

研究課題名	メイラード反応が甲殻類アレルギーの消化・吸収性へ及ぼす影響の解明
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	令和 2 年度日本水産学会春季大会 (ただし、COVID-19 の影響により大会が中止となったため、要旨掲載のみ)

研究結果要約

本研究グループでは、水産甲殻類（カニ・エビ）の主要アレルギーであるトロポミオシン（TM）のアレルギー性に及ぼすメイラード反応（タンパク質と還元糖との縮合反応、調理加工中に頻繁に起こる）の影響について、消化・吸収性の観点から検証を進めている。本研究では、メイラード反応が TM の吸収性に及ぼす影響について、マウスを用いた動物実験によって検証した。

まず、精製した TM からグルコースとのメイラード反応物（TM-G）を調製した。次に、TM と TM-G をマウスへ経口投与した後、尾部静脈から継時的に採血し、TM と TM-G の血漿中濃度を定量することで、メイラード反応が TM の吸収性に与える影響について検討した。その結果、TM 投与後 15 分で 74.8 ± 61.5 ng/ml、30 分で 36.0 ± 20.2 ng/ml (n=6) の TM が検出された。同様に TM-G でも、15 分で 11.1 ± 14.8 ng/ml、30 分で 4.26 ± 2.77 ng/ml (n=6) が検出された。両者間の有意差は確認できなかったが、TM の吸収量が TM-G よりも多くなる傾向が見られた。また、同じ血清を

イムノブロットに供したところ、TM 投与個体では未消化の TM が確認されたが、TM-G 投与個体からは未消化の TM-G は確認できなかった。以上の結果から、TM は未消化状態で吸収されるが、その吸収はメイラード反応によって阻害される事が示唆された。

研究目的

エビ・カニは我が国における、アレルギー表示制度において表示義務食品に指定されており、食物アレルギーを論じる上で重要なアレルギー原因食品と見なされている。その主要アレルゲンタンパク質は、筋肉タンパク質の一種である TM である。TM は非常に耐熱性が高く、反応性リジン残基が分子表面に多く露出していることから、タンパク質と還元糖の縮合反応であるメイラード反応を起こしやすい。

メイラード反応は、煮熟やレトルト加熱などの調理工程で起きるが、それによって食物アレルゲンの IgE 反応性が増減することが、ピーナッツやホタテ、リンゴなどで報告されている^{1, 2, 3)}。そして、エビ・カニは筋肉部分が利用されるだけでなく、筋肉の煮熟によって得られるエキス成分が産業的に重要な加工原料として活用されている。この煮熟エキスには高濃度の TM が抽出・濃縮されており、メイラード反応物として喫食される頻度が高いと考えられる。しかし、水産甲殻類 TM のアレルゲン性とメイラード反応との関係についての報告は少ない。

他方、食物のアレルゲン性を論じる上で、IgE との反応性だけでなく、消化器官内での消化や吸収性もまた重要視されており、牛乳、大豆、鶏卵などで、アレルゲンの消化性や吸収性やそれを増減させる要素に関する研究が行われている^{4, 5, 6)}。

このような状況を踏まえて申請者らは、水産物由来 TM のアレルゲン性 (IgE 反応性) にメイラード反応が与える影響について、消化性と吸収性の変化に注目して検討を進めてきた^{7, 8)}。そして、本研究申請時点で、カニ TM をペプシン・トリプシン消化した際に生じる IgE 反応性の低下が、メイラード反応によって抑制されることを明らかにした (2019 年、日本栄養食糧学会大会)。この知見は、メイラード反応により、カニ TM が IgE エピトープを維持した状態で生体内へ吸収され易くなり、アレルゲン性が増強される可能性を示唆している。しかしながら、これは in vitro 試験での

酵素消化に基づく知見であり、生体への吸収性については検証されていない。そこで本研究では、マウスを用いた *in vivo* 試験によって、メイラード反応が TM の消化・吸収性へ与える影響を検証した。

研究計画及び研究手法

(1) 精製 TM の調製：

検討対象の甲殻類には北海道で入手が容易なズワイガニを選択し、北海道噴火湾沖にて漁獲されたものを用いた。まず、摘出した足肉をミンチにした後、アセトンで洗浄する事で脂質成分を除去した後、乾燥させた。次に、乾燥物に抽出バッファー（1 M KCl、10 mM 2-メルカプトエタノール、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)）を加えて抽出した水溶性画分を、20 分間煮沸した後、遠心分離によって上清を回収した。以降、この煮沸上清を粗精製溶液、その溶質を粗精製 TM（以下、CTM）と呼称する。そしてこの CTM を、等電点沈殿および硫酸分画に供して共存物を除去した後、ハイドロキシアパタイトを担体としたカラムクロマトグラフィーによって精製 TM を得た。

(2) メイラード反応物の調製：

まず、精製 TM 溶液または CTM 溶液（終濃度 1 mg/ml）に 0.1 M グルコースを溶解した後、凍結乾燥させた。次に乾燥物を 60°C、相対湿度 35% で 24 時間反応させた後、0.15 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)（以下、TBS）を加えて反応を止め、使用時まで -60°C で保管した。以降、この条件で反応させた精製 TM を TM-G、同じく粗精製物を CTM-G と呼称する。

(3) TM-G 検知・定量系の構築：

本研究では、マウス血中へ移行した TM および TM-G の検知・定量系として抗 TM 抗体を使用した ELISA 系を構築した。また、用途を鑑み、「十分な検出感度」、「マウス血漿成分共存下でも使用可能」、「TM と TM-G を同程度の感度で検出可能」の 3 条件を満たすよう構築した。具体的な目標感度は、大豆アレルゲンや鶏卵アレルゲンの吸収性に関する報告^{5, 6)} および当研究室で行

なった、いくら⁸⁾、魚肉（2019 年、第 73 回日本栄養食糧学会大会、3F-03p）の吸収性試験を考慮し、「定量下限が 1 ng/ml 以下」と設定した。

本研究では、次に述べる 2 種類の検知・定量系を用いて検証した。まず、先行研究（平成 28 年度、日本水産学会大会、941 番）で確立した TM を対象とした検知・定量系（以下、ELISA-1）に TM-G と CTM-G を供し、メイラード反応した TM への適用の可否を検証した。また、検証の結果に基づいて抗体の組み合わせなどを変更した ELISA-2 を構築した。これら二つの ELISA 系の抗体構成を Table 1 に示す。また、系の検出限界および定量下限は、ブランクの平均値にブランクの標準偏差の 3 倍（検出限界）または 10 倍（定量下限）を加算した値を基準に算出した。

Table 1. 本研究で用いたTM検知・定量系の概要

	ELISA-1	ELISA-2
一次抗体	抗TM-IgG (<u>ラット</u> 由来ポリクロ、自作)	抗TM-IgG (<u>ウサギ</u> 由来ポリクロ、自作)
二次抗体	抗TM-IgG (<u>ウサギ</u> 由来ポリクロ、自作)	抗TM-IgG (<u>ラット</u> 由来ポリクロ、自作)
三次抗体	抗TM-ウサギIgG-HRP標識 (Bio-Rad社)	抗TM-ラットIgG-HRP標識 (BioLegend社)
発色基質	KPL社、SureBlue	KPL社、SureBlue
ブロッグ剤	1%BSAを含むTBS	1%BSAを含むTBS

(4) TM 試料のマウスへの経口投与による消化・吸収性の調査：

TM または TM-G をマウス（ICR、7 週齢、オス）に、体重 1 kg あたり 50 mg となるよう経口投与し、投与後 0、15、30、60 分経過後に尾部静脈より採血した。また経口投与では、胃までゾンデを通して直接注入した。そして得られた血液をリン酸バッファーで pH 7.5 に調整した生理食塩水で 10 倍に希釈した上で遠心分離に供し、その上清を 10 倍希釈血漿として回収した。その血漿の一部を、抗 TM 抗体を用いたイムノブロットィング（以下、IB）に供した。さらに残りの血漿を、ELISA のアッセイバッファーで 2 倍に希釈した後、前述の ELISA 系に供した。

また、同様に経口投与した後、15 分経過時に開腹して消化器官を摘出した。その後、消化器官

を胃、空腸、回腸に分け、各々から消化物を採取した後、抗 TM 抗体を用いた IB によって、TM の消化状態を観察した。

(5) マウスを用いた TM の吸収経路の調査：

研究当初、麻酔下のマウスを開腹し、腸管の上下を結紮した腸管ループへの TM 試料投与、そして、試料投与後のマウスから摘出した胃や腸管の免疫色による吸収部位や吸収経路の調査も予定していた。しかし、(3) の検証に想定以上の時間と労力を取られたため、これらの検証を行うことができなかった。

結果と考察

(1) TM-G および CTM-G の調製：

メイラード反応前後の TM および CTM の SDS-PAGE および IB を Fig.1 (レーン：粗および精、上段が未反応物、下段が反応物) に示す。TM、CTM 共に、メイラード反応に伴う明確な TM バンドの移動度の低下が確認できた。加えて、両 TM の移動度の変化に大きな差は見られなかったことから、TM-G および CTM-G が、メイラード反応が十分に進行した試料であると判断した。

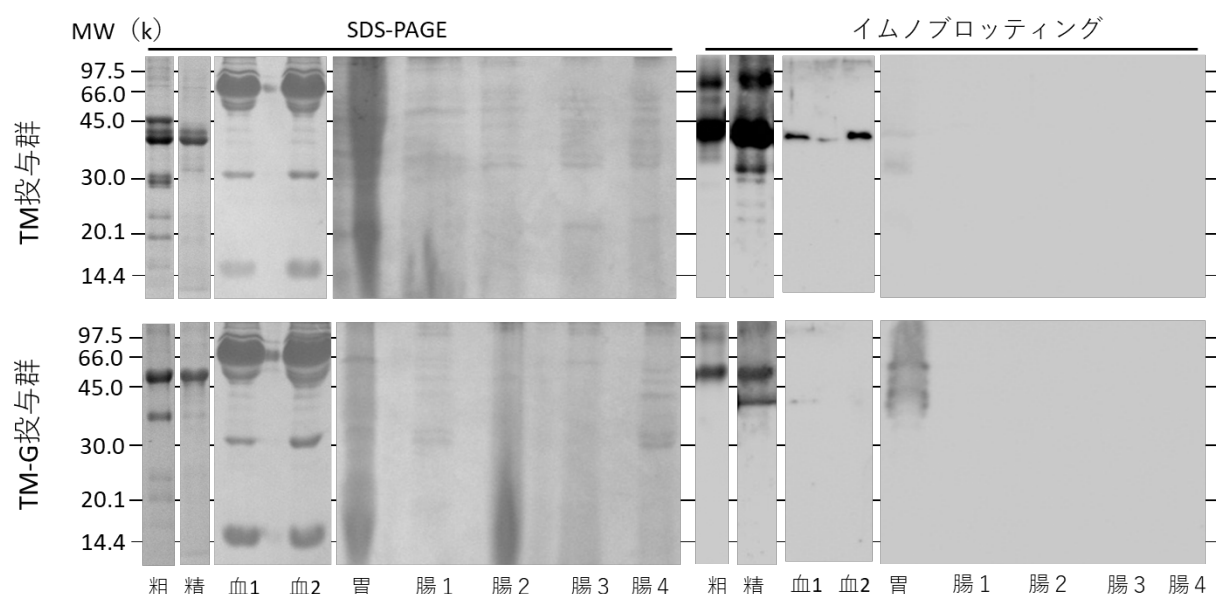


Fig. 1. マウスに投与したTMおよびTM-Gの消化管内挙動と血中への移行

粗：粗精製TM (TM)、精：精製TM (CTM)、血1、2：マウス血清（個体1、2）、胃：胃内容物
腸1～4：腸内容物（数字は十二指腸から大腸に向かってのサンプリング番号）
血清および内容物はサンプル投与15 min後に採取した。イムノブロットングには抗TM抗体を用いた。

(2) TM-G 検知・定量系の検証：

先行研究にて構築した ELISA-1 に、1 ng/ml の TM と CTM および両者のメイラード反応物 (TM-G, CTM-G) を ELISA-1 に供して、それぞれの反応性を比較した。結果を Fig.2 (左) に示す。

まず、TM のメイラード反応物である TM-G の反応吸光度（以下、シグナル）は TM の約 50 % と低値であった。この結果から、ELISA-1 は TM-G の定量にも使用可能ではあるものの、シグナル低下に伴う検出感度の低下があると判断した。さらに、CTM と CTM-G のシグナルを比較する

と、CTM-G は CTM の約 17%となり、精製 TM の場合よりもメイラード反応によるシグナル低下が顕著であった。この理由については、CTM に共存する各種のタンパク質（SDS-PAGE から、アクチンやトロポニンと推測される）がグルコースとメイラード反応を起こす際に、TM と抗体の結合を阻害する物質を生成する可能性や、TM と各種タンパク質が同時にグルコースと反応した際にタンパク質凝集物を形成し、その構造が TM と抗体間の反応を阻害した可能性が考えられる。

本研究では、試料調製の容易さから CTM と CTM-G を動物投与試料とし、また TM と TM-G を検量線用標準物質として用いる計画であった。しかし、Fig.2 で示したように、ELISA-1 ではメイラード反応に伴うシグナル低下の度合いが、TM と CTM で大きく異なるので、CTM-G 定量時の標準物質として TM-G を用いる事ができないと判断した。そこで当初の計画を変更し、TM を大量精製した上で、TM および TM-G を動物投与試料として用いることにした。

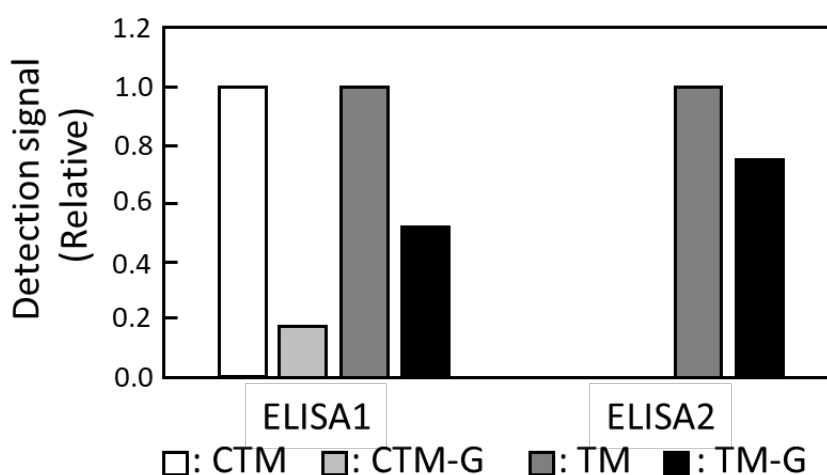


Fig. 2.メイラード反応がTMとCTMのELISA測定におよぼす影響

TM: 精製TM CTM: 粗TM

TM-GおよびCTM-G: それぞれTMとCTMのメイラード反応物.

ELISA1, 2: Table 1を参照.

Detection signalは、各試料の検出吸光値からBlank値を減じ、TMまたはCTMの値を1とした相対値.

(3) ELISA 系の感度の改善：

ELISA-1 で確認された TM-G 測定時の感度低下を改善するため、使用抗体の変更と使用濃度の最適化を行ない、抗体構成を変更した ELISA-2 を構築した (Table 1 を参照)。この系に TM および TM-G を供した結果を Fig.2 に示す。これによると、TM-G のシグナルは TM の約 75% となり、ELISA-1 よりもメイラード反応に伴うシグナルの低下を抑制できたものの、TM と TM-G のシグナルの差を無くすことはできなかった。そこで、対応策として、TM 定量時には TM、TM-G 定量時には TM-G を用いて、検量線を各々作成することにした。さらに、同一濃度での TM と TM-G のシグナルがほぼ等しくなるように、TM-G 測定時の二次抗体濃度を TM 測定時の 2 倍にした。

以上の条件で TM、および TM-G を用いて作製した検量線を Fig.3 に示す。また、TM 投与を行っていないマウスから得られた血漿に各 TM を標準添加することで作製した検量線も同時に示す。TM、TM-G いずれにおいても、マウス血漿成分共存時に約 20% のシグナルの低下が見られたものの、どちらも、定量下限が 1 ng/ml を下回っていた。以上の結果から、ELISA-2 が必要な感度を持ち、なおかつマウス血漿成分共存下においても、使用可能であることが確認できた。

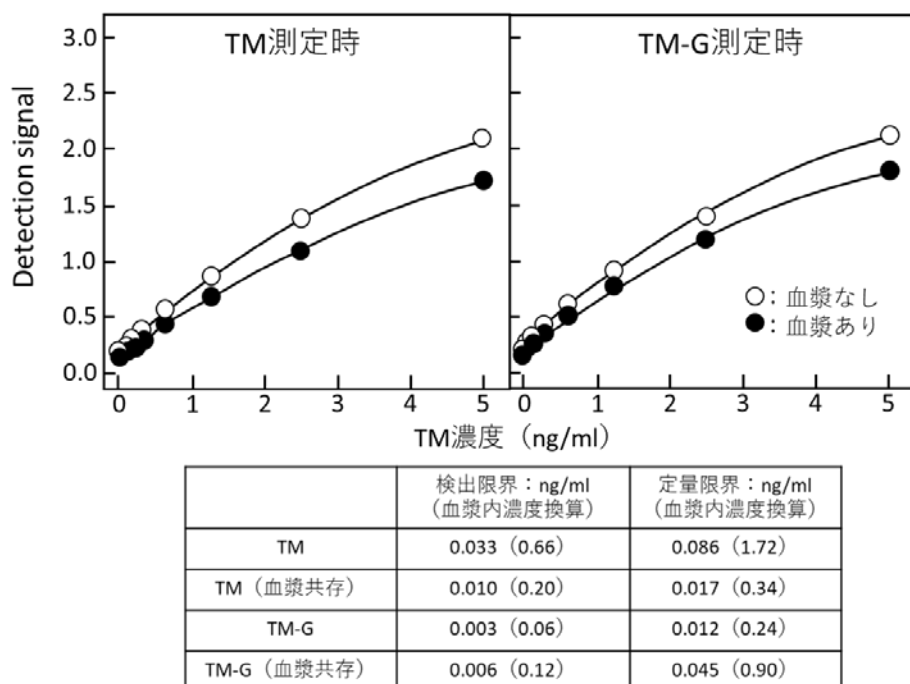


Fig. 3. TMおよびTM-G検知・定量系の感度およびマウス血漿成分の影響

血漿内濃度：採取した血漿は20倍に希釈して測定に供するため、測定値の20倍濃度となる。

(4) TM および TM-G の吸収性：

マウスへの経口投与した TM および TM-G の血液中への移行量を Fig.4 に示す。まず、TM 投与群に注目すると、投与後 15 分の時点で、血中から TM が検出された。1 個体のみ 1300 ng/ml を超える個体が見られたが、それを除いても平均 74.8 ± 61.5 ng/ml が検出された。そして、投与後 30 分でも 1 個体み飛び抜けて値が大きな個体が見られたが、それを除けば 36.0 ± 20.2 ng/ml の TM が検出された。以上の結果から、少なくとも投与後 15 分で、TM の血液中への移行が始まり、それが少なくとも 60 分間継続することが判った。続いて TM-G 投与群に注目すると、TM と同様に投与後 15 分から血液中への移行が確認され、それが 60 分まで継続していた。

その一方で移行量を見ると、飛び抜けて大きな 1 個体を除けば、投与後 15 分で 11.1 ± 14.8 ng/ml、30 分で 4.3 ± 2.77 ng/ml であった。TM と TM-G の結果を比較すると、有意差は確認できないが、TM-G 投与群の方がその吸収量が小さくなる傾向が見られたことから、TM の吸収がグルコースとのメイラード反応によって阻害される可能性が示唆された。

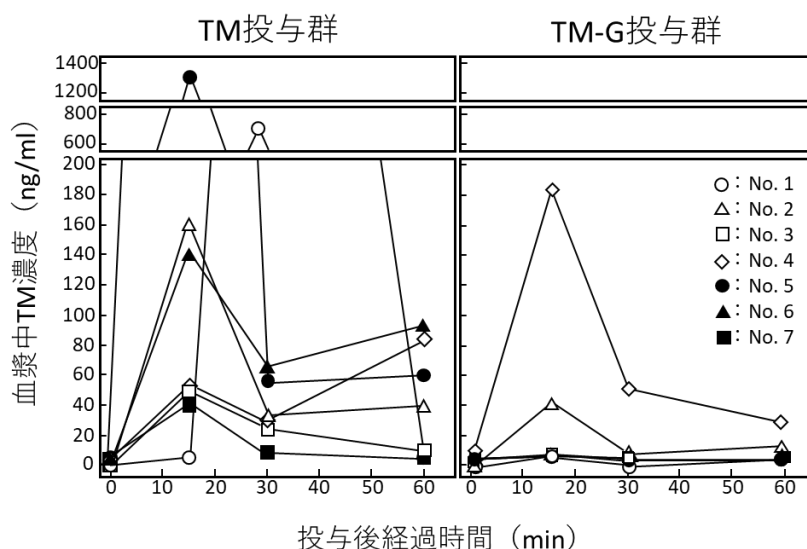


Fig. 4. 各TM試料をマウスに経口投与した際の血漿中TM濃度変化

(5) 血液中へ移行した TM の消化状態の観察：

(4) において、比較的大きな値を示した TM 投与群の No.1 (30 min) と No.5 (15 min)、

そして TM-G 投与群の No.2 (15 min) と No.4 (15 min) の血漿を、抗 TM 抗体を用いたイムノブロッティングに供した。結果を Fig.1 (レーン：血 1、2) に示す。まず TM 投与群の 2 個体を見ると、いずれもインタクトの分子量に近い TM のバンドが確認できたため、喫食された TM の少なくとも一部は、未消化の状態で血中へと移行すると考えられる。

一方で TM-G 投与群の結果を見ると、1 個体で TM 投与群と同様の、インタクトの未反応 TM に近い分子量のバンドだけが見られた。しかし、その像は薄く、TM-G 投与群の血漿中 TM 量が、TM 投与群のそれよりも少ないことを示していた。これは、前述の定量結果 (TM 投与群の 2 個体は各々 1300 や 700 ng/ml 程度、TM-G 投与群は 40 や 180 ng/ml 程度) と一致している。さらに、同図に示した IB 上の TM-G のレーンに注目すると、主たるバンドが二本確認できる。これを TM のレーンと比較すると、低分子側がメイラード反応が進んでいない未反応 TM で、高分子側が TM-G だと判断できる。そして、IB 上では未反応 TM のバンドが明確に確認できるが、SDS-PAGE 上では未反応 TM のバンドは極めて薄い。その一方で、TM-G のバンドは SDS-PAGE 上でも明確に確認できるため、投与試料において TM-G の方が TM よりも圧倒的に多量であると判断できる。しかし、前述のように、マウス血清中から確認されたバンドは未反応 TM だけであり、TM-G に相当するバンドは確認できなかった。以上の結果は、グルコースによるメイラード反応を受けた TM の吸収性は、TM と比較して大きく低下する事を示唆しており、これは (4) の結果と一致している。

(6) 腸管内容物の確認：

マウスに TM および TM-G を経口投与し、15 分経過後、開腹して胃腸を取り出し、内容物の存在が確認された部位 (胃および腸から 4 カ所) を切り出した上で、その内容物から抽出物を調製し、抗 TM 抗体を用いた IB に供した。結果を Fig.1 (レーン：胃～腸 4) に示す。これによるとインタクトに近い分子量の TM と TM-G が胃内で確認できたが、腸管からは TM の存在は確認できなかった。以上の結果から、血液中で確認された未消化 TM の吸収が腸管全体で起きているのではなく、胃の幽門部直下で起きたものと推測される。さらに、鶏卵アレルギーのオボアルブミ

ンでは、胃からの吸収が報告されている⁶⁾ ため、TM についても同様の吸収が起きている可能性がある。

(7) 総括：

本研究により、「1. 喫食された甲殻類 TM の一部は、未消化状態で血液中に取り込まれる」および「2. グルコースとのメイラード反応は甲殻類 TM の血液中への移行を妨げる」、そして「3. TM の吸収は主に胃で起こる」の三つの可能性が示された。以上の結果を総括すると、メイラード反応は TM の吸収性を阻害し、そのアレルゲン性を低下させる可能性が高いと結論づけられる。ただし、前述のように、*in vitro* の消化試験において、メイラード反応によって TM の消化性が低下し、IgE 反応性が維持され易くなることが、先行研究で確認されている。この結果のみを見れば、メイラード反応は TM のアレルゲン性を増強するとの結論になる。しかし、今回の実験では経口投与後 15 分と言う短時間で血液中への移行が確認されており、十分な消化を受けているとは言い難い。実際に本研究では、血液中から未消化に近い状態の TM が検出されている。これはマウスを用いた実験結果ではあるが、人間に置き換えた場合でも、即時型食物アレルギーの多くが喫食後 2 時間以内で発症する⁹⁾ ことを考慮すれば、十分な消化を受けずに血液中へと吸収されている可能性が高い。それ故、メイラード反応に伴う吸収性の低下がアレルゲン性に与える影響は極めて大きいと考えられるため、「メイラード反応は TM のアレルゲン性を低下させる」と結論づけた。

今後の研究活動について

本研究では、TM および TM-G のマウスへの経口投与実験において、TM-G の吸収量が TM よりも少なくなる傾向が見られたが、個体間差が大きく、有意差は確認できなかった。それ故、追試による再現性の確認と n 数の増加を、第一に行なう。

次に、メイラード反応が TM の吸収を阻害する機序の解明が必要である。ただし、まずはメイラ

ード反応していない TM が未消化の状態で吸収される経路や機序に関する知見の充実が必要である。これについては、以下に述べる二つの検討を行う。

まず、第一に消化管ループ法を用いた吸収部位および経路の確認である。すなわち、マウスを深麻酔下で開腹して胃または腸管の上下端を結紮してループとし、TM 試料を注入する。その後、血液中の TM 濃度の変化を調査する事で、TM の吸収部位を特定する。

そして、第二の実験は免疫染色による、吸収経路の調査である。具体的には、第一の実験において TM の吸収が確認できた消化管上皮を摘出し、抗 TM 抗体を用いた免疫染色に供し、吸収経路（タイトジャンクションあるいは細胞質経由）を特定する。その後、同様の実験を TM-G で行い TM と比較する事で、TM の吸収性におよぼすメイラード反応の影響について、吸収部位や経路の視点から議論したい。

参考文献

- 1) Gruber P, Becker WM, Hofmann T. Influence of the maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:2289-96.
- 2) Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H. Effect of maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:7559-64.
- 3) Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hofmann T. Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4002-7.
- 4) Corzo-Martínez M, Soria AC, Belloque J, Villamiel M, Moreno FJ. Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine b-lactoglobulin. *International Dairy Journal.* 2010;20:742-52.
- 5) Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T and Kawada T. Dietary fat and an exogenous emulsifier increase the gastrointestinal absorption of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K, in mice. *Nutritional Immunology.* 2005;135:1738-44.
- 6) Tsume Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, Sezaki H, Watabe K, Kohno T and Yamashita S.

Quantitative evaluation of the gastrointestinal absorption of protein into blood and lymph circulation. *Biological Pharm. Bull.* 1996;19:1332-7.

- 7) Nakamura A, Sasaki F, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H. Changes in Allergenicity and Digestibility of Squid Tropomyosin during the Maillard Reaction with Ribose. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:9529-34.
- 8) Kyosaka I, Fujita S, Shimizu Y, Saeki H. Digestibility in the gastrointestinal tract and migration to blood of β' -component (Onk k 5), a major salmon roe IgE-binding protein. *Food Chemistry*. 2019;289(15):694-700.
- 9) 海老澤元宏他. AMED 研究班による食物アレルギーの診療の手引き 2017. 「食物アレルギーの診療の手引き 2017」検討委員会. 2018.

以上