

研究課題名	魚肉主要アレルゲンであるパルブアルブミンの消化吸収動態の解明
フリガナ	シミズ ユタカ
代表者名	清水 裕
所属機関（機関名） （役職名）	北海道大学大学院水産科学研究院 技術専門職員
本助成金による発表論文，学会発表	日本水産学会北海道支部大会

研究結果要約

本研究では、魚肉の主要アレルゲン（パルブアルブミン、以下 PA）の消化吸収動態の解明を目的とし、マダラおよびシロザケの PA の精製法と、各 PA に対する抗体とそれを用いた PA 検知定量法を構築した上で、1：PA の酵素消化性の調査、2：消化物に対する IgE 反応性の評価、そして 3：マウスを用いたマダラ PA の吸収性調査を行い、以下の結果を得た。

1：マダラでは 10 分間、シロザケでは 30 分間のペプシン消化でインタクトな PA が消失することが、電気泳動およびイムのブロッキングで確認された。2：患者血清を用いた ELISA により、マダラ PA の IgE 反応性は 20 分消化により大幅に減少するが、シロザケ PA では低下の度合いがマダラ PA よりも小さく、30 分消化後もある程度の IgE 反応性を保っていた。3：マウスにマダラ筋肉を経口投与した後、15～60 分で血中 PA 濃度が最大で約 40 ng/ml になる事が確認された。また、この PA は消化をほぼ受けていない状態であることが示唆された。

2 の結果より、PA のペプシン消化耐性は魚種間で大きな差があることが示された。また 1 と 3 の結果より、マダラ PA は消化耐性の高い鶏卵や魚卵のアレルゲンと異なり、口腔粘膜など消化酵素の影響を受けにくい経路を介して生体へ吸収される可能性がある。この吸収経路に関する情報はアレルギー感作を論じる上で重要であり、より詳細な検討を進めていく必要がある。

研究目的

我が国では、魚介類を始めとする海産物は重要な食品原料である。特に魚肉は、カマボコなどの加工食品の原料として広く用いられている一方で、魚肉を原因とする食物アレルギー患者が相当数存在しており、社会的に重要視されている食物アレルゲンの一つである。

それゆえ、魚肉アレルギーに関する報告は多く存在し、複数のアレルゲンタンパク質の存在が知られている。特に、主要な魚肉アレルゲンであるパルブアルブミン（以下、PA）については、その構造や魚肉アレルギー患者血液中の IgE 抗体（以下、IgE）との結合部位に関する情報が多数報告されている¹⁾。一方、食物アレルゲンとして喫食された PA 体内挙動に関する情報、すなわち吸収時の消化状態や吸収量に関する知見の蓄積は十分ではない。加えて、魚肉の多くが調理加工された上で喫食されるにも関わらず、加熱による PA の構造変化が消化性や IgE との反応性などアレルゲン性に関わる諸性質に与える影響についても知見が少ない。これらは食物のアレルゲン性を論じる上で極めて重要な情報であり、アレルギー発症機序の解明や低アレルゲン化食品の開発においても貴重な知見と言える。

そこで本研究では、マウスを用いた *in vitro* 系によって、魚肉 PA の消化吸收動態を調査と、構造変化が消化管内における PA の挙動に及ぼす影響の解明を目指し、各種測定法の構築とそれを用いた検討を行った。

研究計画及び研究手法

本研究は以下の 5 段階で実施した。

1. 定量系の確立

当初、先行研究にて作製したマダラ PA に対する動物由来の IgG 抗体（以下、a-Po）を用いたイムノブロッティング（以下、IB）と ELISA を使った複数魚種の測定を予定していた。しかし、計画遂行の途中で a-Po の魚種特異性が想定よりも顕著であり、IB はともかく ELISA では他魚種の PA に対する反応性がとても低い事が判明した。そこで予定を変更し、対象とする魚種をスケトウダラとシロザケからマダラとシロザケに変更した。加工原料としての使用頻度はスケトウダラに劣るものの、マダラは喫食頻度の高い魚種であり、北海道での水揚げ量も多い。そこで、マウス血液中のマダラの PA を測定対象とした ELISA 系を a-Po を用いて作製し、分析条件の最適化を行なうこととした。またこれと並行して、シロザケ PA に対する動物由来の IgG 抗体（以下、a-Sa）を作製し、これを用いた評価系を新規に作製することとした。

2. 各種 PA サンプルの調製

段階 1 の変更に伴い、シロザケ PA 評価系構築の作業が追加されたことにより、シロザケ PA に対

する抗体作製のための PA 精製法の構築に時間を割いたため、加熱や Ca イオンの除去と言った検討を行なうことができなかった。

3. 各種 PA サンプルの消化性および IgE 反応性の比較

マダラおよびシロザケ PA を、ペプシン用いた人工消化系に供し、その消化挙動を SDS-PAGE、ゲルろ過および a-Po を用いた IB によって観察した。同時に、IgE に対する反応性の変化を調査した。

4. マウスを用いた消化性および吸収性の検討

マダラ PA をマウスに経口投与した後、血液中の PA 濃度を、a-Po を用いた ELISA で経時的に測定した。また、PA を投与後、15 分後に消化管を摘出し、その内容物中の PA 断片を a-Po を用いたイムノブロッティングによって測定した。

5. 結果の総括

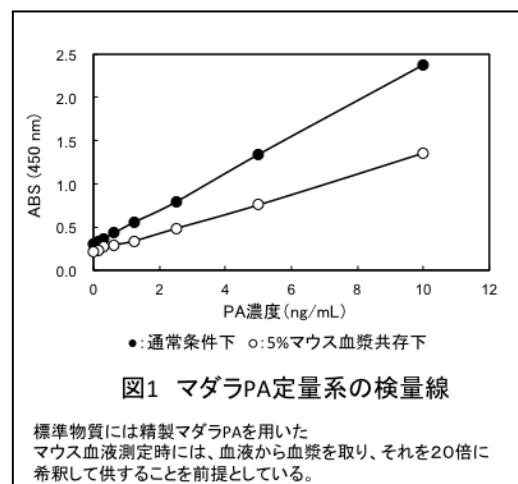
以上の測定で得られた結果を総括し、PA の消化吸収動態と、消化吸収された PA の IgE 反応性の変化を加工処理に伴う構造変化と関連づけて考察した。

結果と考察

1. 定量系の構築

ア:マダラ PA 定量系の構築

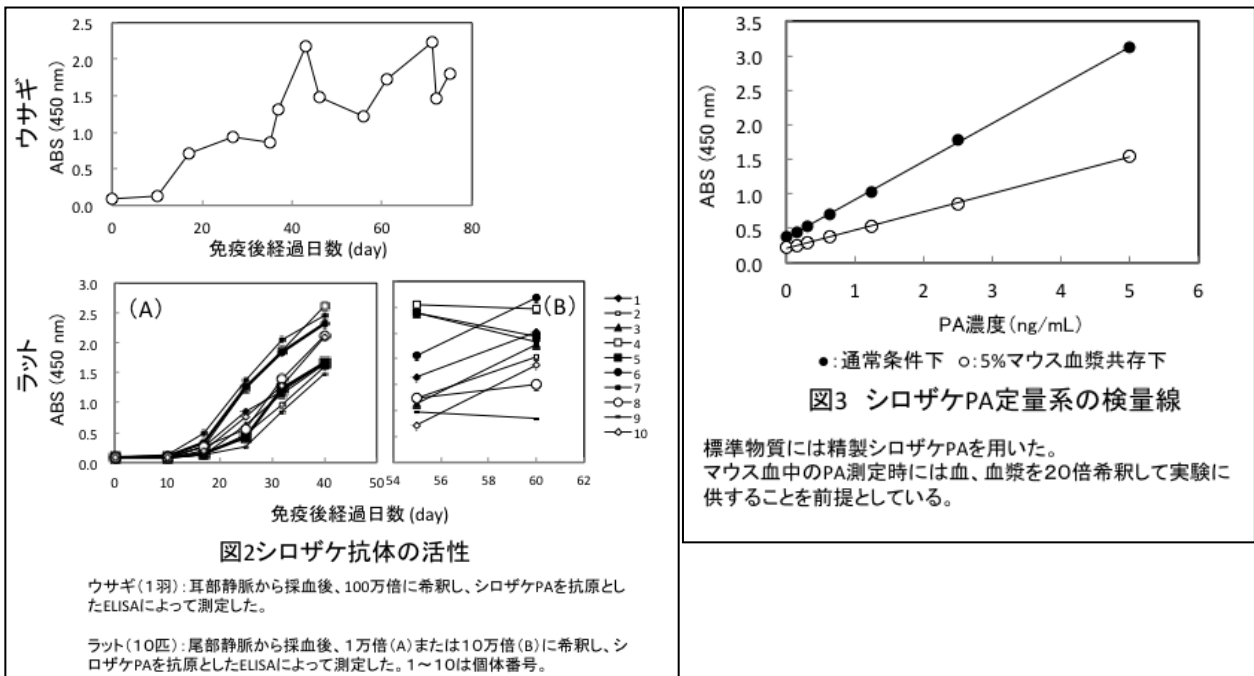
a-P を用いたマダラ PA の検知系として IB およびサンドイッチ ELISA を構築した。この系では、一次抗体にウサギから得た a-Po、二次抗体にラットから得た a-Po を使い、三次抗体として市販の HRP 標識された抗ラット IgG 抗体を使った。この系で作製した検量線を図 1 に示す。この系は、マウス血漿成分が共存していても検量線は良好な直線性を維持しており、検出感度も十分に高いものであったため（検出限界：0.049 ng/ml、定量限界：0.246 ng/ml）、この系をマウス血液中の PA 定量に使用する事とした。また、ペプシンによって 1~3 分間消化したマダラ PA をこの系に供したところ、ELISA による測定値がブランクに近い値にまで低下した。これにより、この系は極めてインタクトに近い状態の PA のみを検出することが判った。



イ：シロザケ定量系の構築

まず、シロザケ PA の定量系構築のためにウサギおよびラットを用いてシロザケ PA に対する抗体 (a-Sa) を作製した。作製には精製したシロザケの PA とフロイントの完全アジュバンドを用いた。これらを混合し、PA 濃度 0.5 mg/ml としたエマルジョンをウサギの場合は 1.0 ml 背部に皮下注射し、ラットの場合は 0.1 ml を後ろ足の大腿部に筋肉注射した。さらに、約一週間おきに耳部静脈または尾部静脈から採血してから遠心分離によって血漿を得て、そこに含まれる IgG の力価を、精製 PA を用いた ELISA によって測定した。力価が前回採血時と比較して上昇していない場合、初回免疫と同じエマルジョン 0.5 ml を背部に皮下注射した。これを力価が基準値に達するまで行なった (図 2)。基準値は過去の実績から「血漿を 100 万倍希釈 (ウサギ) または 10 万倍希釈 (ラット) 時の ELISA の測定値が 1.5」と設定した。先行研究で作製した a-Po と同等の力価が得られた所で全採血を行い、その血液から IgG を精製し、これらをウサギおよびラット由来の a-Sa として実験に用いた。

次に、これをマダラ PA の定量系と同様にウサギおよびラットの a-Sa を組み合わせてサンドイッチ ELISA を構築し、検量線を作製した。結果を図 3 に示す。マダラと同様に、マウス血漿成分共存条件下であっても良好な直線性が得られ、検出感度も十分な値であった (検出限界 : 0.19 ng/ml、定量限界 : 0.39 ng/ml)。これをもって、シロザケ PA の定量系が完成したと判断した。



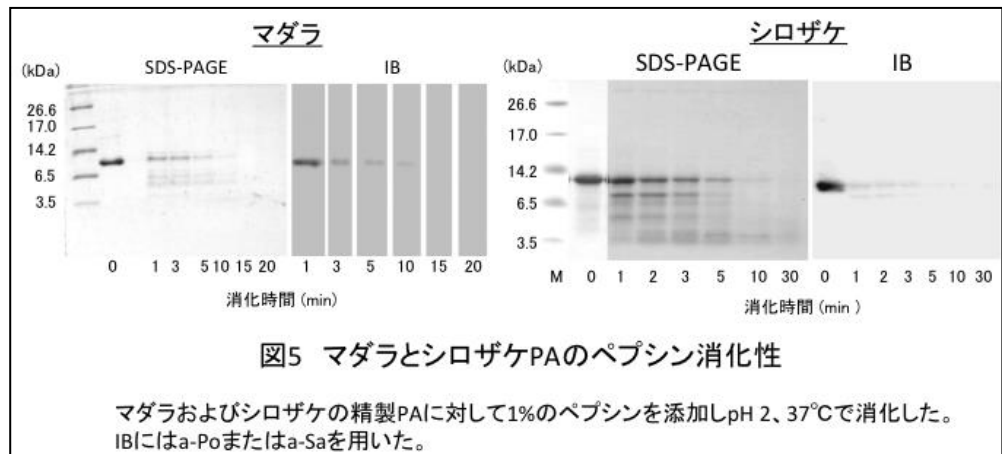
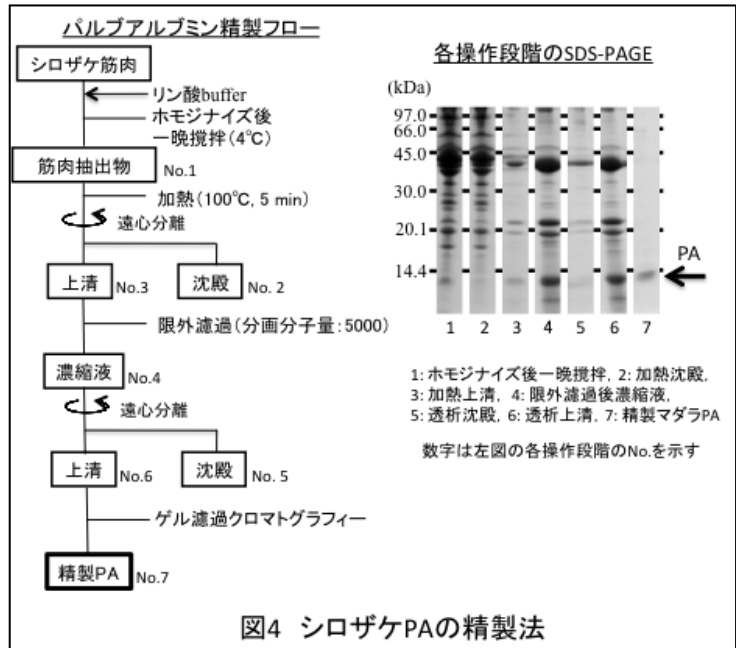
2. 各種 PA サンプルの調製

シロザケ PA の精製法を構築した。結果を図 4 に示す。抗体作製およびマウス投与に用いるにあたり十分な精製度の PA を得る事ができた。

3. 各種 PA サンプルの消化性および IgE 反応性の比較

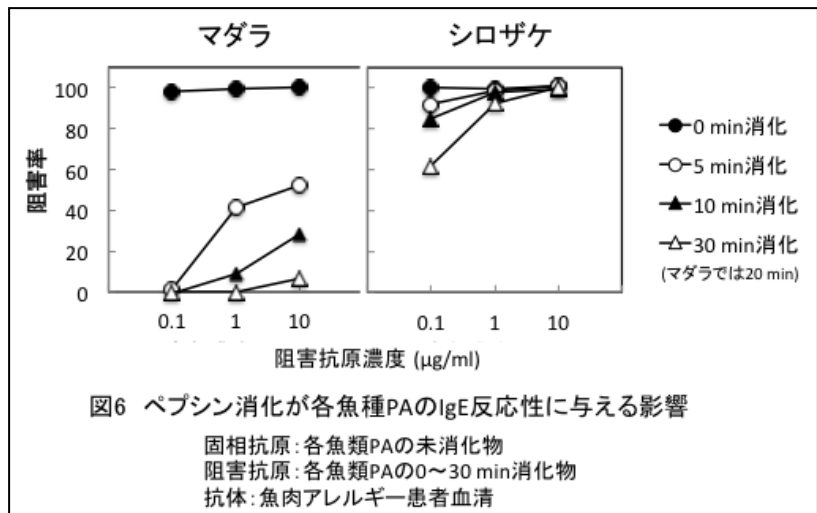
マダラとシロザケの PA をペプシン消化 (ペプシン量: PA の 1%, pH 2, 37°C) に供した。結果を図 5 に示す。SDS-PAGE 上では、マダラ PA では 10 分間、

シロザケ PA では 30 分間の消化でインタクトな PA のバンドがほぼ消失することが確認された。この結果は IB でも同様に、マダラ PA は消化



10分後、シロザケ PA では 30分後にインタクトの PA の反応バンドがほぼ消失していた。これらの結果は、イクラのアレルゲン (β' -component) ²⁾や鶏卵アレルゲン (オボムコイド) ³⁾等と比較して、魚類 PA の酵素消化耐性が低い事を示している。

次に、各 PA 消化物の IgE との反応性を魚肉アレルギー患者血清を用いた阻害 ELISA によって調べた。結果を図 6 に示す。まず、マダラ PA では 30 分のペプシン消化によって IgE との反応性がほぼ消失する事が確認された。一方で、シロザケ PA の IgE との反応性は低下していたものの、30



分消化後も保持されていた。この結果は、シロザケ PA の消化物はこの SDS-PAGE 系では確認できない分子量（約 3,500 以下）にまで低分子化しつつも、IgE との結合部位が分解されずに残存していたが、マダラ PA では、消化によって IgE 結合部位が分解された事を示している。これにより、PA の IgE との結合部位およびその周辺構造のペプシン消化に対する安定性が、魚種によって異なる事が示唆された。

4. マウスを用いた消化性および吸収性の検討

精製したマダラ PA をマウスに経口投与した後、0～60 分まで 15 分おきに尾部静脈より採血し、血液中の PA 濃度を測定した。結果を添付の図 7 に示す。個体によって、吸収量および吸収極大となる投与後経過時間が異なるが、早ければ投与後 15 分で PA が検出され、濃度は最大で約 40 ng/ml に達した。手順 1-A で示したように、用いたマダラ PA 定量系は 1～3 分間のペプシン消化により PA の検出が不可能となるため、検出された PA は胃内でのペプシン消化を受けていない可能性が高い。これを確認すべく、採血した血液を a-P を用いた IB に供したが、明確なバンドは確認できなかった。これは、PA 濃度が低く、IB の検出感度を下回っているためであると推測される。また、投与後 15 分の消化管内容物の IB で、8 個体中 6 個体で胃内容物からインタクトに近い分子量の PA の存在が確認できた。一方、いずれの個体でも腸管内容物からは PA の存在は確認できなかった（添付の図 8）。

5. 結果の総括

手順 4 の血中 PA 定量により、一定量の PA が消化を受けずに血液にまで取り込まれる可能性が高い事が示された。また手順 3 より、マダラ PA の IgE 結合能が数分間のペプシン消化で大幅に低下する事も示されており、加えて手順 4 の IB で、腸管内には PA が確認できなかったことから、経口摂取されたマダラ PA は腸管に到達するまでに消化による低分子化でアレルギー性を喪失している、あるいは投与後 15 分では PA が腸にまで到達していない可能性が極めて高い。これらの結果は、マダラ PA の生体への吸収は腸管ではなく、口腔粘膜など消化を受ける前段階で接触する粘膜で起こっていることを示唆している。一方でシロザケ PA はマダラと比較してペプシン消化に対する耐性が高かった事から、腸管からの吸収が起りえるが、その確認のためにはマダラ PA と同様のマウスへの経口投与実験による検討が必要であり、今後の検討課題の一つである。

今後の研究活動について

本研究では、マウスを用いた検討により、マダラとシロザケの PA がペプシンによって容易に消化されるにもかかわらず、一定量が未消化に近い状態で吸収されることが示唆された。また、吸収

性の測定にまでは至らなかったものの、シロザケ PA の定量系の構築により、複数種の魚肉の消化・吸収性の比較検討を可能とした。ただし、マウス血液中の PA の消化状態を確認するためには、IB 系の感度向上が必要である事が判明しており、これは今後の課題である。この課題が解決できれば、本年度に果たせなかった検討、具体的には、加熱や Ca イオン除去処理を施した状態での PA の消化・吸収性を検討する土台が整ったと判断し、改めてこれらの課題に取り組んでいく。

また今回新たに生じた疑問として、「マダラ、シロザケ以外の魚種でも、PA が持つ IgE 結合部のペプシン消化への耐性が異なるのか？」と「PA は口腔粘膜から吸収されるのか？」の二つがある。これらもまた、魚肉アレルギーを論じる上で重要な要素であるため、検討を進める必要があるだろう。

参考文献

- 1) 濱田友貴. 魚類アレルギーの本体と性状. 塩見一雄, 佐伯宏樹 (編). 魚介類アレルギーの科学, 恒星社厚生閣, 2010 年, 9-20.
- 2) Fujita S, Shimizu Y, Kishimura H, Watanabe K Hara A, Saeki H. In vitro digestion of major allergen in salmon roe and its peptide portion with proteolytic resistance. Food Chemistry, 2012;130:644-650.
- 3) Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J. Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. Int. Arch Allergy Immunol. 2005;136:23-32.

以上