

## 29. LC-MS/MSによるアニサキスアレルゲン検出法の開発

○高山 清子、黒木 麻衣、野中 勇志（宮崎県衛生環境研究所）

### 【研究目的】

アニサキスは、平成30年以降の食中毒のうち最も事件数の多い病因物質であり、令和5年は総事件数の42.3%を占めている<sup>1)</sup>。食中毒として計上されるのは、生きたアニサキスが消化管に侵入して引き起こされる消化管アニサキス症であり、冷凍や加熱処理で予防できる。一方、アニサキスアレルゲンより引き起こされるアニサキスアレルギーは、アナフィラキシーなど劇症型アニサキス症への関与や青魚喫食後の蕁麻疹の原因であることが明らかにされてきた<sup>2)</sup>。アニサキスアレルギーは、凍結や加熱処理により死滅したアニサキスを摂取してもアレルギーを発症することが知られており予防が困難である。

一方、近年LC-MS/MSを用いたアレルゲン分析法は、迅速かつ高感度検出法として注目されている。本研究では、LC-MS/MSを用いたアニサキスアレルゲン検出法の確立を目的とする。

### 【研究の必要性】

アニサキスは、食中毒のうち最も事件数が多い病因物質であり、人口100万人あたりのアニサキス食中毒件数を国内及び宮崎県内で比較すると、本県はアニサキス食中毒が多く発生している。魚種別で比較するとサバが半数以上を占めており、その他カツオ、アジ等で多い。食中毒統計上のアニサキス食中毒件数はアニサキス症の一部であり、実際の症例数は報告された食中毒件数よりも多いと言われている。また、「青魚によるアレルギー」は「魚類に寄生しているアニサキスに対するアレルギー」ということも明らかにされている。このように、身近な食品にアニサキスアレルギーのリスクが潜んでおり、魚介類を食べることが多い我々日本人にとって、アニサキスアレルギーの対策は重要な課題である。そして、食品中のアニサキスアレルゲンについて調査することは食品衛生の観点から重要であると考えられるが、報告が少なく不明な点が多い。

一方、近年LC-MS/MSによるアレルゲン分析法が注目されている。この分析法は、抽出したタンパク質を酵素処理し、生成したペプチドを分析ターゲットとするため、特異性が高く高感度にアレルゲンを検出できる。さらには、一般的なアレルゲン検出法であるELISA法に比べ安価で迅速に分析できるため、多試料分析に適している。以上の理由から、LC-MS/MSを用いてアニサキスアレルゲン検出法を確立することが求められる。

## 【研究計画】

本研究では、アニサキス症の原因寄生虫の約95%を占める *Anisakis simplex* (*A. simplex*) をターゲット種とする。まず、アニサキス虫体を、市販のサバ及びアジから採取する。アニサキス虫体の一部から抽出したDNAを、*A. simplex* に特異的なプライマー<sup>3)</sup>でPCRを行い、バンドが確認された虫体を試験に用いる。

次に、LC-MS/MSの最適化に使用するため、アニサキス虫体からタンパク質を抽出する。LC-MS/MSによるアニサキスアレルゲン分析の前処理として、タンパク質の変性、還元、アルキル化、トリプシン消化及び精製を行う。*A. simplex*のアレルゲンのアミノ酸配列は公開されているため、「Uniprot」等ウェブサイトのBLAST検索により、アニサキスアレルゲンのトリプシン消化で生成するペプチド断片のうち、*A. simplex*に特異的なペプチドを選択する。そして、選択したペプチドのLC-MS/MS測定条件を最適化することにより、アニサキスアレルゲンの検出方法を確立する。

## 【実施内容・結果】

### 1. 試料

市販のサバ及びアジを購入し、内臓に付着したアニサキスを採取した。1隻ずつチューブに入れて冷凍保存した。アニサキス虫体の一部から抽出したDNAを、*A. simplex*に特異的なプライマー<sup>3)</sup>でPCRを行い、バンドが確認された虫体を試験に供した。

### 2. LC-MS/MS測定条件の検討

アニサキス虫体にタンパク質抽出液を500 µL添加してホモジナイズし、遠心分離(15,000 ×g, 4°C, 20分)後の上清をアニサキス抽出液とした。アニサキス抽出液におけるタンパク質の還元、アルキル化、トリプシン消化は、ProteinWorks eXpress 消化キット (Waters) を用い、精製には、ProteinWorks µElution SPE クリーンアップキット (Waters) を用いた。装置及び測定条件を表1に示した。測定対象ペプチドは、G. Saelens らの報告<sup>4)</sup>を参考に選定し、BLAST検索で *A. simplex* に特異的であることを確認した。

表1 装置及び測定条件

	Xevo TQ-XS
イオン化	ESI (positive)
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm 2.1×100 mm
移動相	A液：0.1%ギ酸水溶液 B液：アセトニトリル
グラジエント条件	B Conc. 14% (0 min) → 14% (1.0 min) → 40% (16.5 min) → 90% (16.6 min) → 14% (21 min) → 14% (24 min)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 µL

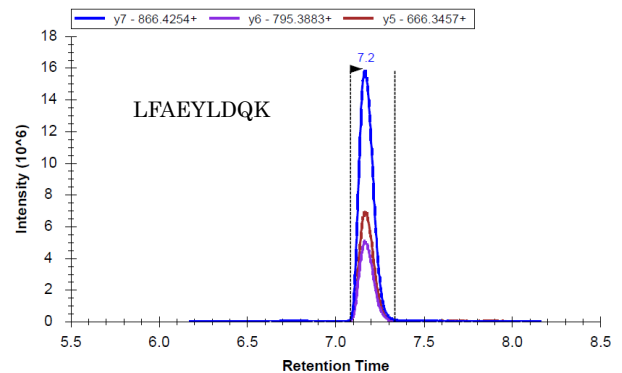


図1 *A. simplex* に特異的なペプチドの最適化

Skyline ソフトウェアで MRM メソッドを作成し、MassLynx Skyline Interface (Waters) で MRM の最適化を行った。感度及びピーク形状の優れたイオンを選択し、*A. simplex* に特異的な測定ペプチドを選定した (図 1)。

### 【考察と今後の課題】

今後は、本研究において選定した *A. simplex* に特異的な測定ペプチドの安定同位体ペプチドを用いて相対定量法を確立する。また、アニサキスアレルギーは耐熱性があるため加熱処理した水産物加工食品にも含まれている可能性がある。そのため、食品中マトリックス成分の影響を受けにくいアニサキスアレルギーの抽出及び精製方法を検討する必要がある。そして確立した方法により、水産物加工食品中のアニサキスアレルギーを調査する。

### 【参考文献】

- 1) 厚生労働省. 食中毒統計資料.  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokucu/hu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokucu/hu/04.html) (2024 年 8 月 8 日アクセス可能)
- 2) 塩見一雄. アレルギーから眺めたアニサキス症とアニサキスアレルギー. 食衛誌 61 J23-J30 (2020)
- 3) 阿部仁一郎, 八木欣平. PCR 法によるアニサキス亜科幼線虫の同定. 生活衛生 49 168-171 (2005)
- 4) Ganna Saelens, Sören Planckaert, Victoria Martínez-Sernández, et al. Targeted proteomics and specific immunoassays reveal the presence of shared allergens between the zoonotic nematodes *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. Scientific Report. 12 4127 (2022)

### 【経費使途明細】

使 途	金 額
ペプチド合成 (安定同位体標識、9 残基)	203,500 円
ペプチド合成 (7 残基)	82,500 円
水産食品試料	13,806 円
振込手数料 (330 円×2 回)	660 円
利息	-16 円
合 計	300,450 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円