

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K12707

研究課題名（和文）エビ由来タンパク質の低アレルゲン化技術の開発とアレルギー体質改善への可能性

研究課題名（英文）The development of allergenicity suppressing technique for prawn allergen and the evaluation for immuno-tolerance inducing effect

研究代表者

菰田 俊一（Komoda, Toshikazu）

宮城大学・食産業学群（部）・准教授

研究者番号：50404843

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：耐熱性のエビ由来のアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化技術として、メイラード反応による化学修飾が有効であるか評価した。メイラード反応は、タンパク質と糖類を結合させる反応であり、糖との複合体を形成することで、その化学性性質が影響を受ける場合がある。この反応物を評価した結果、まず、試験管レベルで抗体反応性への効果を確認できた。さらに、マウスを使ったモデルで、低アレルゲン化に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、甲殻類由来のアレルゲンタンパク質を糖類により化学修飾することで、そのアレルゲン性を低減化できることを示した。本研究で用いた方法は、食品の加工や調理で一般的に用いられるメイラード反応を利用したものである。これまで、当該アレルギーが原因でエビ・カニを摂取できなかった罹患者がこれを摂取できるようになる可能性が示された。また、同様に他のアレルゲンタンパク質においても本手法が応用できる可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the Maillard reaction as an allergenicity suppressing technique applying for heat tolerance prawn allergen. In our research, we identified the possibility of this Maillard reaction using for the antibody recognition disruption effect in vitro study. Moreover, we observed the allergy symptom suppressive effect on the Maillard reactant in our in vivo study.

研究分野：食品衛生学

キーワード：メイラード反応 甲殻類 アレルギー エビ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食物アレルギーに関して、関心が集まり、これに対して様々な取り組みがなされつつあった。近年の疫学的な調査では成人の約 20-50 人に 1 名がエビ・カニ等の甲殻類アレルギーの症状を示し、成人の食物アレルギー原因食品の第 1 位となっている。この中で、研究者はアレルギータンパク質の低アレルギー化技術に着目していた。当時の研究として、いくつかの食物アレルギーの原因タンパク質を化学修飾することで、アレルギー性が減弱化する可能性があることが、報告がされていた。また、アレルギー性の減弱化とは別に、動物レベルの研究として、アレルギーを持つマウスが、多糖類を摂取すると、アレルギー体質が改善されるとの報告もされてきていた。研究者は、豪州・RMIT 大学において、1 年間海産物アレルギーの原因タンパク質に関する調査研究に就いてきており、特にエビ・カニに含まれるアレルギータンパク質(トロポミオシン、TM)の抽出精製や遺伝子組み換え技術による発現、精製などを行っていた。先行研究として、ホタテやイカ、ソバなど食品由来のアレルギータンパク質やスギ花粉由来のアレルギータンパク質では、メイラード反応により、タンパク質と糖類を結合させると、アレルギー性が減じられる例が報告されていた。ただし、同様の処理を行ったとき、アレルギータンパク質の種類によっては、逆にアレルギー性が増す可能性がことも示されていた。一方でエビ・カニ由来のアレルギータンパク質に関しては、糖との複合体がアレルギー性に対してどのような効果があるかに関して、ほとんど報告がされていなかった。

2. 研究の目的

(1) エビ由来アレルギータンパク質の化学修飾を使ったアレルギー性低減化

本研究では、エビ由来のアレルギータンパク質を例として、低アレルギー化技術の開発、およびこれを利用した低アレルギー化食素材の開発と応用に関する取り組みを行う。低アレルギー化の方法としては、還元糖による化学修飾(メイラード反応)および酵素反応(トランスグルタミナーゼ)によるタンパク修飾を試みる。

(2) 低アレルギー化エビタンパク質を用いた免疫寛容誘導の可能性評価

低アレルギー化したエビタンパク質を長期間摂取して、免疫耐性を促しエビアレルギー体質の改善ができるか、マウスを使った動物レベルの評価を行う。

3. 研究の方法

(1) エビ由来アレルギータンパク質の抽出精製と化学修飾

①エビアレルギータンパク質(トロポミオシン、TM)の調製

エビ TM は、耐熱性を持つため、市販のブラックタイガー種のエビを煮沸することにより抽出した。はじめにエビの筋肉部分を細かく切り、リン酸緩衝液中で、十分に煮沸したのち、ブレンダーにてさらに粉砕作業を行った。粉砕後、遠心分離により固体部分を取り除き、硫酸沈殿により簡易精製した。その後、SDS-PAGE により抽出したタンパク質を確認したところ、約 37kDa 付近に主要なタンパク質を確認し、これを粗 TM タンパク質とし、以下の研究に供した。

②メイラード反応を用いたエビ TM の化学修飾

エビ TM と糖類を乾燥条件下、60°C~80°C で加熱し、TM-糖複合体を作成した。エビ TM と反応させた糖類としては、単糖類としてリボース、多糖類としてガラクトマンナンを用いた。

③化学修飾 TM の精製

エビ TM は、糖類と複合体を形成するとき、大きく 2 つの種類の複合体ができることが分かった。1 つは、TM と糖が単純に結合したもの、他方は TM と糖が複雑に結合し合い、多重化(クロスリンク)したものであった。前者と後者を比べると、主要な生成物は後者の方で、本研究では後者の多重化した複合体を次の試験に用いることとした。多重化(クロスリンク)した TM-糖複合体は、水に不溶性であったため、蒸留水を用いて TM-糖複合体を洗浄することにより簡易精製して試験に供した。

(2) 簡易モデルによる TM-糖複合体の評価 (*in vitro*)

①化学修飾された TM は、SDS-PAGE、ウェスタンブロットティング、ドットブロット法により確認した。

(3) モデルマウスを用いた TM-糖複合体の評価 (*in vivo*)

①アレルギーマウスの作成

C3H/HeJ(Q)マウスにエビ TM とアジュバント(Alum)を腹腔内投与することで、感作を行った。期間は 2 週間、1 週間に 1 度接種、計 3 回感作した。感作の前後で採血を行い、血中の TM 特異的 IgG 抗体及び TM 特異的 IgE 抗体の評価を行った。

②発症試験

発症試験は、TM または化学修飾 TM を腹腔内に投与することによって行った。腹腔内投与の前後で採血を行い、血中へのヒスタミン(炎症中間物質)放出を指標として、発症の有無を評価し

た。

(4)モデルマウスを用いた低アレルゲン化エビタンパク質の長期投与と免疫寛容誘導の可能性評価

①長期投与

エビ TM により感作を行ったマウス(C3H/HeJ, ♀)に、TM または化学修飾 TM を通常の餌と一緒に 4 週間経口的に投与した。

②長期投与による免疫寛容誘導の評価

免疫寛容評価は、次の指標を用いて評価した。①長期投与の前後における TM 特異的 IgG 抗体及び TM 特異的 IgE 抗体の変化、②長期投与後の発症試験における血中ヒスタミン濃度の評価、③T 細胞の分化に関するシグナル(IL-4、IFN- γ)による Th1/Th2 のバランス評価を行った。

4. 研究成果

(1) エビ由来アレルゲンタンパク質の抽出精製と化学修飾

①単糖類のリボースは最大 7 時間の反応で十分に糖-タンパク質複合体を形成することが分かったが、多糖類のガラクトマンナンの場合には、反応のスピードが遅く 1 週間程度の反応時間が必要であった。

(2) 簡易モデルによる TM-糖複合体の評価 (*in vitro*)

①TM と単糖類のリボースの複合体(TM-リボース)および TM と多糖類のガラクトマンナンの複合体(TM-ガラクトマンナン)共に、単純な複合体(低分子側)とクロスリンク複合体(高分子側)の両方が見られた。この際、主要な生成物はクロスリンク複合体であった。また、このクロスリンク複合体は水に不溶性であったため、蒸留水による洗浄を行うことにより、簡易精製を行い、次の試験に供した。

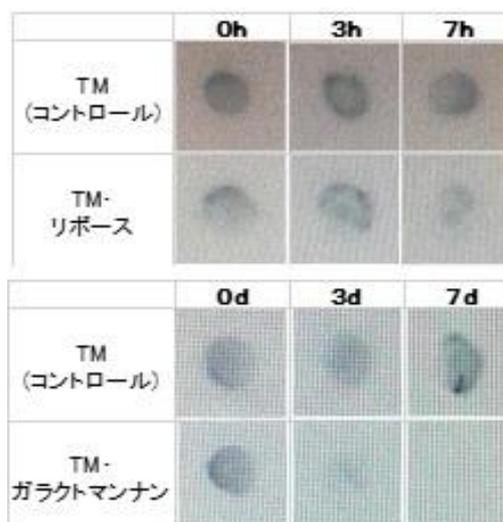
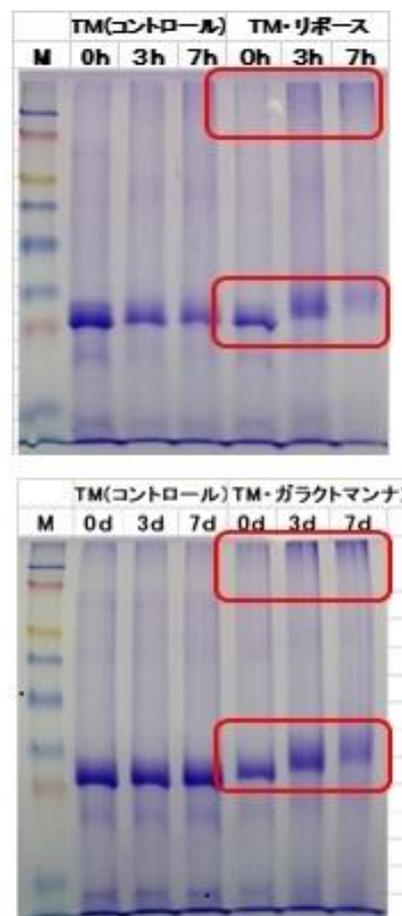
②ドットブロット法により、TM の糖修飾前後における、抗体反応性の変化を確認した。この結果、今回用いた抗体(mac141, 抗トロポミオシン IgG 抗体)では、化学修飾 TM において抗体反応性が低下していることがわかった。

(3) モデルマウスを用いた TM-糖複合体の評価 (*in vivo*)

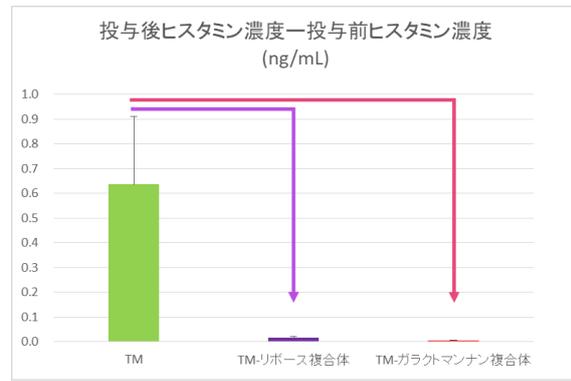
①C3H/HeJ(♀)マウスにエビ TM を摂取してアレルギーマウスを作成した。また、このアレルギーマウスを用いて、TM-リボースと TM-ガラクトマンナンのアレルゲン性を評価した。アレルギーマウスにアレルゲンの TM を接種したときと比べて、これらの TM-糖複合体を接種したときは、血中へのヒスタミン放出が抑制され、アレルゲン性が低減化されていることが示された。

(4) モデルマウスを用いた低アレルゲン化エビタンパク質の長期投与と免疫寛容誘導の可能性評価

①アレルゲン性の低減化が確認された TM-リボースと TM-ガラクトマンナンを、4 週間アレルギーマウスに経口投与し、免疫寛容に関して誘導化活性があるか評価を行った。投与開始時から経時的に採血を行い、特異的 IgG、特異的 IgE の推移を確認した。マウスが感作された(アレルギーマウス)のを確認した後、このマウスにアレルゲンタンパク質を投与し、発症試験を行った。さらに、解剖を行い、関連シグナルの分泌を確認するため、臓器を取り出した。解剖にて得た脾臓から RNA を



抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、T 細胞の分化に関わるシグナル(IL-4、IFN- γ)の分泌を評価した。この結果、今回行った 4 週間の投与では、免疫寛容に関わる明確な効果を確認することはできなかった。ソバアレルギータンパク質やスギ花粉アレルギータンパク質を用いた同様の先行研究においては、約 8 週の経口投与において効果が見られると報告がされている。このことから、今回の条件が適正でないことにより、明確な結果が得られていない可能性があり、今後はより詳細に条件を設定し、評価を行う必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 40
2. 論文標題 化学修飾によるアレルギー性低減化の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 69-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 39
2. 論文標題 甲殻類アレルギー，食品化学の立場から	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 60-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 39
2. 論文標題 甲殻類アレルギーに対する食品化学からのアプローチ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 76-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 38
2. 論文標題 エビ・カニ由来アレルギーの化学修飾による低アレルギー化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 70-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 38
2. 論文標題 海産物アレルギータンパク質の化学修飾による低アレルギー化技術の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 80-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 2
2. 論文標題 化学的手法による海産物アレルギータンパク質の改変	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 52-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 3
2. 論文標題 甲殻類アレルギーの現状と対応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 62-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 37
2. 論文標題 エビ由来タンパク質の低アレルギー化技術の開発とアレルギー体質改善への可能性、アレルギーの臨床	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 54 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 37
2. 論文標題 海産物アレルギーの現状と化学的低アレルギー化の可能性	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 74 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 38
2. 論文標題 海産物アレルギーの現状と化学的低アレルギー化の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 51 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 38
2. 論文標題 海産物アレルギーの現状と化学的低アレルギー化の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 77 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菰田俊一	4. 巻 38
2. 論文標題 エビ・カニ由来アレルギーの化学修飾による低アレルギー化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 70 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 春菜、目黒 帆乃佳、菰田 俊一
2. 発表標題 糖修飾エピアレルゲンタンパク質のモデルマウスによるアレルギー性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----