

ニッポンハム食の未来財団 2020 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	メイラード反応が魚肉アレルギーの消化・吸収性に及ぼす影響の解明
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	2020 年度日本農芸化学会北海道支部/第 50 回日本栄養・食糧学会北海道支部合同学術講演会.

研究結果要約

本研究では、魚肉の主要アレルギーであるパルブアルブミン (PA) のアレルギー性におよぼすメイラード反応の影響について、消化・吸収性の視点から調査した。まず、対象魚種としてシロザケを用い、その筋肉から粗精製 PA、およびそれをグルコースとメイラード反応させた PA-G を調製した。そして、これらをマウスに体重 1 kg あたり 69 mg 経口投与した後、経時的に尾部静脈から採血、あるいは投与から 15 分または 60 分後に開腹して肝門脈から採血し、PA と PA-G の濃度を比較した。その結果、PA 投与群では投与 15 分後に痕跡量から 236.25 ng/ml の範囲 (n=10) で PA が検出されたが、その後は検出量が大きく低下した。一方、PA-G 投与群では、投与 15 分後には PA-G が痕跡量程度しか検出されず、その後 60 分まで観察したが PA-G 濃度の増加は見られなかった。なお、試料投与後 15 分の時点では、どちらの PA 投与マウスにおいても腸内に一定量の PA が観察されたが、肝門脈血中では、投与後の経過時間に依らず、いずれの PA 試料でも痕跡量程度しか検出されなかった。以上の結果は、グルコースとのメイラード反応が PA の腸管吸収性を損なう事を示唆している。さらに、PA が肝門脈に依存しない経路で末梢血まで移行した可能性も示唆された。

研究目的

島国である日本では、古来より魚肉は重要なタンパク源であり、畜肉の喫食が一般的となった現在でも多くの需要がある。その一方で、魚肉を原因食品とするアレルギー患者が一定数存在しており、アレルギー表示制度の対象品目に「さけ」や「さば」が指定されているなど、アレルギー原因食品としても社会的に重要視されている。魚肉の主要アレルギーは、筋肉タンパク質の一種であるパルブアルブミン（以下、PA）であり、その構造や諸性質について種々の知見が蓄積されている^{1,2)}。また、魚肉は多くの場合、何らかの調理加工を施された上で喫食されることから、調理加工がPAのアレルギー性におよぼす影響に関する知見も極めて重要であると認識され、加熱による変化³⁾などに関する報告が存在する。当研究グループでも、PAのペプシン・トリプシン消化に伴うIgE結合能の低下が、グルコースとのメイラード反応によって促進されることを見出している（2019年度、日本水産学会春季大会）。しかし、これらはin vitro試験によって得られた知見であるため、生体内での挙動についてin vivo試験で改めて検討する必要があると考え、本研究計画の立案に至った。

本研究で取り扱ったメイラード反応は、還元末端を持つ糖がタンパク質と結合する反応であり、調理加工中に頻繁に起き、独特の色彩や香気が発生することが知られている。特別な試薬を用いる事なく、容易にタンパク質への糖鎖導入が可能であることから、この反応を利用したタンパク質の機能の制御に関する研究も行われている。当研究グループでも、魚肉へのメイラード反応による溶解性の変化に関する報告をしている⁴⁾。また、メイラード反応によるアレルギー構造の変化により、ピーナッツ⁵⁾、果物⁶⁾、軟体類^{7,8)}そして牛乳⁹⁾のアレルギータンパク質のIgE結合能や消化性が変化することが報告されるなど、アレルギー性へ影響をおよぼすことが知られている。当研究グループでは、特にメイラード反応によるアレルギーの消化性や吸収性の変化に注目しており、先行研究において、マウスへの経口投与試験により、カニの主要アレルギーであるトロポミオシンの吸収性がグルコースとのメイラード反応によって低下する傾向があることを見出した（2020年度、日本水産学会春季大会）。

本研究では、そのトロポミオシンと同様の手法によって、メイラード反応が魚肉PAのアレルギー性に及ぼす影響について、消化と吸収性の視点から調査することを目的とした。

研究計画及び研究手法

(1) PA サンプルの調製

北海道沖で漁獲された生鮮シロザケの筋肉から 10 mM NaCl 溶液を用いてタンパク質の抽出液を調製した。次に HCl を加えて抽出液の pH を 4.6 に調整した後、NaOH を加えて pH を 7.0 に再調整し、生じた沈殿を遠心分離で取り除くことで、PA の粗精製物（以降、cPA）を調製した。次に、この cPA にグルコースを添加して凍結乾燥させた後、60°C、相対湿度 35% で 24 時間インキュベートすることで、メイラード反応物（以降、cPA-G）を調製した。これら、cPA および cPA-G をマウスへの経口投与サンプルとして用いた。また、cPA からゲル濾過クロマトグラフィーによって精製 PA（以降、pPA）した後、cPA と同様の方法でグルコースとのメイラード反応物（pPA-G）を調製し、後述のサンドイッチ ELISA における検量線作成時の標準物質として用いた。

(2) 定量系の構築

消化器官からマウス血液中へ移行する PA 量の測定に、先行研究（食の未来財団、平成 28 年度、個人研究助成課題）にて構築したサンドイッチ ELISA 系を応用した。系の詳細を以下に述べる。

まず、精製したシロザケ PA をウサギおよびラットに免疫することで、2 種の抗シロザケ PA ポリクローナル IgG（以下、a-PA）を作製した。そして、ウサギ由来の a-PA を一次抗体とし、ラット由来の a-PA を二次抗体、さらに HRP 標識 a-ラット IgG（BioLegend 社）を三次抗体としてサンドイッチ ELISA を構築した。検量線作成時の標準物質は、測定対象（cPA または cPA-G）に応じて、前述の pPA または pPA-G を用いた。PA 定量の対象である血液（血漿）は、血漿成分による測定系への干渉を軽減するため、TBS およびアッセイバッファーで 20 倍に希釈してから本系に供した。さらに検量線の作成にあたっては、PA 非投与マウスから採取した血漿をアッセイバッファーで 20 倍に希釈した溶液を用いて希釈系列を作成した。本定量系の感度評価は、検出限界と定量下限を目安として行った。検出限界はブランクの平均値に対してブランクの標準偏差の 3 倍を、定量下限はブランクの標準偏差の 10 倍を加算した値を、各々検量線に代入して算出した。

結果の項でも述べるが、当初の計画では PA-G に対する抗体を作製して ELISA 系の構築に用いる

予定であったが、a-PA を用いた ELISA 系でも PA-G の定量が可能であることを確認したので、PA-G 抗体の作製とそれを用いた定量系の構築は行わなかった。

(3) マウスへ経口投与試験

投与対象には ICR マウス（雄、7-8 週齢）を用いた。対象マウスを 16 時間絶食させた後、尾静脈から投与前採血を行なった後、ゾンデを用いて、生理食塩水（一匹あたり 150 μ l）、cPA および cPA-G（各々体重 1 kg あたり 69 mg）を、ゾンデによって経口投与した。投与後、補定器に入れて静置し、投与後 15、30、60 分後に尾静脈から採血を行なった。採取した血液を TBS で 10 倍に希釈した後、遠心分離によって上清として血漿を採取し、それを更に 2 倍に希釈してから ELISA 系に供した。

また、結果の項でも述べるが、尾静脈採血の結果のバラツキが大きかったことから、それを是正するため、当初の計画に無かった以下の実験を追加で行なった。その変更に加えて、COVID-19 に関連した作業の遅れもあり、当初予定していた消化管ループと免疫染色を行なえなかった。追加した実験手順を以下に述べる。

同様の手法で、ICR マウス（雄、8 週齢）に cPA または cPA-G を経口投与してから 15 分または 60 分経過後に、麻酔下でマウスを開腹して肝門脈から採血した。採取した血液から遠心分離によって血漿を分離した後、cPA と cPA-G を定量した。加えて、採血終了後、胃および腸（胃直下から盲腸の手前まで）から内容物を採取し、イムノブロットィングに供することで、PA の消化状態を調査した。

(4) 統計処理

検量線から算出した血漿中 PA または PA-G 濃度を、平均値の算出や有意差検定に供する際、検出限界未満の値を 0 とした。また、検出限界以上で定量下限未満の値は、検量線の定量下限値を代入して計算を行った。また、外れ値の棄却には Smirnov-Grubbs 法、多重比較検定には Tukey-Kramer 法を各々用いた。

結果と考察

(1) PA および PA-G の調製

本研究で調製した pPA-G および cPA-G は、ともにやや緑がかった褐色を呈していた。また、未反応の PA と比較して粘性が高かったが、経口投与に用いる器具（1 mL シリンジおよびゾンデ）を通すことが可能であったため、投与実験での使用には問題ないと判断した。また、PA 試料の SDS-PAGE および a-PA を用いたイムノブロットィングの結果を図 1 に示す。pPA および cPA に、メイラード反応に起因する移動度の変化が観察された。これらのメイラード反応物を pPA-G および cPA-G として実験に使用した。

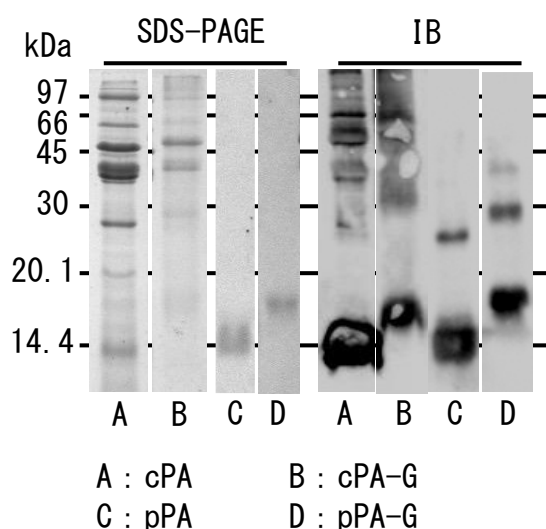


図 1. 精製PAおよびcPAのメイラード反応進行度の確認

(2) マウス血漿中 PA および PA-G を対象とした検知・定量系の構築

ウサギおよびラットの a-PA 抗体を用いて構築したサンドイッチ ELISA の検量線を図 2 に示す。PA および PA-G 共に a-PA 抗体を用いたサンドイッチ ELISA によって良好な検量線を作成する事ができた。この検量線から求めた PA 測定時の検出限界および定量下限は、PA が 0.594 ng/mL および 1.360 ng/mL で、PA-G が 0.951 ng/mL および 2.468 ng/mL となった。ただし、前述のように、血漿の測定に際しては 20 倍に希釈して供するため、実用上の値はこれらを 20 倍した値（PA：検出限界 11.88 ng/mL、定量下限 27.20 ng/mL、PA-G：検出限界 19.02 ng/mL、定量下限 49.36 ng/mL）

となる。先行研究におけるマウス血漿中のアレルゲン定量実験の実績から、これは血漿中のアレルゲン定量に十分な感度であると判断した。

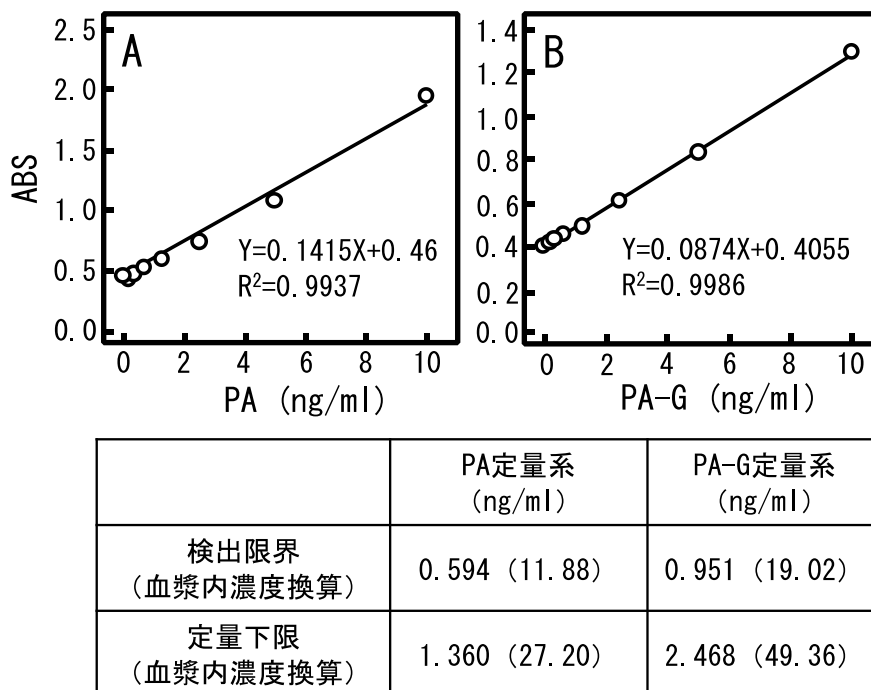


図2. PAおよびPA-G定量系における検量線と検出感度

グラフA : cPA測定用 (pPA使用)

グラフB : cPA-G測定用 (pPA-G使用)

(3) メイラード反応が cPA の消化管吸収性に及ぼす影響

マウスに cPA または cPA-G を経口投与し、投与後 60 分間における尾部静脈中の PA および PA-G の経時変化を図 3 に示す。なお、測定濃度が定量範囲以下で痕跡量のみが検出された場合には、定量下限値をもってグラフ化と統計処理を行った。

図 3 の A および B に示すように、cPA 投与群および cPA-G 投与群 (いずれも n=11) とともに、投与後 15 分経過時点から PA が検出される個体が見られた。これらの値から外れ値を棄却し、平均値としたものを図 4 に示す。両 PA サンプル投与群において、投与後 30 および 60 分経過時の値が小さく、明確に吸収が見られたのは cPA 投与群の 15 分経過時のみであった。また、これらの値を多重比較検定に供した結果、cPA 投与群の 15 分経過時の PA 濃度が、他の試料よりも顕著に高くなる傾

向が見られた。以上の結果は、経口投与された PA が、投与後 15 分以内に抹消血中へと移行することを示している。また、グルコースとのメイラード反応は、この迅速な PA の吸収を強く阻害することが明らかである。

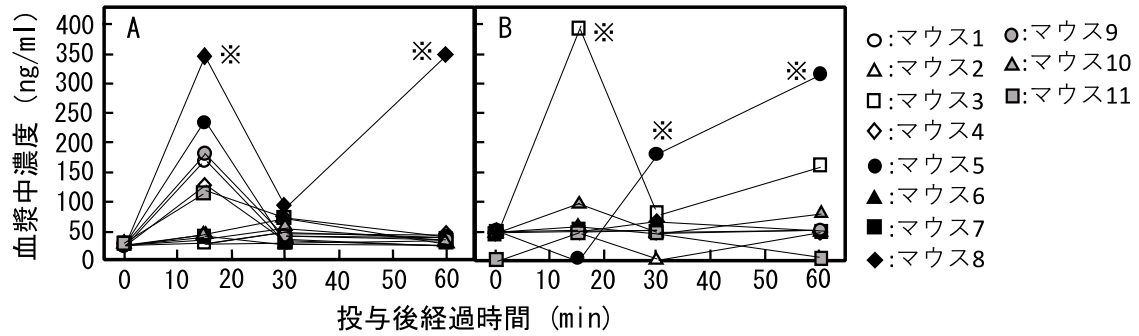


図 3. PA サンプル投与時の血中 PA 濃度の継時変化

※：外れ値 (Smirnov-Grubbs (有意水準 0.05))

A : cPA 投与群 B : cPA-G 投与群

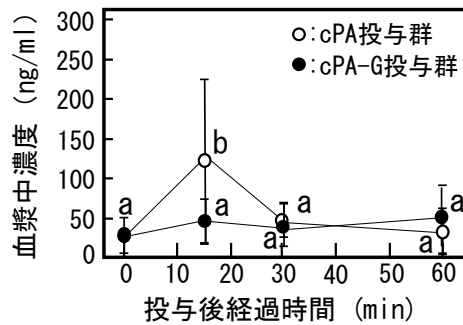


図 4. PA および PA-G 投与群の血中 PA 濃度比較

各シンボルは平均値、エラーバーは SD (n=10 または 11) とした a-b 間には有意差あり (Tukey-Kramer (有意水準 0.05))

(4) マウス消化管内での PA の消化状態

cPA と cPA-G を経口投与したマウス消化管内容物の SDS-PAGE および a-PA を用いた IB の結果を図 5 に示す。図には各 PA 投与群から 1 個体を代表して示した。

まず、上段の cPA 投与の結果に注目すると、投与後 15 分では胃および腸において未消化に近い分子量の PA の存在が確認されたが、投与後 60 分では明確に PA が検出されたのは胃のみであった。

先行研究における、*in vitro* でのトリプシン消化実験において、シロザケ PA が長時間に渡って未消化に近い状態で残存することが確認されている。それゆえ、投与後 60 分で腸内の PA が 3.5 kDa 以下にまで分解された可能性は低いため、PA は盲腸以降にまで移動した可能性が高い。この結果より、尾部静脈採血において、投与後 15 分で検出された血中 PA 濃度が投与後 30、60 分では痕跡量以下であったのは、吸収が起こらないとされる盲腸以降にまで PA が移動したことに起因すると推測される。

次に、下段の cPA-G 投与では、投与後 60 分でも、投与後 15 分より減少傾向が見られるものの、胃および腸の両方で未消化に近い PA の存在が確認された。前述のように cPA-G は cPA よりも高い粘性を持っていた。それ故、cPA-G は cPA よりも腸内での移動速度が遅くなり、60 分後も腸内に残存していたと推測できる。

このように、cPA-G が長時間に渡って腸内に存在するにも関わらず、前述の尾部静脈採血の結果では、cPA-G 投与後 15 分および 60 分のいずれにおいても、血液中から検出された PA は痕跡量程度であった。これらの知見から、メイラード反応による PA 吸収の阻害は、PA の腸における消化の阻害や移動の促進に起因する物ではなく、腸管上皮組織の吸収機構に関わるものであると推測される。

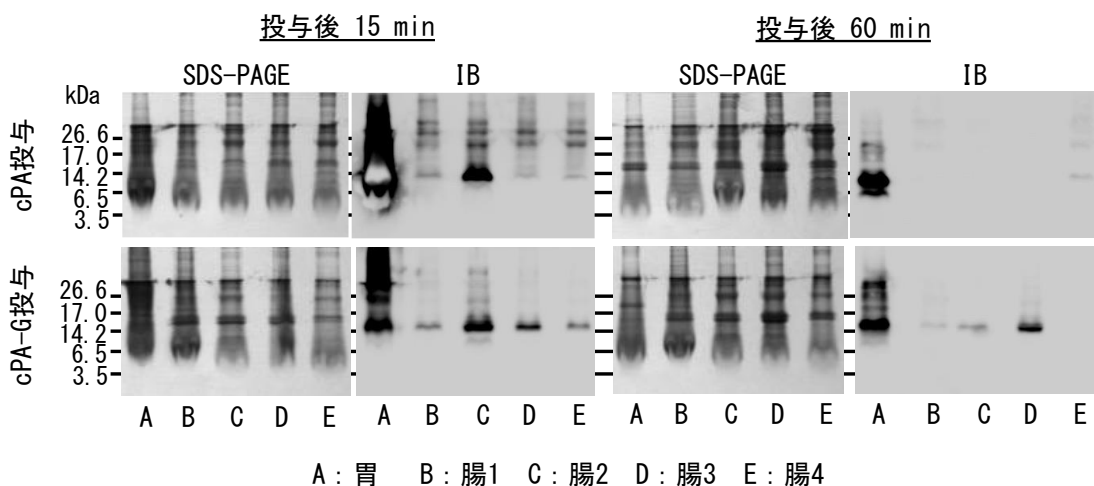


図5. マウス消化管内容物中のPA消化状態の確認

cPAまたはcPA-G投与後に摘出した胃または腸管の内容物をイムノブロッティング (IB) に供した。

腸管は胃直下から盲腸直前までを4等分し、各々断片から内容物を採取した。

(5) 肝門脈採血による PA 吸収性の調査

図 4 では、PA の尾静脈血への移行を経時的に観察できたが、図 3 に示したように PA の移行量は個体間で大きく異なっていた。一般的に、腸管から吸収されたアミノ酸やペプチド類は肝門脈から肝臓に至るとともに下大静脈に入り、さらに循環器系を経由して末梢血管に至る。そこで、PA 検出量が個体間で大きく異なる原因が、このように吸収部位と採血箇所が離れていることにあると考え、肝門脈から直接採血する事で安定した測定値の取得を目指した。この実験では一個体からの経時的な採血は困難なので、その採血時間を尾静脈採血で PA が検出された投与後 15 分と、その比較対象として PA が検出されなかった投与後 60 分に絞った上で、これらの 2 条件にマウスを振り分け、1 個体から 1 回採血する方式で実験を行なった。

その結果、投与後 15 分では、cPA、cPA-G いずれの投与群 (n=6) においても、検出された PA は痕跡量以下であり、さらに 60 分経過後では、いずれの投与群でも PA は検出されなかった。

このように、cPA-G 投与群だけでなく cPA 投与群からも、痕跡量を超える PA が検出された個体が見出されなかったという事実は、尾部静脈採血によって得られた結果とは明らかに一致しない。上記で推定した PA の移行経路のみで判断すると、尾静脈血における PA の検出量が肝門脈血より大きくなる機序を説明する事が困難である。それゆえ今後は、肝門脈を介さない PA の吸収経路の存在を論じる必要がある。

肝門脈を介さない吸収経路としては、腸管から胸管リンパを経て静脈に運ばれる経路が知られている。しかし、これは脂質や薬物の吸収経路とされており、消化ペプチドがこの経路で吸収されるという報告はない。本研究の結果から、PA のアレルゲン性におよぼすメイラード反応の影響を理解するには、PA の吸収経路を踏まえた研究とさらなる検証が必要である。

(6) 結論

本研究により、グルコースとのメイラード反応によって PA の腸管吸収性が低下し、それによってメイラード反応が PA のアレルゲン性を低下させる可能性が示唆された。このメイラード反応による吸収性の低下は、昨年度にこの研究と同じく食の未来財団の研究助成にて行った「メイラード

反応が甲殻類アレルゲンの消化・吸収性へ及ぼす影響の解明」において、カニの主要アレルゲンであるトロポミオシンにおいても同様に確認されている。このように複数のアレルゲンにおいて同様の現象が観察できた事実は、低アレルゲン化の手段としてメイラード反応が有効活用可能なことを示している。

今後の研究活動について

前述のように先行研究と合わせて複数のアレルゲン（魚肉・PA およびカニ・トロポミオシン）でメイラード反応に伴う吸収性の低下が観察されたが、その吸収抑制機序に加えて、肝門脈を介さない吸収経路など不明な点が多い。それ故、今後は抑制機序と吸収経路の解明に重点を置いた検証を行なう必要がある。具体的には、以下に示す2つの検討を進めていく予定である。

一つ目は、メイラード反応糖および反応強度の変化が、対象アレルゲンの吸収性に及ぼす影響の調査である。これまでは、基本的な単糖であるグルコースを、後期段階に入らない程度の強度で反応させた物のみで実験を行ってきたため、糖の重合度や、メイラード反応の進行に伴って生じる副生成物等の影響を検証する事で、吸収抑制機序の解明に繋がる知見を収集する。

二つ目は、マウスまたはラットを用いた胃ループや腸管ループによる吸収部位の調査で、消化管上皮細胞の免疫染色による吸収経路の調査も並行して行なう予定である。

参考文献

- 1) Shiomi K, Hayashi S, Ishikawa M, Shimakura K, Nagashim Y. Identification of Parvalbumin as an Allergen in Horse Mackerel Muscle. *Fisheries science*. 1998;64(2):300-4.
- 2) Arif SH. A Ca(2+)-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *Bioessays*. 2009;31(4):410-21.
- 3) Hiroyuki Kubota a, Ayako Kobayashi b, Yukihiro Kobayashi a,c,!, Kazuo Shiomi b, Naoko Hamada-Sato. Reduction in IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by heat treatment. *Food Chemistry*. 2016;206:78–84.
- 4) Sato R, Sawabe T, Kishimura H, Hayashi K, Saeki H. Preparation of Neoglycoprotein from Carp Myofibrillar Protein and Alginate Oligosaccharide : Improved Solubility in Low Ionic

- Strength Medium. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48(1):17-22.
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.

以上