada J.L., Sanchez-Monge R., Duffort O., Barber D., Salcedo G. Assessing allergen levels in peach and nectarine cultivars. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 99(1), 42-47 (2007).
- 44) Abedini S., Sankian M., Falak R., Tehrani M., Talebi F., Shirazi F.G., Varasteh A. An approach for detection and quantification of fruits' natural profilin: natural melon profilin as a model. *Food and Agricultural Immunology*, 22(1), 47-55 (2011).
- 45) Alvarado M.I., Jimeno L., De La Torre F., Boissy P., Rivas B., Lazaro M.J., Barber D. Profilin as a severe food allergen in allergic patients overexposed to grass pollen. *Allergy*, 69(12), 1610-1616 (2014).
- 46) Suarez C., Carroll R.T., Burke T.A., Christensen J.R., Bestul A.J., Sees J.A., James M.L., Sirotkin V., Kovar D.R. Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex. *Developmental Cell*, 32(1), 43-53 (2015).
- 47) 田中裕, 杉原麻理恵, 津曲俊太郎, 高松伸枝, 栗原和幸. 温州みかんによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの1例. *アレルギー*, 66(8), 1011-1015 (2017).
- 48) Wu J., Chen L., Lin D., Ma Z., Deng X. Development and Application of a Multiplex Real-Time PCR Assay as an Indicator of Potential Allergenicity in Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(47), 9089-9098 (2016).
- 49) Galaverna G., Di Silvestro G., Cassano A., Sforza S., Dossena A., Drioli E., Marchelli R. A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 106(3), 1021-1030 (2008).
- 50) Lerma-Garcia M.J., D'Amato A., Simo-Alfonso E.F., Righetti P.G., Fasoli E. Orange proteomic fingerprinting: From fruit to commercial juices. *Food Chemistry*, 196, 739-749 (2016).
- 51) 文部科学省. 食品成分データベース, <https://fooddb.mext.go.jp/search.html> Accessed on 16.3.2018. (2018).
- 52) Deckwart M., Carstens C., Webber-Witt M., Schafer V., Eichhorn L., Kang S., Fischer M., Brockow K., Christmann M., Paschke-Kratzin A. Development of a sensitive ELISA for the detection of casein-containing fining agents in red and white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6803-6812 (2014).

- 53) Kiyota K., Kawatsu K., Sakata J., Yoshimitsu M., Akutsu K., Kajimura K. Development of sandwich ELISA for quantification of the orange allergen profilin (Cit s 2). *Food and Agricultural Immunology*, 27(1), 128-137 (2016).
- 54) Crespo J.F., Retzek M., Foetisch K., Sierra-Maestro E., Cid-Sanchez A.B., Pascual C.Y., Conti A., Feliu A., Rodriguez J., Vieths S., Scheurer S. Germin-like protein Cit s 1 and profilin Cit s 2 are major allergens in orange (*Citrus sinensis*) fruits. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(3), 282-290 (2006).
- 55) Ahrazem O., Ibanez M.D., Lopez-Torrejón G., Sanchez-Monge R., Sastre J., Lombardero M., Barber D., Salcedo G. Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137(3), 201-210 (2005).
- 56) Kar F., Arslan N. Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, L-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solutions. *Carbohydrate Polymers*, 40(4), 285-291 (1999).
- 57) Zhu J., Pouillot R., Kwegyir-Afful E.K., Luccioli S., Gendel S.M. A retrospective analysis of allergic reaction severities and minimal eliciting doses for peanut, milk, egg, and soy oral food challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 92-100 (2015).
- 58) Karlsson C.A.C., Wahlgren M.C., Trägårdh A.C. The removal of β -lactoglobulin from stainless steel surfaces at high and low temperature as influenced by the type and concentration of cleaning agent. *Journal of Food Process Engineering*, 21(6), 485-501 (1998).
- 59) Jackson L.S., Al-Taher F.M., Moorman M., DeVries J.W., Tippett R., Swanson K.M., Fu T.J., Salter R., Dunaif G., Estes S., Albillos S., Gendel S.M. Cleaning and other control and validation strategies to prevent allergen cross-contact in food-processing operations. *Journal of Food Protection*, 71(2), 445-458 (2008).
- 60) Wang X., Young O.A., Karl D.P. Evaluation of cleaning procedures for allergen control in a food industry environment. *J Food Sci*, 75(9), T149-155 (2010).
- 61) 橋本博行, 吉光真人, 清田恭平. 給食用食器の卵アレルギーの残留性比較. *日本家政学会誌*, 65(12), 681-687 (2014).
- 62) Tournas V.H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(1), 33-44 (2005).

発表論文

第1章関連

Kiyota K., Kawatsu K., Sakata J., Yoshimitsu M., Akutsu K., Kajimura K. Development of sandwich ELISA for quantification of the orange allergen profilin (Cit s 2). *Food and Agricultural Immunology*, 27(1), 128-137 (2016).

第2章関連

Kiyota K., Kawatsu K., Sakata J., Yoshimitsu M., Akutsu K., Satsuki-Murakami T., Ki M., Kajimura K., Yamano T. Development of monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of orange allergen Cit s 2 in fresh and processed oranges. *Food Chemistry*, 232, 43-48 (2017).

第3章関連

Kiyota K., Sakata J., Satsuki-Murakami T., Yoshimitsu M., Akutsu K., Ki M., Hashimoto H., Kajimura K., Yamano T. Evaluation of cleaning methods for residual orange extract on different cookware materials using ELISA with profilin allergen indicator. *Journal of Food Process Engineering*, 41(2), e12652 (2018).

参考論文

- 1) 清田恭平, 藤原有佳, 足立和人, 亀田誠, 阿久津和彦, 梶村計志. 乳成分が非意図的に混入した学校給食パンによる乳アレルギー発症事例における混入経路の検証. *アレルギー*, 63(6), 787-793 (2014).
- 2) 橋本博行, 吉光真人, 清田恭平. 給食用食器の卵アレルギーの残留性比較. *日本家政学会誌*, 65(12), 681-687 (2014).
- 3) 清田恭平, 竹元晶子, 岡島沙織, 森野静香, 梶井訓, 佐久間淳子, 吉光真人, 阿久津和彦, 梶村計志. 大阪府7市の小学校給食における食物アレルギー対応に関する調査. *食品衛生学雑誌*, 56(4), 151-156 (2015).
- 4) 橋本博行, 吉光真人, 清田恭平. 小麦粉ふるい操作後の小麦アレルギーの飛散動態の解析. *アレルギー*, 66(3), 209-221 (2017).
- 5) 橋本博行, 吉光真人, 清田恭平. ポリプロピレン製給食用食器におけるきずの解析と卵アレルギー残留性への影響. *日本家政学会誌*, 68(5), 193-205 (2017).
- 6) Kiyota K., Yoshimitsu M., Satsuki-Murakami T., Akutsu K., Kajimura K., Yamano T. Detection of the tomato allergen Sola l 1 and evaluation of its reactivity after heat and papain treatment. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1450-1459 (2017).