

助成番号 0158

食塩による食物アレルギーの抗原活性抑制効果

助成研究者：豊崎俊幸(香蘭女子短期大学 家政科)

抗アレルギーパンの開発を目的として今までに色々な角度から検討し、ここ数年で得られた知見として、鶏卵中のアレルゲン(主にオボムコイド)がグルテンとの相互作用によって、抗原活性の抑制あるいは消失を可能にするきわめて興味ある知見を得た。また抗原性の消失を決定する重要な成分として食塩含量の有無が大きく影響を与えている事実を新たに確認したが詳細については研究されていない。そこで本研究はDough形成時あるいは焼成パンのモデル系を作成し、それらの系において食塩が抗原活性を抑制させるものかを追跡することを主目的とし、併せアレルギー誘発タンパク質とNaClとの相互作用について様々な角度から検討した。

NaClのアレルギー活性の抑制効果を追跡する手段として、NaCl添加、無添加のDoughおよび焼成パンのモデル系を作成し、これら試料からアレルギー誘発タンパク質を抽出した試料について、Single radial immunodiffusion法およびELISA法を用いてアレルギー活性を測定した。また、Doughおよび焼成パンから祖タンパク質を抽出後、Trypsin-immobilised chitinカラムを用いたAffinity chromatographyによりアレルゲンを分離・精製した試料のアレルギー活性を測定した。

Doughあるいはその焼成パンから抽出した祖タンパク質のアレルギー活性を測定した結果、NaCl添加Doughあるいはその焼成パンにおいて、NaClのアレルギー活性の抑制効果を認めた。いっぽう、NaCl無添加の場合、Doughおよびその焼成パンのいずれもアレルギー活性の抑制効果は確認できなかった。NaClのアレルギー活性の抑制効果はDough発酵時間の延長とともに抑制効果は顕著に現れた。Doughあるいは焼成パンのアレルギー誘発タンパク質はDough調整時に添加したオボムコイドであった。NaCl添加Doughのオボムコイドは発酵時間の延長とともに高分子化する傾向が確認された。おそらくNaClによってオボムコイドの分子構造に何らかの作用を受けることで抗原活性が抑制されたものと推察された。

今回の実験でNaClは明らかにアレルギー活性を抑制させる作用のあることがわかった。今後はNaClとオボムコイドとの相互作用と、併せアレルギー活性の抑制機構について詳細に追跡する必要がある。

22

助成番号 0158

食塩による食物アレルギーの抗原活性抑制効果

助成研究者： 豊崎俊幸 (香蘭女子短期大学)

1. 研究目的

食物アレルギーに関する研究は、ここ数年多くの研究者らが様々な角度から研究し、様々な事実が明らかとされてきた¹⁾⁻⁵⁾。食物アレルギーを誘発する食物としては様々なものがあり、特定の食物を見つけ出すことは不可能である。また、食物アレルギーのアレルゲンのほとんどはタンパク質であり、さらにアレルゲンに関しても様々なタンパク質が知られており、特定のアレルゲンを検出することも不可能である。

ところで、平素主食としているパン類に存在しているタンパク質もアレルギーを引き起こすことがある。アレルゲンとしては、小麦粉由来あるいは製パン過程における副材料(例えば鶏卵)中のタンパク質が主な原因と考えられる。アレルギーを起こしやすい人は市販製パンを摂取することに抵抗を抱き、ほとんど摂取していないのが現状である。著者は抗アレルギーパンの開発を目的として今までに色々な角度から検討し、ここ数年で得られた知見として、鶏卵中のアレルゲン(主にオボムコイド)がグルテンとの相互作用によって、抗原活性の抑制あるいは消失を可能にするきわめて興味ある知見を得た。また抗原性の消失を決定する重要な成分として食塩含量の有無が大きく影響を与えていることを新たに確認した。しかし、食塩が抗原活性を抑制あるいは消失させる機構に関しては明らかにされていない。そこで本研究は、食塩が抗原活性を抑制あるいは消失させる事実の再確認を様々な角度から検討することを主目的とした。その結果、若干の知見が得られたのでそれらの内容について報告する。

2. 研究方法

2.1 試薬および試料

グルテン、オボムコイド (Type III)、オボアルブミン (Type VII) およびオボトランスフェリン (Type I)、リゾゾームは Sigma 社製のものを使用した。グルテンはナカライテスク社製のものを使用した。その他の試薬はすべてナカライテスク社製の特級を実験に供した。

2.2 人血清画分の分離

人血清は、Mirella ら⁶⁾の方法に準じて分離した。すなわち、K-EDTA(1.6mg/ml)を含む人血液を遠心分離器(2000 x g, 8分)で血清画分を得た。

2.3 Dough のモデル作成と焼成

できるだけ製パン過程に近い条件とした。すなわち、一定量の水の中に生イースト 2g、グルテン 200g、オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、オボマクログ

ロブリンおよびリゾソームのそれぞれ5gを加えた後、小型のミキサーを用いて混合した。その後一定量の食塩を加え、さらにミキサーを用いて20分間捏ね、さらにバター、ショートニングを一定量加え10分間捏ね Dough を作成した。その後、ホイロ中（湿度90%、30℃）で30分発酵させた。また、焼成は最終発酵35分後に180℃で30分行った。

2.4 ゲル (Affinity chromatography) 濾過法によるアレルゲンの分離・精製

Dough からのアレルゲンタンパク質画分を、Trypsin-immobilised affinity カラムクロマト法⁷⁾によって分離・精製した。

2.5 タンパク質量の測定

ゲル濾過によって分画された試料のタンパク質量は、Lowry 法⁸⁾によって測定した。

2.6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli の方法に準じて⁹⁾ 電気泳動を行った。すなわち Mini-Protean II Electrophoresis Cell (バイオラッド社製) を用いて、ゲル濃度の異なるレディーゲル J 18mA/ゲルで電気泳動を行った。泳動後、クーマシープリリアントブルー R250 を用いて染色した。また、Phast System 全自動電気泳動装置を利用した。

2.7 Single radial immunodiffusion による抗原活性の測定

Dough から得られた各画分のタンパク質について Single radial immunodiffusion を行った。1%の Agar を調製した中に人抗血清を加えた後、ガラス面上に4mmの厚さに Agar を均一にコーティングした。その後約2.5mmの穴をあけ、その中に Dough から得られた各画分のタンパク質を加え一昼夜（37℃）放置した後、得られた沈降輪の大きさを測定した。

2.8 競争阻害酵素免疫法 (ELISA) による測定

ELISA は Engvall and Perlmann らの方法¹⁰⁾ によって測定した。

3 結果および考察

3.1 Single radial immunodiffusion 法を利用した Dough タンパク質のアレルギー活性の測定と NaCl の影響

Dough から抽出した粗タンパク質溶液について、アレルギー活性の有無が、Single radial immunodiffusion 法を利用して測定できるものかを検討し、併せ NaCl の存在がアレルギー活性を抑制するものかを検討した結果を Fig. 1 に示した。Dough から抽出した粗タンパク質溶液を、一定量に調整したものを、血清中の IgE と反応することで沈降輪が出現する。この沈降輪の大きさがアレルギー活性の強弱を示すことから、この直径を測定することで、測定する試料の抗原活性が測定できる。

本実験でも Dough 粗タンパク質溶液の希釈率が低くなるとともに沈降輪の直径も小さくなる傾向が確認され、沈降輪の直径と Dough 粗タンパク質の濃度とは正の相関関係が確認された。このことから、本実験において、Single radial immunodiffusion 法を利用することで、アレルギー活性をある程度見積もることができるものと判断できた。そこ

で、NaClの濃度を变化させた Dough を作成した後、PBS 溶液で粗タンパク質を抽出した試料について、Single radial immunodiffusion 法を利用して測定した結果を Fig. 2 に示した。NaCl 添加量を増やすとともに沈降輪の直径が小さくなった。この結果から、Dough 形成時において、NaCl が抗原となるタンパク質に対して抑制的に作用していることが明らかとなった。

3.2 ELISA 法を利用したアレルギー活性の測定と NaCl の影響

Dough 粗タンパク質のアレルギー活性を ELISA 法を利用して測定した結果を Fig. 3 に示した。NaCl 添加濃度を高くした Dough ほど IgE との反応が抑制された。この結果は Fig. 2 の結果とよく一致した。このことは、NaCl が存在することにより、Dough 粗タンパク質の抗原活性が抑制されていることを強く示唆している。

次に Dough の発酵に対して、NaCl が抗原活性を有するタンパク質にどのような影響を与えているものかを検討した。NaCl 添加した Dough においては発酵時間 35 分間において、IgE との反応はほとんど変化なく抗原活性は抑制された。いっぽう、NaCl 無添加の場合、発酵時間とともに IgE との反応は増加する傾向を示した。この結果から、Dough 発酵段階において抗原となるタンパク質の生成を NaCl が抑制している新しい事実が確認できた。

3.3 Affinity chromatography によるアレルギー誘発タンパク質の分離・精製

Dough からの粗タンパク質にアレルギーを有するタンパク質の存在を確認したことから、そのタンパク質の分離・精製を試みた。本実験では Trypsin-immobilised chitin column を調整し、抗原タンパク質を pH6.5-7.5 の間で特異的に Chitin に結合させた後、pH を徐々に酸性側に移行することでタンパク質を溶出させた。NaCl 添加 Dough からの粗タンパク質を試料としてクロマトを行った結果を Fig. 5 に示した。また、Fig. 6 に NaCl 無添加の Dough から得られた粗タンパク質を試料としてクロマトを行った結果を示した。いずれも溶出パターンには大きな変化は確認されなかった。得られた画分の試料を SDS ゲル電気泳動によって抗原活性を有するタンパク質の同定を行った。その結果、添加したすべてのタンパク質 (Ovotransferrin, Ovomacroglobulin, Ovomuroid, Ovalbumin, Lysozyme) が溶出されたが、NaCl 添加、無添加での両者の溶出タンパク質に関して分子量には NaCl の影響は確認されなかった。このことは、少なくとも抗原タンパク質の三次構造の変化への影響はないものと推察できる。

3.4 分離・精製タンパク質のアレルギー活性と NaCl の影響

分離・精製し、得られた各タンパク質のアレルギー活性を ELISA 法を利用して測定し、どのタンパク質がアレルギー活性を呈するものかを検討し、併せ NaCl の影響について検討した結果を Fig. 8 に示した。Ovalbumin と Ovomuroid に強いアレルギー活性が確認された。また、NaCl が存在することで Ovomuroid のアレルギー活性は顕著に抑制された。このことから、Dough 抽出タンパク質のうち、アレルギー誘発タンパク質は、Dough 形

成時に添加した Ovalbumin と Ovomuroid であることが確認された。とくに NaCl が存在することによって、Ovomuroid は極めて強いアレルギー活性の抑制効果が確認された。NaCl が Ovomuroid とどのような機構でアレルギー反応を抑制しているのかは今回の実験では確認できなかった。今後検討する必要がある。

3.5 焼成したパンのアレルギー反応

実際に NaCl 添加と無添加でパンを製造した (Fig. 9)。焼成パンは NaCl 存在では弾力もあり、官能検査でも評価は高かった (Data not shown)。いっぽう、NaCl 無添加の場合、弾力も低下し、見た目も悪く官能検査でも評価は低かった (Data not shown)。

発酵時間を変化させた Dough を焼成した後、Ovomuroid の分子量に変化があるものかを検討した結果を Fig.10 に示した。NaCl 無添加の場合、分子量には変化はなかった。いっぽう、NaCl 添加の場合、発酵時間の延長とともに Ovomuroid の分子量は高分子化した。このことは NaCl が Ovomuroid の分子構造に何らかの影響を及ぼしていることが推察される。なお NaCl が Ovomuroid に対してどのような機構で分子構造を変化させているのかは不明である。

Fig. 11 に焼成パン後、粗タンパク質を抽出し、アレルギー活性を測定した結果を示した。NaCl 添加し焼成したパンは無添加パンに比較して明らかにアレルギー活性の抑制が確認できた。

これらの結果から、今回の実験で少なくとも NaCl は明らかにアレルギー活性を抑制させる作用のあることがわかった。

4. 今後の課題

今回の実験で明らかにとされた知見として、実際 Dough 作成時に添加する卵はアレルギーを誘発する Ovomuroid によってアレルギーを引き起こすが、NaCl は Ovomuroid に対してアレルギー活性を抑制させる効果を示すことが確認されたことである。ただ、NaCl がどのような機構で Ovomuroid に対して作用しているものかは不明であることから、今後この点について詳細に追跡することが必要である。また、アレルギーを誘発させる成分は小麦粉中のタンパク質が関与することも充分あることから、この点についても追跡する必要がある。

5. 引用文献

- 1) Fuchs RL and Astwood JD, Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technol* 50: 83-88 (1996).
- 2) Sampson HA, Food allergy. Part I: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103:717-728 (1999).
- 3) Buch RK and Hefle SL, Food allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr* 36: S119-S163 (1996).

- 4) Sampson HA and McCaskill CC, Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr* 107:669-675 (1985)
- 5) Crespo JF, Pascual C, Burks VA, Helem RM and Esteban MM, Frequency of food allergy in a paediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Ommunol* 6:39-43 (1995).
- 6) Mirella N, Massimo DA, Gianni T, Vincenzo G, Maurizio DF and Cristima S, Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med* 19:541-552 (1995).
- 7) Mine Y and Zhang JW, The allergenicity of ovomucoid and the effect of its elimination from hen's egg white. *J Sci Food Agric* 81:1540-1546 (2001).
- 8) Lowry, OH, Rosebrough, NJ and Farr, AL, Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:263-275 (1951).
- 9) Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1979).
- 10) Engvall E and Perlmann P, Enzyme-liked immunosorbent assay, ELISA. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109:129-135 (1972).

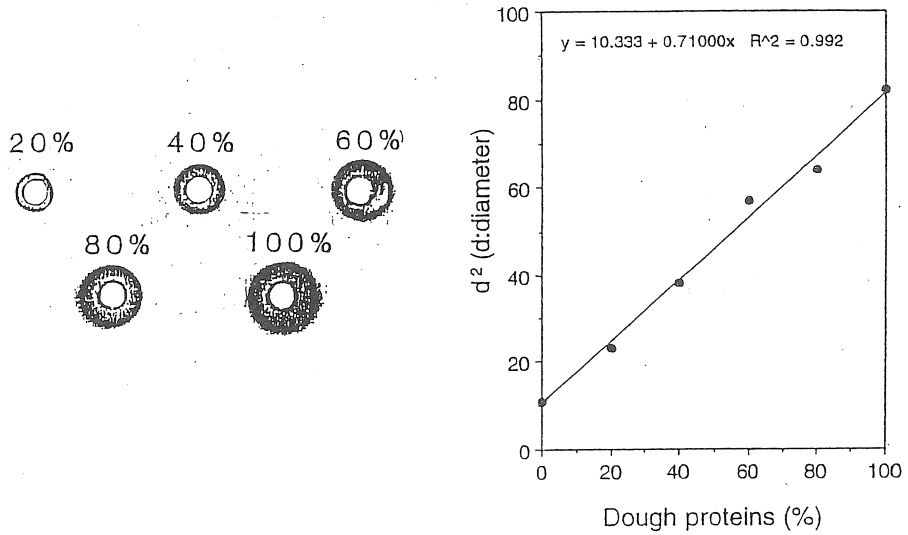


Fig. 1 Quantitative analysis of binding activity of human-specific IgE by single radial immunodiffusion method.

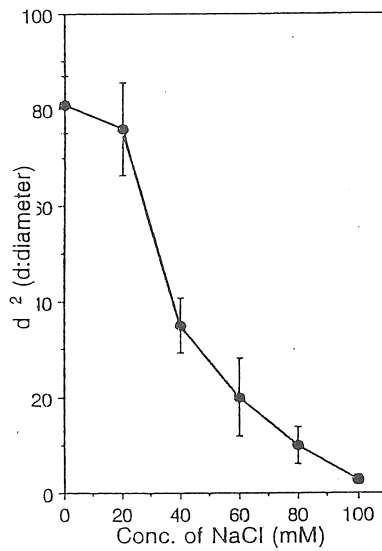


Fig. 2 Binding activity of human-specific IgE on the concentration of NaCl in dough.

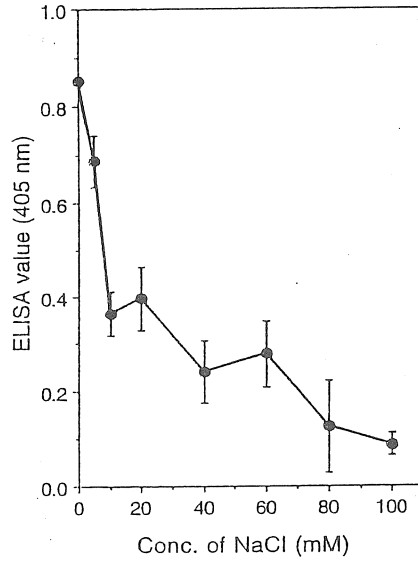


Fig. 3 Effect of the concentration of NaCl on the binding of human-specific IgE.

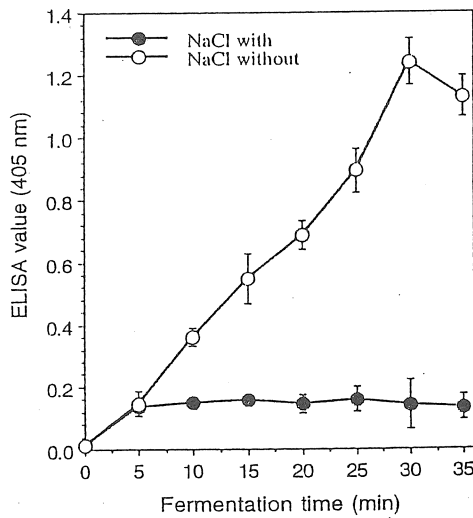


Fig. 4 Comparison of the binding of human-specific IgE on the fermentation time of dough.

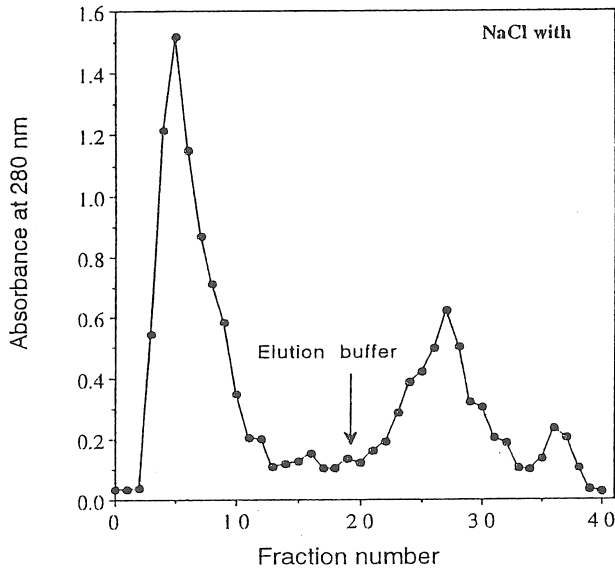


Fig. 5 Affinity chromatography of dough extract proteins on a trypsin-immobilised chitin column.

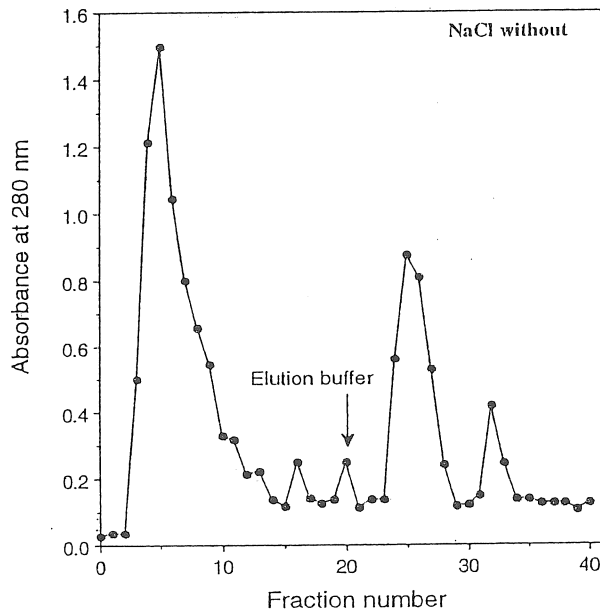


Fig. 6 Affinity chromatography of dough extract proteins on a trypsin-immobilised chitin column.

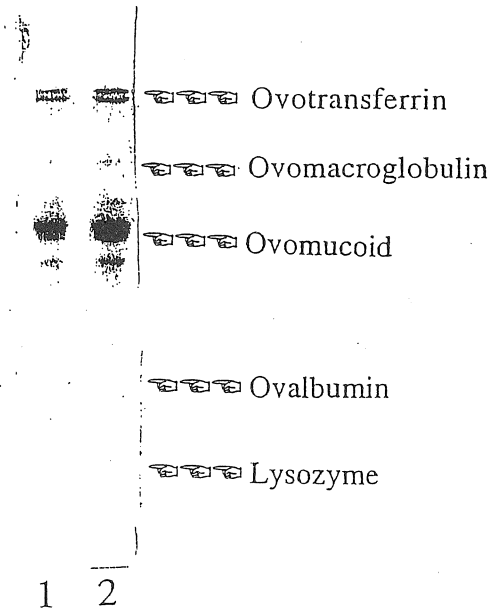


Fig. 7 SDS-PAGE of 20-40 fraction number.
1, NaCl with; 2, NaCl without

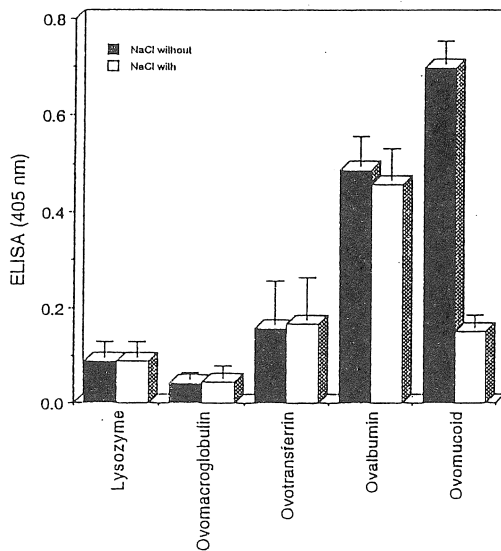


Fig. 8 Comparison of the binding activity of human-specific IgE on the various proteins.

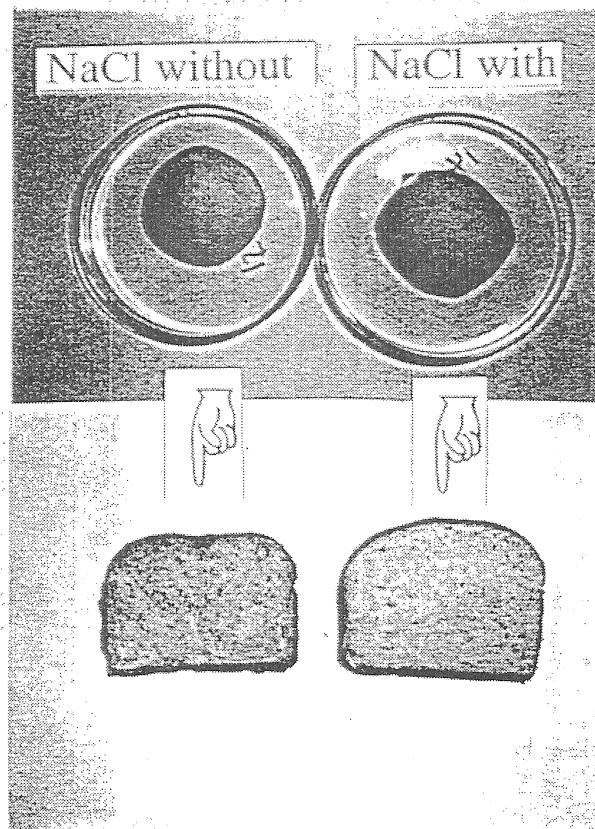


Fig. 9 Fermentation of dough and baking.

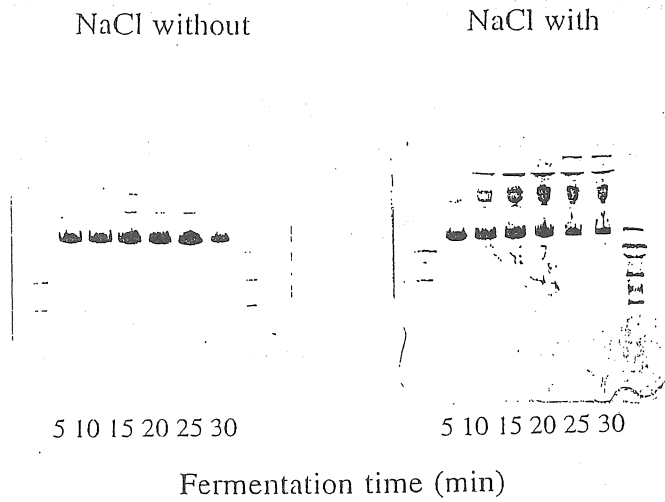


Fig. 10 SDS-PAGE of after baking of dough with ovomucoid.

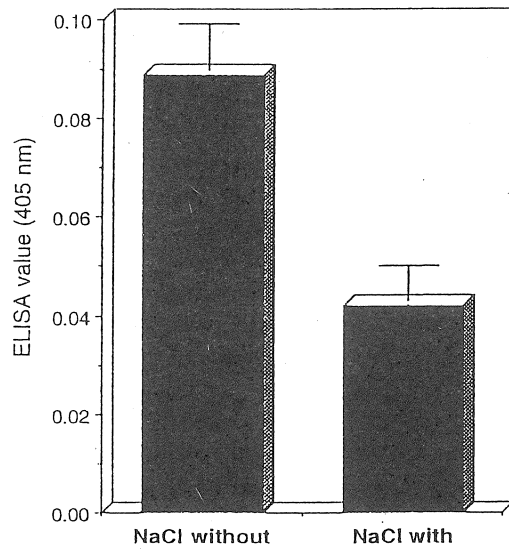


Fig. 11 Comparison of the binding of human-specific IgE on the after baking.

Inhibition of Food-Allergic Reactions by NaCl

Toshiyuki Toyosaki

Department of Home Economics, Koran Women's Junior College

Summary

The model systems of various bread has been created and examined for the purpose of development of anti-allergy bread. Consequently, control or disappearance of antigen activity was checked by the interaction of gluten and the allergen in a chicken egg (mainly ovomucoid). Moreover, although the existence of a salt content newly checked the fact of having affected it greatly, as an important ingredient which determines disappearance of antigen nature, for details, it does not inquire. Then, this research created the model system of the time of dough formation, or baking bread, set it as the main purpose to pursue whether it is the thing which salt makes control antigen activity in those systems, combined, and was considered from various angles about the interaction of allergy induction protein and NaCl. As a means to pursue the control effect of the allergy activity of NaCl, NaCl addition, additive-free dough, and the model system of baking bread were created, and allergy activity was measured about the sample which extracted allergy induction protein from these samples using the single radial immunodiffusion method and the ELISA method. Moreover, the allergy activity of a sample which separated and refined allergen by affinity chromatography using the trypsin-immobilised affinity column was measured after extracting crude protein from dough and baking bread. As a result of measuring the allergy activity of the crude protein extracted from dough or its baking bread, the control effect of the allergy activity of NaCl was accepted in the NaCl addition dough or its baking bread. The other hand, the NaCl additive-free case, neither dough nor its baking bread has checked the control effect of allergy activity. In the control effect of the allergy activity of NaCl, the control effect showed up notably with extension of dough fermentation time. The allergy induction protein of dough or baking bread was ovomucoid added at the time of dough adjustment. The tendency which high-polymerizes ovomucoid of the NaCl addition dough with extension of fermentation time was checked. It was imagined as what antigen activity controlled by probably receiving a certain action in the molecular structure of ovomucoid by NaCl. It turns out in this experiment that NaCl has the action which makes allergy activity control clearly. It is necessary to combine with the interaction of NaCl and ovomucoid, and to pursue in detail about the control mechanism of allergy activity from now on. The study thus offers important finds for the immunology of food science.