

# 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

斎藤 美貴・小嶋 匡人・長沼 孝多・恩田 匠

## Development of the Procedure to Detect and Reduce the Allergen of Fruits

Miki SAITO, Masato KOJIMA, Kota NAGANUMA and Takumi ONDA

### 要 約

モモ果肉からのタンパク質の抽出・精製方法とモモアレルギーをイムノブロットングで検出する方法について検討を行なった。モモ果肉を液体窒素で凍結させ、粉末化してから、タンパク質の抽出を行ない、精製に陰イオン交換樹脂を使用したところ、アレルギーに相当するタンパク質のバンドが銀染色で検出できた。

また、イムノブロットングの検出はアレルギー患者の血清は100倍希釈し、16時間のインキュベーションで、2次抗体にHRP標識された抗ヒトIgE抗体を使用した検出が可能となった。

### Abstract

Procedures for extracting and purifying protein located in peach pulp were studied. After peach pulp was lyophilized and powdered, protein in it was extracted. The protein was purified with anion exchange resin. The protein band corresponding to the major allergen of peach was detected with Silver Stain.

The blotting allergen was incubated for 16 hours with the serum of allergy patients diluted 100 times. Binding by specific antibodies was detected by incubation with HRP labeled anti-human IgE and enhanced chemiluminescence.

### 1. 緒 言

厚生労働省では平成13年からアレルギー症例の多い卵、小麦などの「特定原材料」(原材料表示を義務化)5品目と「特定原材料に準ずるもの」(原材料表示を推奨)として19品目を指定し、注意を喚起している。平成17年には「特定原材料に準ずるもの」にバナナが追加され、平成20年には「特定原材料に準ずるもの」に含まれていたエビ・カニを「特定原材料」に改定する方針を定めた。今後も食品アレルギー患者の増加が見込まれ、それに伴い、アレルギー食品として指定される原材料も増加していくと考えられる。本県の特産物であるモモも「特定原材料に準ずるもの」に含まれ、特に成人に発症例が多いことが報告されている<sup>1)</sup>。

既に我々は、欧州産モモ果皮に存在する主要アレルギーPru p3が日本産のモモにも存在していることをN末端アミノ酸解析の結果から明らかにした<sup>2)</sup>。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ング手法を用いる必要がある。既に、モモやモモが属するバラ科果実のアレルギーの検出については、2次抗体に<sup>125</sup>I標識抗ヒトIgE抗体を使用する方法が報告されているが<sup>3-5)</sup>、1次抗体(アレルギー患者血清)の使用濃度が高く効率が悪いこと、2次抗体のラジオアイソトープが環境や人体に危険性があるなどの問題があった。一方、Sanchez-Mongeら<sup>6)</sup>は、2次抗体として抗ヒトIgE抗体(マウス由来)をHorseradish peroxidase(HRP)で標識された抗マウスIgE抗体(ウサギ由来)の2つの抗体を使用して化学発光検出を行なっているが、1次抗体の使用濃度が10倍希釈で高いとの問題があり、低濃度の1次抗体でアレルギーが検出可能な方法の確立が望まれていた。

そこで今回は、モモ果肉からの微量のアレルギーを含むタンパク質を抽出・精製法を検討するとともに、1次抗体を低濃度で使用できる、イムノブロットでアレルギーを検出する方法について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1 供試試料

山梨県南アルプス市で収穫されたモモ（白鳳）を使用した。

### 2-2 モモ果肉タンパク質の抽出・精製とSDS-電気泳動

#### 2-2-1 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（pH5.0：クエン酸49mM，リン酸水素二ナトリウム102mM）を5ml加え、ブレンダーミキサーで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500 $\mu$ lのMcIlvaine緩衝液（pH6.0：クエン酸3.75mM，リン酸水素二ナトリウム12.5mM）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。

#### 2-2-2 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。

#### 2-2-3 タンパク質のトリシンSDS-電気泳動

タンパク質の電気泳動には，既成ゲル（SPU-15S，ATTO社製）と付属バッファー（トリス-トリシン系）を使用し，定電流20mAで120分間通電して行なった。検出はCoomassie brilliant blue（CBB）染色（クイックCBB，和光純薬社製）と銀染色（銀染色IIキットワコー，和光純薬社製）で行なった。

### 2-3 ドットプロット法によるモモ果肉アレルギーの検出

#### 2-3-1 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 UAU/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℃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℃で保存した。

### 2-3-2 ドットプロットによるモモアレルギーの検出

モモ果肉に含まれる総タンパク質のアレルギー性を確認するために，イムノプロットの手法の一つであるドットプロット法での検出条件について検討した。

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で湿らせたブロッキング用濾紙（CB-09A，ATTO社製）の上にPVDF膜をおいて，2-2-1の方法で抽出・精製したモモ果肉総タンパク質（5mg/2ml）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10，50，100，200，または500倍希釈したアレルギー患者の血清中で1，3，6または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（ $\epsilon$ ）（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，アレルギーの検出を行なった。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，画像解析ソフト（CS Analyzer 3，ATTO社製）を使用して，輝度値を算出した。

## 3. 結果および考察

### 3-1 モモ果肉タンパク質の抽出・精製とSDS-電気泳動

前報<sup>2)</sup>では，モモ果肉からのタンパク質精製には疎水性カラムを使用して，得られた各画分について電気泳動を行ない，CBB染色でタンパク質を検出した。しかしながら，果肉においては，いずれの画分においてもPru p3に相当する分子量9 kDaのタンパク質のバンドは認められなかった。さらに，CBB染色よりも50倍程度検出感度が高い銀染色でも検出を試みたが，Pru p3は検出されず，モモ果肉におけるアレルギーの存在を明らかにすることができなかった。そこで，果肉の均一化方法や精製に用いる担体の種類など諸条件について，種々の検討を行った。その結果，果肉の均一化はブレンダーミ

キサーによる処理のみでは不十分であることがわかった。すなわち、レベンダーミキサーのみでは、果肉組織が十分に均一化せず、遠心分離時に、水不溶性成分と共にタンパク質も沈殿し、タンパク質の回収率が低下するものと推察された。

そこで、試料を液体窒素で凍結し、乳棒と乳鉢を使用して粉末化したのちに、さらにプレベンダーミキサーで均一化すると、遠心分離後に得られる水不溶性成分の沈殿が少なくなることがわかった。

次に、タンパク質の精製拒体については、酸性多糖類とポリフェノールが多く含まれるブドウ果皮のタンパク質の精製に用いられた陰イオン交換樹脂 (DAWEX 1×2)<sup>6)</sup> が有効であることがわかった。以上のことから、確立したタンパク質の抽出・精製方法を図1に示す。

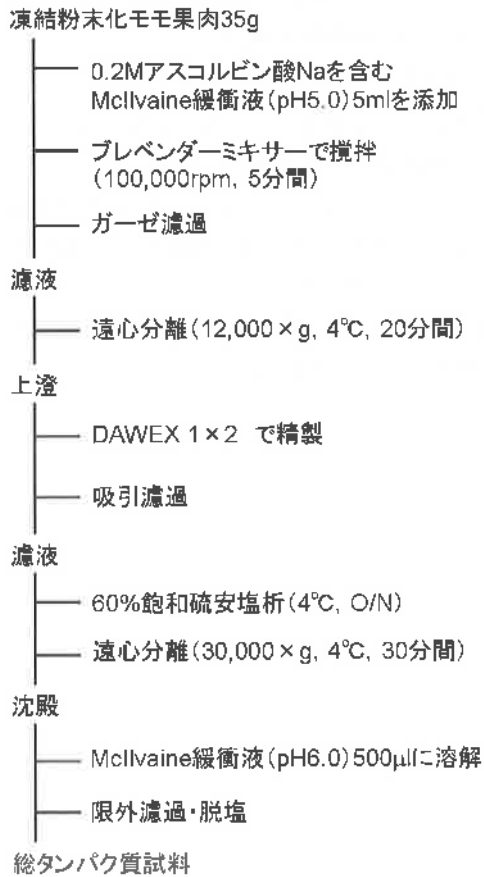


図1 モモ果実タンパク質の抽出・精製方法

この方法を用いて抽出したタンパク質の電気泳動を行った結果、Pru p3に相当する分子量9kDaのタンパク質のバンドが、CCB染色では検出できないものの、銀染色では検出できることが確認できた(図2)。

### 3-2 ドットプロット法によるモモ果肉アレルギーの検出

ECL Plus を用いた化学発光検出において使用する 1

次抗体 (アレルギー患者血清) の希釈倍率およびインキュベーション時間について検討を行なった。

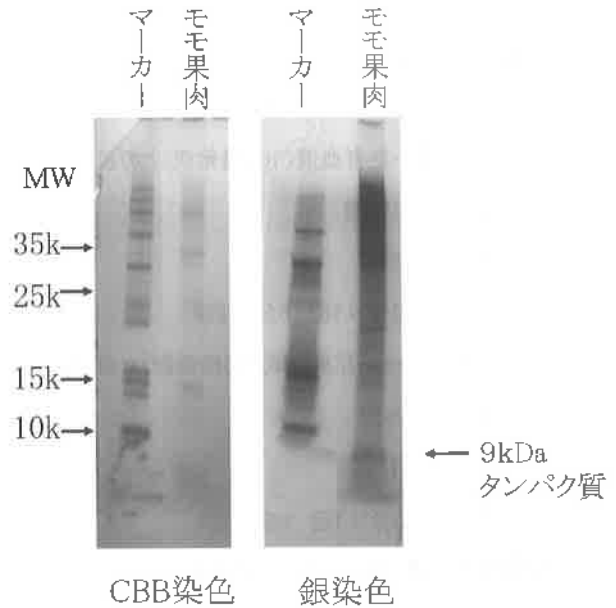
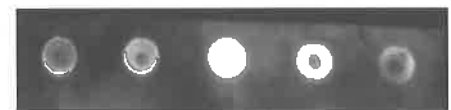


図2 モモ果肉総タンパク質のSDS電気泳動

モモ果肉タンパク質 5 mg に含まれるアレルギーを検出する場合、インキュベーション時間が 1, 3 および 6 時間ではいずれの希釈倍率 (10~500倍) においても、発光は認められなかった。16時間インキュベーションした場合、血清の希釈倍率が10倍と50倍では、抗体が発色基質に比べ過剰に存在するため、消光したが、100倍希釈では最も高い輝度を得られ、さらに希釈倍率が高くなると、輝度が低下する傾向が認められた(図3, 4)。



血清希釈倍率 10倍 50倍 100倍 200倍 500倍  
図3 各希釈倍率で血清を使用した時のアレルギーのドットプロットによる検出

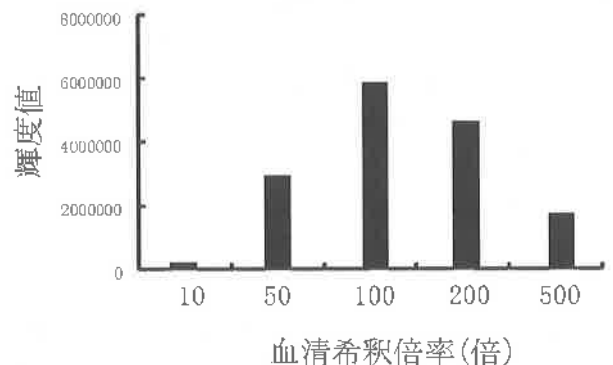


図4 各希釈倍率で血清を使用した時のドットプロットにおける輝度値

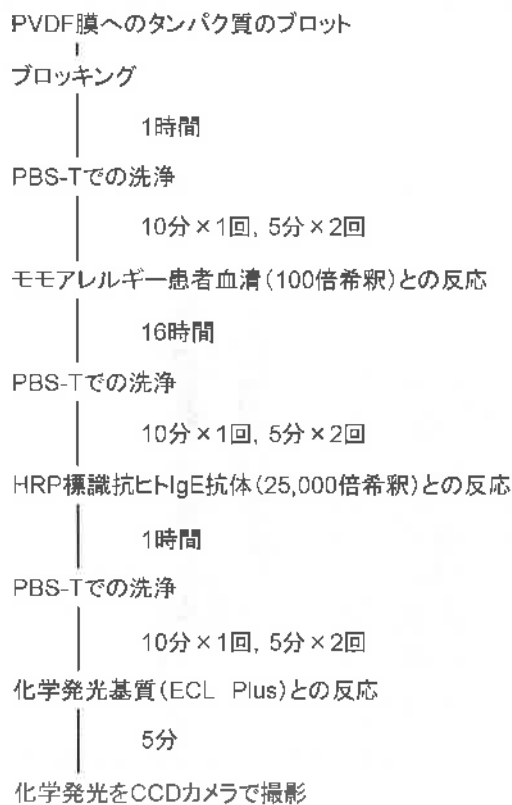


図5 ドットプロット法によるアレルゲンの検出方法

この結果から、血清の希釈倍率は100倍が適当であると判断した。以上のことから図5に示すドットプロット法によるアレルゲンの検出方法を確立した。Pastorelloら<sup>3-4)</sup>は<sup>125</sup>I標識された2次抗体を使用し、5倍希釈の血清、Sanchez-Mongeら<sup>6)</sup>は2次抗体を2つ使用し、10倍希釈の血清を用いている方法に比較して、本方法では大幅に血清の使用を節約できることが判明した。また、2次抗体もHRPで標識された抗ヒトIgEを使用するのみであるので、環境や人体への負荷がなく、実験コストも抑えられる。

今後は、この方法を用いてアレルゲンの低減化処理の効果について、検証を行なう予定である。

## 5. 結 言

1. モモ果肉を液体窒素で凍結後、粉末化してからタンパク質を抽出し、陰イオン交換樹脂で精製することにより、電気泳動後、銀染色でアレルゲンに相当する分子量9kDaのタンパク質のバンドが検出できた。
2. 2次抗体にHorseradish peroxidase (HRP) 標識された抗ヒトIgE抗体を使用したドットプロット法により、モモ果肉に存在するアレルゲンの検出が可能となった。その際、1次抗体のアレルギー患者血清は16時間インキュベーションし、100倍希釈で使用すると最も高い輝度が得られた。

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工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) 橘田和美：日本食品科学工学会誌, 52, p.52-59 (2005)
- 2) 斎藤美貴, 恩田匠, 深澤親房：山梨県工業技術センター研究成果報告, 20, p.79-80 (2006)
- 3) Pastorello, E. A., Oratolani, C., Farioli, L., Prave ttoni, V., Ispano, M., Borga, A., Bengtsson, A., Inco rvaia, C., Berti, C. and Zanussi, C.: *J allergy clin immuno.*, 94, 699-707 (1994) .
- 4) Pastorello, E. A., Farioli, L., Prave ttoni, V., Oratolan i, C., Ispano, M., Menza, M., Baroglio, C., Scibola, F., A nsaloni, R., Incorvaia, C. and Conti, A.: *J. allergy clin immunol.*, 103, 520-526 (1999) .
- 5) Brenna, O., Pompci, C., Ortolani, C., Prevettoni V., Farioli L., and Pastorello, E. A.: *J Agric. Food, Chem.*, 48, 493-397 (2000).
- 6) Sanchez-Monge, R., Lombardero, M., Garacia-Selles, F. J., Barber, D., and Salcedo, G.: *J. allergy clin immunol.* 103, 514-519 (1999).
- 7) 高柳勉, 相川大介, 奥田徹, 久本雅嗣, 横塚弘毅: *J.ASEV Jpn.*, 16, p9-13 (2005)