

平成14年度 新潟大学プロジェクト推進経費研究成果報告書

新潟大学長 殿

申請者
所属 農学部
代表者氏名 鈴木 敦士

本年度の交付を受けたプロジェクト推進経費について、下記のとおり報告いたします。

プロジェクトの種目：助成研究（B）
プロジェクトの課題：超高压処理による食品アレルギーの低減化に関する研究
プロジェクトの代表者：所属 農学部 職名 教授 氏名 鈴木敦士 分担者 2名
プロジェクトの成果
<p>1. 研究の目的</p> <p>我が国の食物アレルギー患者の数は年々増加傾向にある。平成12年に発表された厚生省（当時）研究班の調査結果から、深刻な食物アレルギーの原因になる可能性から、原料表示の対象となる食品24品目があげられ、平成13年4月から加工原料に使用される場合の表示が義務付けられている（13年度中は猶予期間）。24品目の中に卵、牛乳、牛肉などの畜産物が含まれ、特に前2者はアレルギー・症例の約50%を占めている。牛肉以外の食肉アレルギー（鶏肉、豚肉）も増える傾向にあり、いずれも24品目の中に含まれている。これまでに、本プロジェクト研究代表者らの研究室において、牛血清アルブミン（BSA）や牛ガンマグロブリンが牛肉アレルギーの主要アレルギータンパクであることを報告してきた。</p> <p>アレルギー低減法として酵素処理によりタンパク質を低分子化することが一般的であるが、本研究では熱に代わる食品加工法として注目をあびている超高压処理、あるいは超高压処理と酵素処理の組み合わせによるアレルギー低減化とその評価系の確立を目的としている。</p>
<p>2. 実験方法</p> <p>本研究では、手始めに、アミノ酸配列の明らかになっている BSA のアレルギー性の低減化を目指し、高压処理の影響を検討した。BSA のアレルギー性は、牛肉アレルギー患者の血清を用いたヒト好塩基球様 KLU812F 細胞のヒスタミン遊離試験により評価した。この細胞は慢性白血病患者由来の株化細胞であり、ヒスタミンを産生し、高親和性 IgE レセプター Fc RI を発現するなど好塩基球様の特徴を有する。さらに、この細胞は IgE を介した脱顆粒反応を起こすことが確認されている。脱顆粒反応により放出されたヒスタミンなどの種々のメディエーターは、炎症反応に至らしめる。摂取した食品中のアレルギータンパクがその特異的 IgE を細胞表面に結合したマスト細胞や好塩基球を感作し、細胞が活性化されると脱顆粒反応が起る。これが食品アレルギーでみられる即時型過敏症の引き金になると考えられている。本研究報告では、BSA を高压処理することによりその構造に何らかの変化を与え、IgE との結合性を低下させる、あるいは、結合したとしてもマスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応に至らしめないようにできないものか検討し</p>

た。

3. 結果と考察

まず、数十例の牛肉アレルギー患者の血清に対して ELISA 法により BSA と結合する IgE が存在するか検討した。その結果、用いた血清の半数以上に反応性が認められ、ELISA 値（吸光度）が 1.0 以上の値を示した血清もいくつか認められた（表 1）。

表 1. 牛肉アレルギー患者血清 IgE の BSA との結合性
（ELISA 検査結果）

患者	ELISA test (O.D. ₄₀₅)	判定	患者	ELISA test (O.D. ₄₀₅)	判定
A 1	0.206	-	P2	1.632	++
A 3	0.202	-	A27	0.775	+
A 4	0.213	-	A30	0.533	+
A 5	1.257	++	A45	1.660	++
A 7	0.235	-	A48	0.256	-
A11	0.789	+	A74	0.394	-
A14	0.533	+	A77	1.050	++
A16	0.202	-	A125	1.147	++
A17	1.040	++	A278	0.325	-
A20	0.352	-	A284	0.584	+
A21	0.579	+	A285	0.242	-

ここで、イムノプロット法により BSA と患者血清 IgE との結合性を検討したところ、残念ながら高圧処理（600 MPa）はほとんど何の変化も与えなかった。また、100 分で 10 分間の加熱処理も BSA と患者血清 IgE との結合性を低下させることはできなかった。

次に、ヒスタミン遊離試験を行った。まず、血清を 1/100 の希釈率で RPMI-1640 培地中（牛胎児血清は含まない）で KU812F 細胞と 37 分で 60 分間インキュベートし、細胞表面上の高親和性 IgE レセプターに IgE を結合させた。細胞表面上に結合した IgE は、フローサイトメーター解析により確認した。それから、2 回洗浄した後、細胞をタイロド緩衝液に伴濁し、そこへ BSA を添加して 37 分で 60 分間インキュベートした。遊離したヒスタミンは蛍光法により定量した。図 1 に示したように、この実験系において BSA は、前述の ELISA 値が非常に高い（1.0 以上）血清（A5）に対して濃度依存的にヒスタミン遊離を促した。つまり、BSA は患者血清中の抗 BSAIgE を介して KU812F 細胞のヒスタミン遊離を引き起こしたといえる。一方、ELISA 値が低い（0.3 以下）血清（A4）に対しては、1 µg/ml の BSA を添加しても 10% 以下の低いヒスタミン遊離率であった。この様に、BSA は抗 BSAIgE レベルの高い血清では KU812F 細胞のヒスタミン放出を引き起こすことが確認できた（図 1）。この A5 血清を用いた実験系において高圧処理の影響を検討したところ、図 2 に示したように、1 µg/ml の未処理の BSA を添加すると 40% 以上のヒスタミン遊離率が認められたのに対し、600 MPa で処理した BSA を 1 µg/ml 添加するとヒスタミン遊離率は約 20% に抑制された。また、加熱処理（100 分、10 分）した BSA においても約 10% 程度の低いヒスタミン遊離率に抑制された。この様に、高圧処理および加熱処理した BSA は、患者血清 IgE と結合するものの、マスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応を抑制する可能性が示された。ここで同時に、ペプシン処理（100 U/ml、60 分）した BSA に対しても同様の検討を行ったのだが、図 2 に示したように、未処理の BSA よりもヒスタミン遊離率が高くなる（70%）結果を得た。ウエスタンブロットの結果、BSA はペプシン処理するとペプチド断片に分解されてしまうことを確認している。しかし、IgE エピトープを漬すことが出来たかどうか確認する必要がある。食品のアレルゲン性低

減化に向け、酵素処理によるアレルゲンタンパクの分解という方法をとる際には、生じたペプチド断片がより強いアレルゲン性を示す場合に注意する必要があるのではなかろうか。また、生体

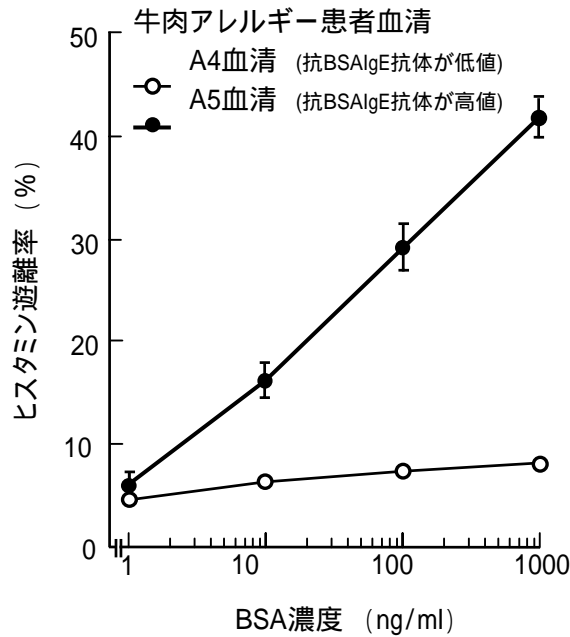


図1. 牛肉アレルギー患者血清とKU812F細胞を用いたヒスタミン遊離試験

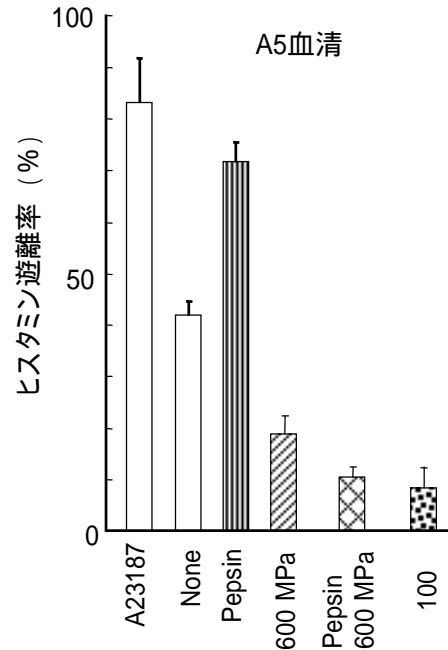


図2. ペプシン、加熱および高圧処理したBSAがヒスタミン遊離に及ぼす影響

内では、代謝されて生じたペプチド断片がアレルゲンとして働く可能性も考えられる。ペプシン処理して70%ものヒスタミン遊離を促すようになったBSAサンプルを高圧処理(600 MPa, 10分)すると、図2に示したように、10%程度の低いヒスタミン遊離率に抑制された。高圧処理は、酵素処理と組み合わせることにより効果的にアレルゲン性を低減化できる可能性がある。ここまでA5血清を用いた結果を述べてきたが、他に5つのELISA値が非常に高い(1.0以上)血清(A17、A45、A77、A125、P2)について検討した結果を図3に示した。A5と同様の傾向がA17、A45、A77、A125、P2においても認められた。即ち、BSAは牛肉アレルギーのアレルゲンとして働き、

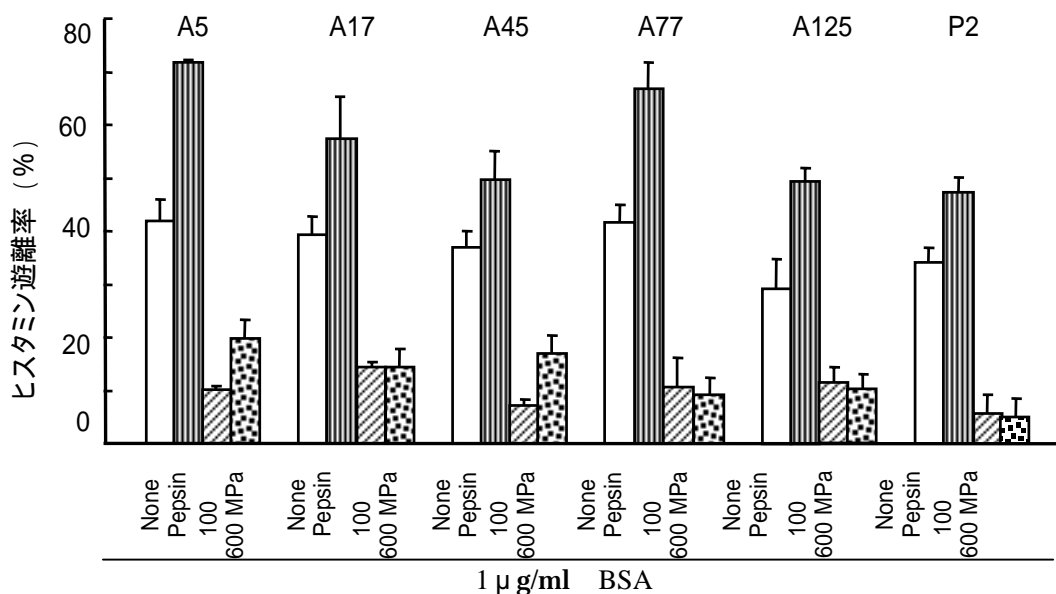


図3. ペプシン、加熱および超高圧処理したBSAがヒスタミン放出に及ぼす影響

マスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応を引き起こす、酵素処理で生じた BSA ペプチド断片はアレルギー性が高くなる、BSA によるマスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応は、高圧および加熱処理により低下するという 3 点が示唆される結果であった。食品のアレルギー性低減化に向けて高圧処理技術を役立てる試みは、加熱変性処理や酵素分解処理など他のアプローチに比べて少なく、IgE との結合性を評価するに止まった報告例がほとんどである。本研究では、細胞機能を指標としてより生体内で起こっている現象を反映した形でアレルギー性を評価した点で意義深いと思われる。現在、BSA にかける圧力とヒスタミン遊離率の関係を検討中である。これまでのところ、300 MPa 以上の圧力をかけると、有意にマスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応を低下させる、つまりアレルギー性が低減化される結果を得つつある。圧力の強度に比例してヒスタミン遊離率が低下し、600 MPa を超える圧力をかけることが出来ればさらなるアレルギー性低減化に繋がることも考えられる。その一方で、圧力をかけ過ぎると味覚や食感など食品としての価値が損なわれることが知られている。諸条件を総合的に判断したうえで圧力処理技術を用いなければ、製品として受け入れられないであろう。

鶏卵タンパク質についてのデータは示さないが、鶏卵白を超高圧処理することでオボムコイドとリゾチームが減少し、600MPa ではそれぞれ無処理の 80%と 70%に低下した。ペプシンとパンクレアチンで連続消化することでオボムコイド量は低下し、600MPa では無処理未消化の 7%に低下した。特にリゾチームは 600MPa 加圧により消化性が高まった。超高圧処理により鶏卵白オボムコイドとリゾチームのアレルギー性を低下できることが示唆された。

本研究プロジェクトを通じて、高圧処理が食品のアレルギー性を低減化できる可能性が示された。今後、そのメカニズムについて検討していく予定である。現在、BSA は高圧処理すると構造にどのような影響を受けるのか、変性しているのかという点について検討中である。また、IgE との結合状態や IgE を介したマスト細胞や好塩基球の細胞内情報伝達などの点も検討していく予定である。

プロジェクト成果の発表（論文名，発表者，発表紙等，巻・号，発表年等）（別紙可）

論文
なし

学会発表

鈴木敦士、原 崇、小山英晶、野上直行、松野正知、小谷スミ子「牛肉アレルギー患者血清とヒト好塩基球様 KU812F 細胞を用いたヒスタミン遊離試験による超高圧処理牛血清アルブミン（BSA）のアレルギー性評価」
日本農芸化学会 2003 年度大会[東京]・大会講演要旨集、p.204（2003 年 4 月）