

加工条件の異なる菓子からの小麦アレルゲンの検出

新居佳孝*, 岡久修己*

抄 録

近年、食物アレルギー患者が急激に増加しており、原因食品としては、卵、牛乳の次に小麦が挙げられている。小麦に含まれるアレルゲンタンパク質には、 α -アミラーゼインヒビター、グリアジンおよび低分子量グルテニンなどが報告されている。小麦粉に含まれるアレルゲンタンパク質に関しては多くの研究があるが、小麦加工食品の加工条件による小麦アレルゲンタンパク質への影響を検討した報告はわずかしかない。そこで、加工条件の異なる3種類の菓子（クッキー、蒸しパンおよびかりんとう）を作製し、それぞれの加工条件が小麦アレルゲンタンパク質に及ぼす影響について検討した。本研究では、グリアジンと α -アミラーゼインヒビターファミリーに属する低分子量アレルゲン（以下、Tri a Bd 17K）の2種類のアレルゲンタンパク質の検出を試みた。その結果、グリアジンは、いずれの食品とも加工による影響はみられなかったが、Tri a Bd 17Kは、各食品ともに加工後に検出量が著しく減少した。特に、かりんとうは、加工前（生地）に比べて、約98%も減少することが分かった。

1 はじめに

近年、食物アレルギー患者が急激に増加しており、原因食品としては、卵、牛乳の次に小麦が挙げられている¹⁾。とりわけ、小麦アレルギーは、卵もしくは牛乳アレルギーと比べて治療しにくいといわれており、引き起こされる症状には、皮膚炎、喘息のほか運動誘発性アナフィラキシーショックのような重篤な症状も含まれる²⁾。小麦に含まれるアレルゲンタンパク質には、 α -アミラーゼインヒビター、グリアジンおよび低分子量グルテニンなどが報告されている^{3) 4)}。これまで、小麦粉については、アレルゲンタンパク質を酵素分解する方法²⁾や、塩水洗浄により除去する方法⁵⁾などが研究され、前者については既に実用化されている。しかし、小麦加工食品の加工条件による小麦アレルゲンタンパク質への影響を検討した報告はわずかしかない⁶⁾。

そこで、加工条件の異なる3種類の菓子（クッキー、蒸しパンおよびかりんとう）を作製し、それぞれの加工条件が小麦アレルゲンタンパク質に及ぼす影響について検討した。本研究では、アトピー性皮膚炎および運動誘発性アナフィラキシーショックの原因物質であると報告されているグリアジン⁷⁾とBaker's asthma（製パン業者にみられる喘息）および皮膚炎の原因物質であり α -アミラーゼインヒビタ

ーファミリーに属する低分子量アレルゲン^{3,8)}の2種類のアレルゲンタンパク質の検出を試みた。

2 実験方法

2・1 菓子の作製

クッキーは、薄力粉200g（日清フラワー；日清製粉（株）製）をマーガリン60g、砂糖80g、卵1個と混合し生地とした後、オーブンレンジ（RE-RZ1；シャープ（株）製）で180℃、25分間焼成して作製した。蒸しパンは、薄力粉200gを水100g、砂糖20g、ベーキングパウダー10g、卵1個、塩1gと混合した後、蒸し器で20分間蒸して作製した。

かりんとうは、市岡製菓（株）に製造を依頼した。原材料には強力粉を用い、塩、イーストと混合し発酵させた生地を180℃で90秒間（3回）揚げて作製した。

2・2 イムノブロット法およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法による小麦アレルゲンタンパク質の検出

粉碎した試料10mgにSDS-PAGE試料緩衝液1mlと2-メルカプトエタノール0.1mlを加え、超音波処理した後、沸騰水浴中で5分間加熱し、タンパク質を抽出した。なお、本法によりほぼすべてのタンパク質成分を抽出できる⁹⁾。この抽出液10 μ lをLaemmliの方法¹⁰⁾に従い、15%アクリルアミドゲル（テフコ（株）製）に20mAの定電流で電気泳動し

*食品技術課

た。ゲルに泳動されたタンパク質をニトロセルロース膜 (GE infrastructure Water & Process Technologies 社製) に転写した後、一次抗体として、グリアジンの検出には抗グリアジン抗体 (日本ハム (株) 製) を、Tri a Bd 17K の検出には抗 Tri a Bd 17K 抗体¹¹⁾ を 1 時間反応させた。次に、二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories 社製) を 1 時間反応させ、さらに、アビジン化アルカリフォスファターゼとの複合体を形成させた。アルカリフォスファターゼ基質溶液で発色させた後、転写膜上の各バンドの画像をイメージスキャナーにて取得した。得られた画像は、画像処理ソフトウェア (NIH Image 1.63) を用いて定量化した。SDS-PAGE 法では、タンパク抽出液を上記の方法で電気泳動した後、クマシーブリリアントブルー (CBB) にて染色し、泳動パターンを解析した。

3. 結果と考察

3・1 菓子からのグリアジンの検出

SDS-PAGE 法およびイムノブロット法を用いてグリアジンの検出を試みた。その結果、いずれの食品

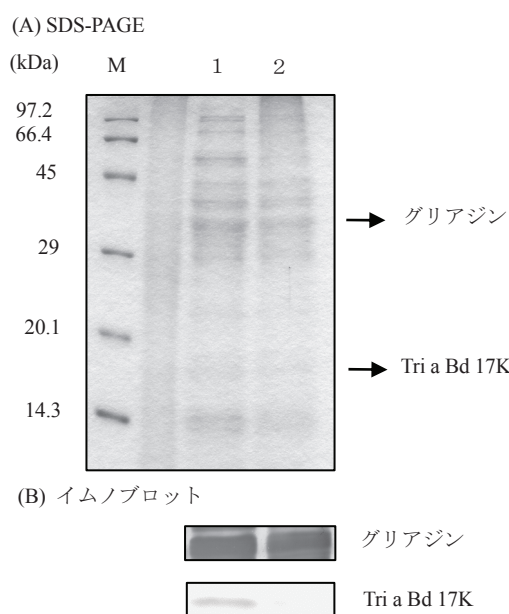


図1 かりんとうからのグリアジンと Tri a Bd 17K の検出

M: 分子量マーカー, 1: 生地, 2: 揚げ後

とも加工による影響はみられなかった。検出例として、かりんとうの結果を図1に示した。

3・2 菓子からの Tri a Bd 17K の検出

菓子に含まれる Tri a Bd 17K をイムノブロット法

により検出し (図1-B), 得られた画像を、画像処理ソフトウェアを用いて定量化した。その結果, Tri a Bd 17K は, 各食品ともに加工後に検出量が著しく減少した (図2)。クッキーと蒸しパンは, それぞれ約70%減少したが, 特に, かりんとうは, 約98%も減

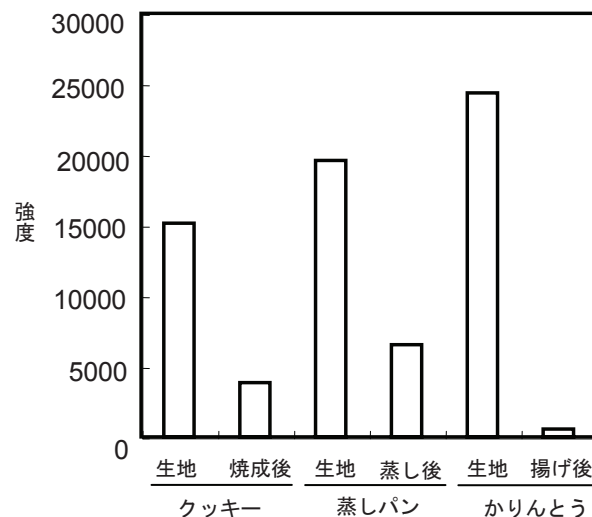


図2 菓子からの Tri a Bd 17K の検出量

少することが分かった。これらの結果は、小麦アレルゲン分子が調理条件や副材料 (卵, バター等) の添加により影響されることを見出した報告と同様の結果となった⁶⁾。

各食品における Tri a Bd 17K の減少効果は、加熱によりタンパク質のエピトープ構造が変性した結果であると考えられる。また、かりんとうにおいて Tri a Bd 17K が顕著に減少している理由として、油で揚げることにより材料の内部の温度が短時間で 100℃程度にまで上昇すること¹²⁾ が影響していると考えられる。また、揚げ操作では、他の調理操作と異なり食品中の水分が減少するかわりに油脂を吸収する¹²⁾。このため、食品中の油脂が小麦アレルゲンタンパク質に影響を及ぼしている可能性も示唆されるが、この点についてはさらに詳細に検討する必要がある。

Tri a Bd 17K は、フコースを糖鎖にもつ糖タンパク質であり、このフコースが IgE 抗体との結合に大きく関与しているとの報告もある^{3) 8)}。なお, Tri a Bd 17K は、加熱によりアレルゲン性を保持した重合体を形成することが報告されており⁹⁾、注意を要する。

今回の研究結果から、小麦に含まれるアレルゲンである Tri a Bd 17K の検出量が食品加工により減少することが示された。しかし, Tri a Bd 17K は完全に除

去されていないため、小麦アレルギー患者に直ちに適用することには危険が伴う。医師の管理のもと、これらの小麦加工食品について食物負荷試験を実施し、アレルギー性を評価する必要がある。加工食品に含まれる食物アレルギーを正確に検出し、比較したデータは、食物負荷試験を行う際の有効な指標になるものと考えられる。

4. まとめ

加工条件の異なる3種類の菓子（クッキー、蒸しパンおよびかりんとう）を作製し、それぞれの加工条件が小麦アレルギータンパク質に及ぼす影響について検討した。

（1）グリアジンは、いずれの食品とも加工による影響はみられなかった。

（2）Tri a Bd 17K は、各食品ともに加工後に検出量が著しく減少した。特に、かりんとうは、加工前（生地）に比べて、約98%も減少することが分かった。

謝辞

実験全般にわたりご助言いただきました広島女学院大学坂井堅太郎先生ならびに抗 Tri a Bd 17K 抗体を分与していただきました岡山県立大学比江森美樹先生に感謝いたします。また、かりんとうの製造にご協力いただきました市岡製菓（株）戸井由紀子氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) 飯倉洋治：食物アレルギー対策検討委員会平成9年度報告書，厚生省生活衛生局 (1998)
- 2) 田辺創一・渡辺純・園山慶・渡辺道子：難治性的小麦アレルギーに挑む アレルゲンの同定から対応食品の開発まで，化学と生物，Vol. 39, 440-447 (2001)
- 3) M. Kimoto, M. Yoshikawa, K. Takahashi, N. Bando,

M. Okita and H. Tsuji: Identification of allergen in cereals and their hypoallergenization. I. Screening of allergens in wheat and identification of an allergen, Tri a Bd 17K., Ann. Report Interdiscipl. Res. Inst. Environ. Sci., Vol. 17, 53-60 (1998)

4) 香西はな・矢野博己・加藤保子：小麦タンパク質とアレルギーー小麦依存性運動誘発性アナフィラキシーに注目してー，川崎医療福祉学会誌，Vol. 16, 11-19 (2006)

5) 池澤善郎・椿和文・横田俊平：アトピー性皮膚炎におけるアレルギー低減化小麦 (HAW-A1) の有用性とその臨床効果の血清学的な解析，アレルギー，Vol. 43, 679-688 (1994)

6) 比江森美樹・増田和子・木本眞順美・山下広美・辻英明：加熱調理が小麦アレルギーに及ぼす影響について，日本調理科学会平成18年度大会，岡山 (2006)

7) 穂山浩：アレルギー誘発物質，抗アレルギー食品開発ハンドブック，19-28，サイエンスフォーラム (2005)

8) 辻英明：豆・穀類中のアレルギーに関する研究，日本栄養・食糧学会誌，Vol. 55, 191-198 (2002)

9) 森山達哉：ゲノムサイエンスを利用した評価，抗アレルギー食品開発ハンドブック，229-236，サイエンスフォーラム (2005)

10) U.K. Laemmli : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., Nature, Vol. 227, 680-685 (1970)

11) H. Yamashita, M. Kimoto, M. Hiemori, M. Okita, K. Suzuki and H. Tsuji: Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system for micro-detection of the wheat allergen, Tri a Bd 17K., Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 65, 2730-2734 (2001)

12) 山崎清子・島田キミエ・渋谷祥子・下村道子：新版調理と理論，23-27，同文書院 (2003)