

果実アレルギーの検出方法と低減化加工手法の 確立に関する研究 (第2報)

齋藤 美貴・小嶋 匡人・長沼 孝多・辻 政雄

Development of the procedure to detect and reduce the allergen of fruits (2nd report)

Miki SAITO, Masato KOJIMA, Kota NAGANUMA and Masao TUJI

要 約

モモ果肉中のアレルギーを低減化する方法について検討をおこなった。40℃の pH5 の緩衝液中に 20 分間モモ果肉を浸漬するとアレルギーが低減化されることを確認した。モモの品種によるアレルギー量の違いを比較したが、明確な違いはみとめられなかった。また、アレルギーを低減化したモモを使用してシロップ漬けとジャムを試作した。

1. 緒 言

モモアレルギーは果肉には殆ど存在していないのに関わらず、果肉を食べた時に、アレルギーが発症するのは、果皮に存在するアレルギーが果肉表面に移行することによって起こると推察した。そこで、アレルギーを効率的に抽出する条件について検討したところ、アレルギーは弱酸性溶液中に可溶化しやすいことがわかった。このことから、モモ果肉のアレルギーを低減化させるには弱酸性液で処理すると良いことが判明した（特許出願中：特願 2006-290369）。

しかし、この弱酸性溶液中でアレルギーが低減したかどうかを確認するためには、果肉中の微量なアレルギーを特異的に検出するイムノブロット手法を用いる必要があり、昨年度ドットブロット法でアレルギーを検出する方法について検討を行った。そこで本年度は、アレルギー低減化条件の詳細な検討を行ったのち、ドットブロット法でアレルギー低減化の確認を行い、アレルギーを低減化した加工品の試作を行ったので、報告する。また、モモの品種によるアレルギー量の違いについても検討したので併せて報告する。

2. 実験方法

2-1 供試試料

山梨県内で収穫されたモモ（白鳳，2008 年産）を使用した。

2-2 アレルギー低減化条件の検討

2-2-1 pH の影響

モモ果皮 2g を、pH を 4, 5, 6 または 7 に調製した

McIlvaine 緩衝液 4ml が入った 15ml 容の遠沈管に入れ、試験管振盪器（CUTE MIXER CM-1000，東京理科機械株式会社製）に装着し、室温で 5 分間、2,500rpm で振盪した。ガーゼ濾過後，12,000×g，20 分間，4℃で遠心分離を行い，上清を得た。これを，蒸留水で透析し，タンパク質を定量した。

2-2-2 温度の影響

モモ果肉 1 個を，温度を 4℃，20℃または 40℃に保持した McIlvaine 緩衝液（pH5）の緩衝液 400ml に浸漬し，浸漬後 5 分，10 分，20 分，30 分および 60 分後に緩衝液を 2ml 採取した。採取液のブリックスはそのまま測定し，タンパク質は蒸留水で透析後，測定した。

2-3 モモ果肉タンパク質の抽出・精製

2-3-1 モモ果肉からの総タンパク質の抽出・精製

モモ果肉を包丁で細断し，液体窒素で凍結させた。これを乳鉢と乳棒を用いて磨砕して，粉末化したモモ果肉凍結粉末 35g に 0.2M のアスコルビン酸ナトリウムを含む McIlvaine 緩衝液（pH5）を 5ml 加え，ブレバンダーミキサーで 100,000rpm，10 分間攪拌した。これをガーゼ濾過し，濾液を 12,000×g，20 分間，4℃で遠心分離して上澄液を得た。上澄液 20ml に対して陰イオン交換樹脂（DOWEX 1×2，200～400mesh，ムロマチテクノス社製）を 8g 加え，10 分間振盪した。濾紙（No.2）で吸引濾過し，このタンパク質抽出液に 60%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え，4℃で一晩塩析した。これを 30,000×g，30 分間，4℃で遠心分離して沈殿を得た。沈殿を 500μl の McIlvaine 緩衝液（pH6）に溶解させた後，

限外濾過膜 (Microcon Ultracel YM-3, MILLIPORE 社製) で脱塩と濃縮を行なった。

2-3-2 タンパク質の定量

タンパク質は BCA 法に基づいたタンパク質定量キット (BCA Protein Assay kit, PIERCE 社製) を使用して定量した。標準物質には牛血清アルブミンを使用した。

2-4 ドットプロット法によるモモ果肉アレルゲンの検出

2-4-1 血清

山梨大学医学部において、モモ過敏性の成人から血液を採取し、血清を得た。SRL (株) (東京都立川市) に依頼してこれら血清のモモアレルギー検査を FEIA (Fluorescence Enzyme Immunoassay) 法で実施し、モモアレルギー陽性 (0.7 UA/mL 以上) と判定された血清をドットプロットの 1 次抗体として使用した。血清は小分けにして -80°C で保存し、融解後は 0.02% となるようにアジ化ナトリウムを加え、4°C で保存した。

2-4-2 ドットプロット法

メタノールによって親水化処理した PVDF 膜 (Hybond-P PVDF membrane, GE Healthcare 社製) を純水、PBS (pH7.5, 80mM リン酸水素二ナトリウム, 20mM リン酸二水素ナトリウム, 100mM NaCl) の順で 10 分間振盪した。これを予め PBS で湿らせたプロテイング用濾紙 (CB-09A, ATTO 社製) の上に PVDF 膜をおいて、2-3-1 の方法で抽出・精製したモモ果肉総タンパク質 (5 μ g/2 μ l) をスポットした。風乾後、ブロッキングバッファー (5% (w/v) ECL Blocking Agent (GE Healthcare 社製) を含む PBS-0.1% Tween20 (PBS-T)) を用い、室温で 60 分間振盪し、ブロッキングした。PBS-T 中で PVDF 膜を洗浄および振盪後、PBS-T で 20 から 100 倍希釈したアレルギー患者の血清中 16 時間室温で穏やかに振盪し、インキュベートした。PBS-T 中で PVDF 膜を洗浄および振盪後、2 次抗体として HRP 標識された Anti human IgE (ϵ) (FC) (マウス由来, ZYMED Laboratories 社製) を PBS-T で 25,000 倍希釈して加え、室温で 1 時間振盪した。PBS-T 中で PVDF 膜を洗浄および振盪後、化学発光基質 (ECL Plus Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare 社製) を加え、アレルゲンの検出を行なった。化学発光は高感度 CCD カメラ (ライトキャプチャー, ATTO 社製) で撮影した。

2-5 アレルゲン低減化加工品の試作

アレルゲン低減化処理を行ったモモを原材料にして、

シロップ漬けとジャムを試作した。シロップ漬けは仲尾らの方法¹⁾に従い調製し、水煮の工程のみ、アレルゲン低減化処理に置き換えた。ジャムは剥皮後、アレルゲン低減化処理を行い、果肉を細断して、煮熟した。モモ果肉の 1/4 重量のグラニュー糖と 1/200 重量のクエン酸を加え、Brix が 50 になるように煮詰めた。

3. 結果および考察

3-1 アレルゲン低減化処理条件の検討

タンパク質の pH による溶出量の違いを表 1 に示した。pH5 の場合に最もタンパク質が溶出することが確認されたので、pH5 の緩衝液を使用して、温度の影響を調べた。4°C では殆どタンパク質が溶出されなかったが、20°C では浸漬後 30 分までは経時的に溶出され、その後タンパク質量は低下した。40°C では浸漬後 20 分までは経時的にタンパク質が溶出されたが、30 分後にはタンパク質量は低下し、その後一定となった (図 1)。糖の溶出は緩衝液の温度による違いはあまり認められず、5 分後には Brix2.5 前後になり、その後、4°C 以外は微増した (図 2)。以上の結果から、出来るだけ糖の溶出を少なくし、タンパク質が溶出される条件として、アレルゲンの低減化は 40°C の pH5 の緩衝液中に 20 分間浸漬することとした。

表 1 各 pH におけるタンパク質溶出量

	pH4	pH5	pH6	pH7
タンパク質抽出量 (mg/果皮 g)	0.34	0.53	0.50	0.08

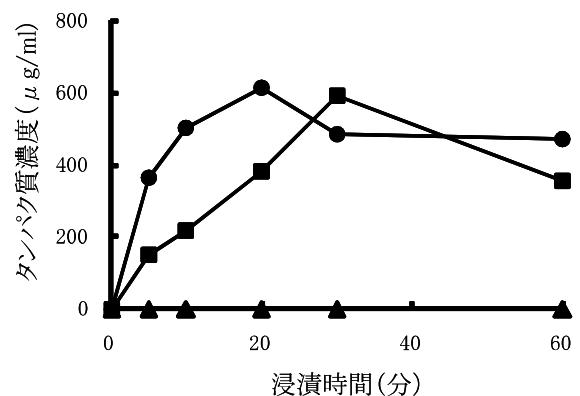


図 1 タンパク質溶出量の変化

▲ : 4°C, ■ : 20°C, ● : 40°C の緩衝液 (pH5)

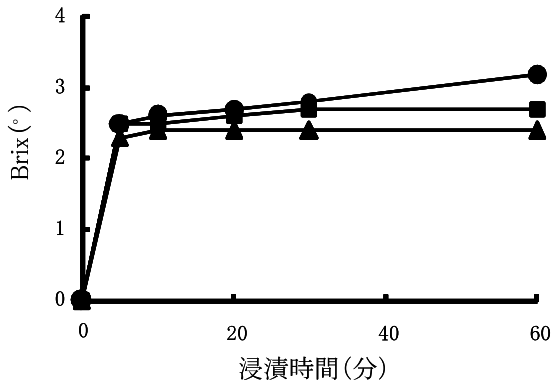


図2 糖溶出量の変化

▲ : 4°C, ■ : 20°C, ● : 40°Cの緩衝液 (pH5)

本研究で確立した方法は、40°Cの pH5 の緩衝液中に浸漬するのみであるので、色調や味の変化が殆どなく、簡便な方法でモモアレルギー患者にもモモを提供できるようになった。



図4 アレルゲン低減化加工品
左：シロップ漬け，右：ジャム

3-2 ドットプロット法によるアレルゲン低減化の確認

1L容のビーカーに40°Cに保った pH5 の緩衝液 400mlをいれ、モモ果肉1個を20分間浸漬し、浸漬後の果肉からタンパク質を抽出し、ドットプロット法によってアレルゲンを検出した結果を図3に示した。上述の処理を行わない場合、アレルゲンが存在するので、発光が認められるが、処理を実施すると、発光が認められなくなった。同様の結果が他のアレルギー患者5名ともみとめられ(表2)、アレルゲンの低減化が確認できた。



未処理・低減化処理

図3 ドットプロットによるアレルゲン検出
アレルギー患者1の血清を使用

表2 アレルゲン低減化の確認

アレルギー患者	1	2	3	4	5
低減化処理後 モモ果肉	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

3-3 低減化加工品の試作

モモ果肉を低減化処理(40°Cの pH5 の緩衝液中に20分間浸漬)後、シロップ漬けとジャムを試作した(図4)。モモをアルカリ剥皮処理するとアレルゲンが低減化されることが報告されているが²⁾、その後、モモを塩酸で中和する必要があり、専門的な知識や装置を必要とした。

4. 結 言

1. モモの果肉のアレルゲンは40°Cの pH5 の緩衝液中に20分間浸漬すると低減化できることが確認できた。
2. アレルゲン低減化処理を行ったモモを原材料にして、モモのシロップ漬けとジャムを試作した。

本研究を遂行するにあたり、血液の採取およびアレルギーの臨床検査にご協力いただいた、山梨大学大学院医学総合研究部杉山篤准教授に深謝いたします。

参考文献

- 1) 仲尾玲子, 中川裕子: 第3版 つくってみよう加工食品, 学文社, p46-47 (2000).
- 2) Oreste Brenna, Carlo Pompei, Claudio Ortolani, Valerio Pravettoni, Laura Farioli and Elide A. Pastorello.: *J.Agric. Food Chem.*, 48, 493-397 (2000).