

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：85502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700864

研究課題名(和文) 甲殻類アレルギーリスクと摂食方法の関係に関する研究

研究課題名(英文) Relationship between a shrimp allergy risk and cooking or freshness.

研究代表者

臼井 将勝(usui, masakatsu)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・講師

研究者番号：50399656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：エビアレルギーリスクと摂食方法の関係について明らかにするために、主要アレルゲンであるトロポミオシンの熱安定化因子を構造解析等により検討した。その結果、単純な立体構造、高い水溶性、高い構造可逆性が抗原性保持に寄与することが明らかとなった。また動物試験の結果、加熱は生体内での抗原性低減化にも有効でないことが示唆された。さらに、エビ可食部に含まれる抗原濃度は、加熱調理の有無に係わらず非常に高濃度であること、加熱により溶出率が高くなること、鮮度低下時にも十分に維持されることなどが明らかとなった。以上の結果から、陽性患者がエビを摂食することは、加熱や鮮度に係わらず非常にハイリスクであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We purified tropomyosin from raw kuruma prawn and identified it as Pen j 1. CD spectra of native Pen j 1 revealed the alpha-helical structure, which collapsed easily upon heating to 80 degrees C. However, there were no insoluble aggregates after heating, and the protein regained its native CD spectral pattern after cooling to 25 degrees C. There was no significant difference in total IgG production between mice sensitized with native and heated Pen j 1. These results suggest that heat-denatured Pen j 1 refolds upon cooling and maintains its antigenicity following heat treatment. We also clarified that regardless of the existence of heating, high-concentration Pen j 1 is contained in a shrimp. And the elution rate of Pen j 1 of a heating shrimp was higher than the raw shrimp. In addition, Pen j 1 concentration was maintained also the low freshness shrimp. These results suggested that even if it is high freshness or heating, it will be high-risk for positive patients to eat a shrimp.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学 食生活学

キーワード：エビアレルギー トロポミオシン 抗原構造 熱安定性 加熱調理 鮮度 抗原濃度 リスク評価

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲殻類アレルギーは、学童期から成人期の食物アレルギーの中で患者数が最も多く、耐性の得られにくいアレルギーである。また同アレルギーは、比較的高頻度にアナフィラキシー(食物依存性運動誘発を含む)ショック症状を惹き起こす危険度の高いアレルギーである。このような背景より、本国でも厚生労働省が平成20年6月に食品に「えび・かに」を使用した場合の表示を義務付ける制度改正を行い、特定原材料に指定されている。これらの主要アレルギーは「トロポミオシン」である事が良く知られ、「えび・かに」等の甲殻類ではアミノ酸配列で90%以上の相同性を有し、表示が奨励されている「あわび・いか」においても、交叉性の高い共通アレルギーとなっている。

(2) しかし、甲殻類アレルギーに関する研究は、比較的少なく、食品科学的、生化学的な理解もあまり進んでいなかった。特に水産物特有の加工や鮮度に対するアレルギー関連の研究は少なく、甲殻類ではトロポミオシンが熱安定アレルギーである事が知られているが、加工等による食材レベルのリスク変化についてはあまり知られていなかった。すなわち「過熱すると(または鮮度低下により)リスクが高くなるのか、低くなるのか、変わらないのか」について明確になっていなかった。そのため、インターネット上の一部の団体や個人のHPなどで「患者Aの場合、生食は不可だが加熱食は可」「患者Bの場合、鮮度低下時にのみ発症」「加熱が有効」「エビ煎餅は高温で処理するためリスクが下がる」など科学的根拠の無い対処法や事例が多数紹介されていた。アレルギー患者の増加が進む現代において、このような不確実・不正確な情報の氾濫は、消費者の混乱を招くだけでなく深刻な健康被害につながる可能性もあった。平成22年10月29日に消費者庁が行った「アレルギー患者が食べられる」と称する卵の販売サイトに関する注意喚起のように、甲殻類においても、リスクに対する理解が不十分なため、同様の問題が発生する事が十分に予想された。ゆえに、アレルギーリスク管理・指導の適切な目安となる科学的情報の把握は必須であった。

(3) 2010年にLiuらがエビトロポミオシンとIgE抗体の結合阻害に対する「加熱」の有効性について報告しているが(Guang-Ming Liu他5名, J. Food Science, 75(1), T1-5, 2010)、申請者らのこれまでの研究で、エビトロポミオシンは繰返し過熱しても、冷却後、ほぼ同じ立体構造を取り戻し、単独では抗原性に影響するような変性・凝集はほぼ起こらない事が明らかになりつつあった(臼井将勝他, 日本農芸化学会2011年度大会, 京都)。これらの矛盾を解決するためには、加熱等による抗原性への影響(in

vivo, in vitro)などを精査する必要があるが、このような研究は行われておらず、さらなる調査・研究が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、生体が入手可能なクルマエビを主な研究材料とし、主要アレルギーである「トロポミオシン」を対象に研究を行った。具体的には、甲殻類アレルギーリスクと加工および鮮度との関連の有無について検討するために、以下の3点について明らかにすることを旨とした。

(1) 加熱前後でのトロポミオシンの構造と抗原性の変化についての生体・分子レベルでの解析

(2) 生食と各加熱調理食でアレルギー発症リスクに差があるか否かの検討

(3) 鮮度や貯蔵によりアレルギー発症リスクに変化があるか否かの検討

(1)の加熱での構造と抗原性の変化については、現在までに円二色性分散計による二次構造解析により「過熱抽出したトロポミオシンの二次構造は、繰返し加熱してもほぼ変化しない」ことが明らかになりつつあった。そこで、本研究では未加熱で抽出・精製したトロポミオシンと加熱したトロポミオシンの円二色性分析に加え、マウスでの抗原性の調査を行い、加熱ストレスがトロポミオシン分子におよぼす影響とそれによる抗原性の変化の有無を明らかにすることを旨とした。(2)(3)については、各条件の食品レベルでのアレルギーリスクすなわち抗原濃度(アレルギー暴露リスク)について検討し、食品レベルでの抗原量増減の実態について明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) エビ主要アレルギー「トロポミオシン」の非加熱精製

トロポミオシン(以降TMと省略して記載)は解凍生クルマエビ可食部(尾部)を試料とし、Shantiらの方法を基に一部改変した方法で精製した(Shanti K. N.他4名, J. Immunol., 151(10), pp.5354-63, 1993)。具体的には、破碎したエビ剥き身に10mM 2-ME + 1M KCl-20mM Tris-HCl(pH 7.5)を加え、4にて一晩抽出し、60%飽和硫酸にて塩析、pH 5.2にて等電点沈殿を行い、イオン交換クロマトグラフィーにて分離した。SDS-PAGEにて単一のバンドが得られるまで精製し、脱塩・凍結乾燥したものを非加熱TMとした。これを50mM Tris-HCl(pH 7.5)またはPBSに溶解したものを用い、100で10分間加熱したものを加熱TMとして用いた。

(2) 加熱・非加熱トロポミオシンの二次構造解析

TMの二次構造解析は、円二色性分散計(CD)を用いて行った。TMの熱変性曲線は、222 nmにおけるCDスペクトルの楕円率の変

化モニタリングにより求めた。CD 測定は、蛋白質濃度 1 mg/ml となるように PBS を用いて調製して、spectropolarimeter Jasco J-600 にて行った。温度上昇は毎分 1°C とし、10°C から 80°C の範囲で測定した。非加熱および加熱 TM の構造解析は、それぞれ 25、46、80 で 200~260nm の範囲での CD スペクトルを測定して比較した。

(3) 加熱・非加熱トロポミオシンのマウスでの負荷応答試験

加熱による TM の抗原性変化は、TM 感作マウス (BALB/c, オス, 6 週齢) への負荷応答試験により評価した。具体的には、コンベンショナル条件下で精製飼料にて馴化・飼育した BALB/c マウスに、予め非加熱精製 TM 20 μ g を水酸化アルミニウム 2 mg を皮下投与して感作させた後に、加熱または未加熱精製 TM 20 μ g を水酸化アルミニウム 2 mg と共に皮下投与し、抗非加熱 TM - IgE 抗体量を測定し、両 TM の抗原性の差異を解析した。

(4) クルマエビの調理法

クルマエビの各調理は、始めに解凍クルマエビ (-80) の内臓を十分に避けて頭部および胸部を切除した後に、可食部の殻、尾、背わたを取り除いて使用した。生(無処理)、茹で、焼き、蒸しの 4 種類の調理エビを実験に用いた。茹でクルマエビは、1 尾当たり 50 ml のイオン交換水を加え 100 で 5 分間茹でたものを使用した。焼きクルマエビは、フライパン上にて 180 で 5 分間(片面 2 分 30 秒)加熱したものを使用した。蒸しクルマエビは、蒸し調理器で 5 分間蒸したものを使用した。

(5) 貯蔵によるクルマエビの鮮度低下の再現

活クルマエビをイオン交換水にて洗浄し、内臓を十分に避けて頭部および胸部を切除した直後(殻付き)のもの(alive, 0 h), 4 で 24 時間保存したもの(4 , 24 h), 4 で 72 時間保存したもの(4 , 72 h), 25 で 24 時間保存したもの(25 , 24 h), 活クルマエビを - 80 で冷凍し解凍したもの(frozen, 0 h: 調理エビの「生」と同義のためデータを共用した)を実験に用いた。

(6) 各条件下でのトロポミオシンの抽出

各調理後に可食部を正中線に沿って左右均等に切断し、一方を生理的抽出法、他方を総タンパク質抽出法に供した。各クルマエビ可食部を密閉型ホモジナイザーチューブ DT-20 (IKA ジャパン株式会社, 大阪) で破碎した後に、1 g \times 3 サンプルを採取して各抽出法にて抽出を行った。生理的抽出法には PBS を使用した。破碎後に秤量した各クルマエビ可食部 1 g に、20 倍量の PBS を加えて、37 で 1 時間振とうさせて抽出した。振とう機はアレルギー検査用振とう機 MMS-3011 (東京理化器械, 東京) を用い、振とう速度は 120 往

復/分、振とう幅は 3 cm とした。各抽出液は 2,900 \times g, 30 min, 4 で遠心分離し、上精を回収した後に - 30 にて冷凍保存した。総タンパク質抽出法には FA テスト 抽出用試薬「ニッスイ」を使用した。生理的抽出法と同様に破碎した各クルマエビ可食部 1 g に 20 倍量の検体抽出液を加えて、20 時間振とうして抽出した。振とう温度は 25 , 振とう回数は 1 分間に 120 往復、振とう幅は 3 cm とした。各抽出液は 2,900 \times g, 30 min, 4 で遠心分離し、上精を回収した後に - 30 にて冷凍保存した。

(7) トロポミオシンの定量

エピトロポミオシンの定量は FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」を使用して ELISA 法にて行った。抽出液に含まれるサンプルを同キットの測定範囲内となる様にサンプル希釈を行った。生理的抽出液は、標準品希釈液を用いて 200,000 倍となるように希釈した。総タンパク質抽出液は、標準品希釈液を用いて 500,000 倍となるように希釈した。ELISA はキットのプロトコールに従って行った。抗体固相化プレートの各ウェルに、各トロポミオシン標準溶液、希釈溶液を 100 μ L ずつ添加し、25 条件下で 1 時間反応後、Biotrak Plate Washer を用いて 300 μ L/well の洗浄液で 5 回繰り返し洗浄を行った。酵素標識抗体液を 100 μ L/well 添加し、25 条件下で 1 時間反応後、Biotrak Plate Washer を用いて 300 μ L/well の洗浄液で 5 回繰り返し洗浄を行った。酵素基質液を 100 μ L/well 添加し、室温、遮光下にて 10 分間反応させ、反応停止液を 100 μ L/well 添加した。反応停止から 30 分以内にマイクロプレートリーダー (MTP-450 Lab, コロナ電気株式会社, 茨城) にて主波長 450 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) エビ主要アレルゲンの非加熱精製と同定

エビ類の主要アレルゲンであるトロポミオシンを、解凍生クルマエビ可食部を試料とし、加熱と変性剤を用いない方法で精製した。すなわち、エビ可食部抽出液を硫酸分画、等電点沈殿、イオン交換クロマトグラフィーにて精製し、SDS-PAGE にて約 35 kDa の位置に単一のバンドを示すタンパク質を得た。エビ陽性患者血清を用いたイムノプロットおよび MALDI-TOF-MS による PMF 分析にて、同タンパク質をクルマエビアレルゲン Pen j 1 と同定した。

(2) 非加熱 Pen j 1 の熱安定性解析

非加熱 Pen j 1 の熱安定性解析の結果、30 付近から - ヘルリックスの崩壊が観察され、60 で完全に崩壊し、変性転位点は 46 であった。このことから、Pen j 1 は高い熱安定性は有していないことが確認された。

(3) 加熱・非加熱 Pen j 1 の二次構造解析
 100 で10分間加熱した後に25 に冷却した加熱 Pen j 1 と非加熱 Pen j 1 の間に二次構造の顕著な違いは見られなかった。さらに46、80 での二次構造解析においても加熱・非加熱ともに同様の温度上昇に伴う構造変化が見られた。このことは Pen j 1 が高い構造可逆性を有することを示唆しており、加熱後も一定の温度以下に冷却されると非加熱と同様の抗原構造を回復することが予想された。

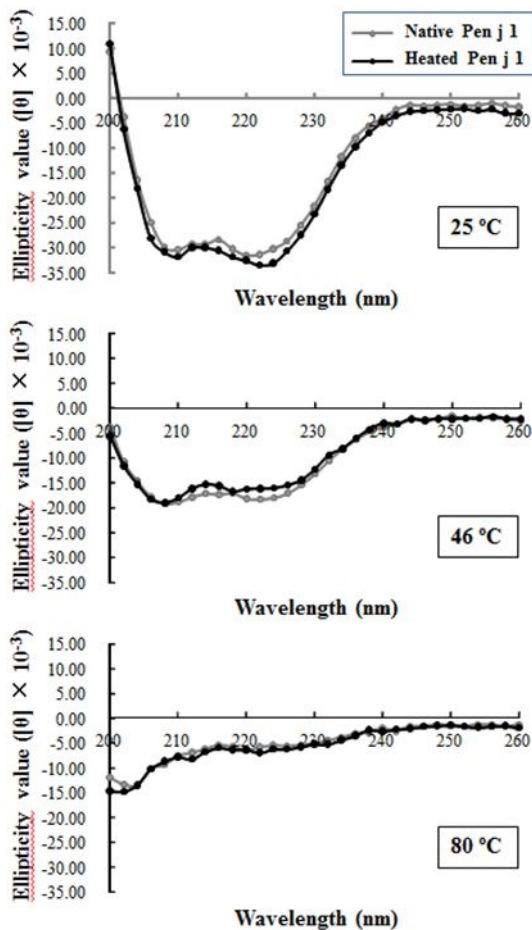


図1 Pen j 1 の二次構造解析結果

各測定温度での未加熱 Pen j 1 のスペクトルを灰色、加熱 Pen j 1 のスペクトルを黒色で示す。

(4) 加熱・非加熱 Pen j 1 のマウスでの負荷応答試験

加熱による Pen j 1 の抗原性変化を Pen j 1 感作マウスへの負荷応答試験により評価した。すなわち、非加熱精製 Pen j 1 で感作したマウスを3群に分け、それぞれ加熱、非加熱 Pen j 1、PBS のみでの boost し1週間後に血清中の抗 Pen j 1 抗体酸性レベル (TgE, 総 IgG, IgG1, IgG2a) を測定した。その結果、非加熱群に比べて加熱群で IgG2a のみ産生量の有意な減少が見られたが、アレルギーリスクの低減化を示唆するものではなかった。この結果は、(3) の2次構造解析結果と一致

しており、加熱後も Pen j 1 としての抗原構造を維持(回復)していることが明らかになった。このことから加熱処理が有効でないという知見が得られた。

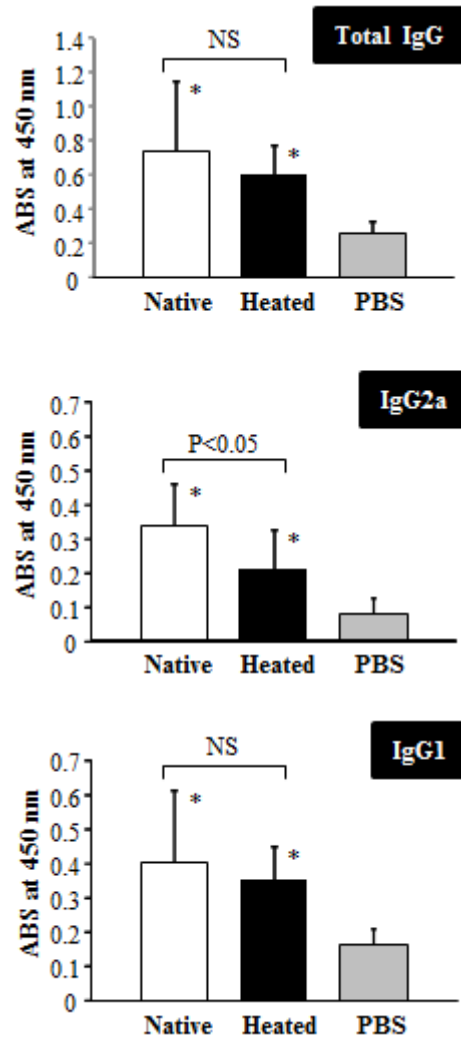


図2 in vivo における各 Pen j 1 の抗原性
 Native は未加熱 Pen j 1 で追加免疫したマウスの血清を、Heated は加熱 Pen j 1 で追加免疫したマウスの血清を意味する。

(5) 加熱調理エビに含まれるトロポミオシンの定量

各抽出液中のトロポミオシン濃度を ELISA にて定量した結果、各調理エビの生理的抽出液では、生エビ抽出液に比べて、茹エビ、焼きエビ、蒸しエビ抽出液のエピトロポミオシン濃度が有意に上回った ($P < 0.005$)。各調理エビ6尾のトロポミオシン濃度の平均値は、生エビ抽出液に対して、蒸しエビが8.8倍、焼きエビが10.3倍、茹でエビが6.9倍であった。さらに、茹でエビと蒸しエビおよび焼きエビの間でもトロポミオシン濃度の有意な差が見られたが(それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$)、平均値の差は35%未満で生エビに対する差に比べて顕著ではなかった。各調理エビの総タンパク質抽出液では、トロポミオシン濃度に調理方法の違いによる有意な差は確認さ

れなかった。以上の結果より、生理的条件下におけるエビアレルゲンの溶出率は加熱調理時に有意に上昇することから、ある程度リスク増加がおこると考えられた。

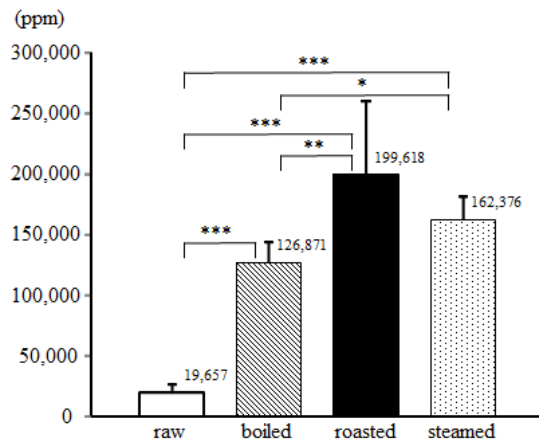


図3 各調理エビの生理的抽出液中のトロポミオシン濃度

各カラム右上の数字は平均値を示している。有意差は Student's t-test によって判定した。有意差検定の結果、 $P < 0.005$ であったものを***, $P < 0.01$ であったものを**, $P < 0.05$ であったものを*で示す。

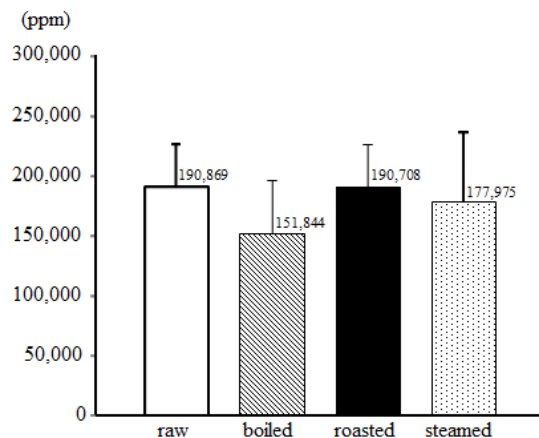


図4 各調理エビの総タンパク質抽出液中のトロポミオシン濃度

各カラム右上の数字は平均値を示す。有意差は Student's t-test によって判定した結果、各群間に有意な差は見られなかった。

(6) 異なる鮮度のエビに含まれるトロポミオシンの定量

各抽出液中のトロポミオシン濃度を ELISA にて定量した結果、生理的抽出液では、腐敗エビ群において、他の4群に対してエビトロポミオシン濃度の有意な上昇が確認された ($P < 0.005$)。総タンパク抽出液では、腐敗エビ群において、活エビ群、短期冷蔵エビ群と比較してエビトロポミオシン濃度が有意な減少が確認された ($P < 0.01$)。さらに中期冷蔵エビ群において活エビ群、短期冷蔵エビ群に

対してエビトロポミオシン濃度の有意な減少が確認された ($P < 0.05$)。以上の結果より、生理的条件下におけるエビアレルゲンの溶出率は腐敗時に有意に上昇することから、ある程度リスク増加がおこると考えられた。また、総トロポミオシン量は腐敗と共に徐々に減少していくことが示唆されたが、腐敗クルマエビ群の総タンパク抽出液中のエビトロポミオシン濃度は 166,627.2 ppm であり、表示義務は数 ppm 以上であることから、新鮮なクルマエビが、鮮度が落ちたものに比べてアレルギー発症リスクが低いという表現は非常に不適切であると判断された。

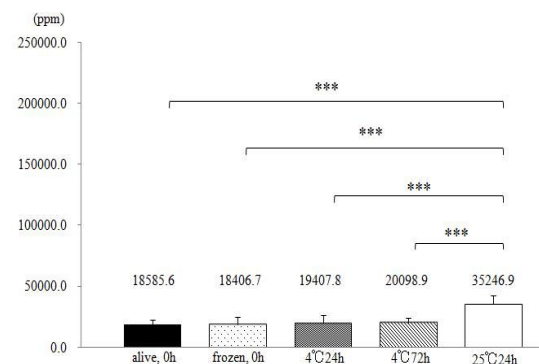


図5 各鮮度エビの生理的抽出液中のトロポミオシン濃度

鮮度ごとに6尾のクルマエビにて抽出を行い定量した ($n=6$)。alive, 0h は活クルマエビ, frozen, 0h は冷凍, 4, 24h は短期冷蔵, 4, 72h は中期冷蔵, 25, 24h は腐敗を示す。有意差は Student's t-test によって判定した。有意差検定の結果、 $P < 0.005$ であったものを***で示す。

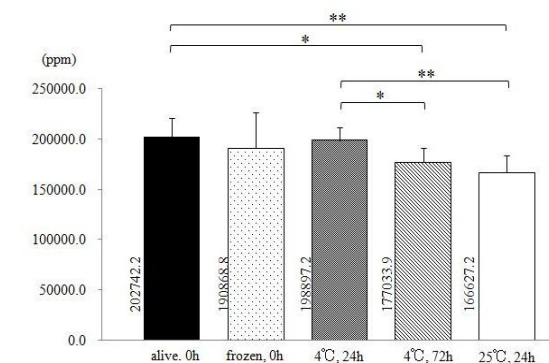


図6 各鮮度エビの総タンパク抽出サンプル中のトロポミオシン濃度

鮮度ごとに6尾のクルマエビにて抽出を行い定量した ($n=6$)。alive, 0h は活クルマエビ, frozen, 0h は冷凍, 4, 24h は短期冷蔵, 4, 72h は中期冷蔵, 25, 24h は腐敗を示す。有意差は Student's t-test によって判定した。有意差検定の結果、 $P < 0.01$ であったものを**, $P < 0.05$ であったものを*で示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Masakatsu USUI, Akihito HARADA, Takayuki ISHIMARU, Emiri SAKUMICHI1, Fumihiko SARATANI1, Chiho SATO-MINAMI1, Hiroyuki AZAKAMI, Taiko MIYASAKI, Ken'ichi HANAOKA, Contribution of Structural Reversibility to the Heat Stability of the Tropomyosin Shrimp Allergen, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 第 77 巻 5 号, pp.948 ~ 953

〔学会発表〕(計 3件)

臼井 将勝 他、クルマエビアレルゲン Pen j 1 の熱安定性獲得機構、日本農芸化学会中四国支部創立 10 周年記念支部大会、2012 年 9 月 21 日、山口

臼井 将勝、加熱処理がエビアレルゲントロポミオシンの抗原性に及ぼす影響、日本食品免疫学会第 8 回学術大会 (JAFI2012) 2012 年 10 月 16 日、東京

臼井 将勝 他、エビアレルギー発症リスクと調理または鮮度との関係、日本農芸化学会 2014 年度大会, 2013 年 3 月 29 日、神奈川

〔図書〕(計 3件)

臼井 将勝・田辺 創一、三共出版、わかりやすい食品機能学, 森田英利・田辺創一(編著)、2013、3 章第 2 節 脳・神経系の機能に關与する成分、pp. 85-93

臼井 将勝・田辺 創一、三共出版、わかりやすい食品機能学, 森田英利・田辺創一(編著)、2013、4 章第 1 節 免疫と免疫機能活性化・調節成分、pp.94-103

臼井 将勝、三共出版、わかりやすい食品機能学, 森田英利・田辺創一(編著)、2013、4 章第 2 節 アレルギーと抗アレルギー作用成分、pp. 103-117

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

水産大学校 HP 内 教員研究情報

<http://www.fish-u.ac.jp/kenkyu/sangakukou/sangakukou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 将勝 (Usui Masakatsu)

(独) 水産大学校・食品科学科・講師

研究者番号: 50399656

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

阿座上 弘行 (Azakami Hiroyuki)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 40263850