

Title	植物性食物アレルギーに対する分析法開発による食品の安全性確保のための研究
Author(s)	清田, 恭平
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/70706">https://doi.org/10.18910/70706</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 清田 恭平 )

## 論文題名

植物性食物アレルギーに対する分析法開発による食品の安全性確保のための研究

## 論文内容の要旨

食物アレルギーは、食物が原因となって抗原特異的な免疫学的機序を介して生体に不利益な症状が引き起こされる現象である。食物アレルギーの特殊型に分類される花粉-食物アレルギー症候群 (pollen-food allergy syndrome、PFAS) では、花粉アレルギーに対する経気道感作の成立後、花粉アレルギーと類似した果物アレルギーの経口摂取により口腔周辺に限局した症状が出現し、重症化する場合がある。果物アレルギー患者は幼児から成人に至るまで一定数存在し、今後、花粉症患者数の増加とともに果物アレルギー患者数も増加する可能性がある。

PFASの原因果物のひとつであるオレンジは、我が国の食品のアレルギー表示制度において特定原材料に準ずる果物として指定され、アレルギー発症防止対策が必要な果物として位置付けられている。しかし、オレンジには具体的なアレルギー分析法が無いため、食品中のアレルギー量が不明でアレルギー混入を防止するための衛生的な知見が不足していた。したがって、オレンジアレルギー摂取量の制御が困難な状況であった。

そこで本研究では、PFASの代表的なアレルギーで、かつオレンジの主要アレルギーであるプロフィリンに着目し、その分析法であるEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を開発した。そして、プロフィリンの濃度実態と調理時のオレンジアレルギー衛生管理に役立つ情報を明らかにすることを目的とした。

まず、プロフィリンの濃度実態について研究を行った。プロフィリンはアクチン重合に関与し、植物間でよく保存されたタンパクである。特に、ミカン属果実間のプロフィリンはアミノ酸配列の相同性が高く、オレンジアレルギー患者の共通抗原となり得る。また、アレルギー濃度の高い果実部位を除去することができれば、アレルギー摂取リスクを抑えられる。そこで、プロフィリンの交差反応性を利用したプロフィリン定量法 (profilin-ELISA) を開発し、複数品種のミカン属果実においてプロフィリンの濃度分布を明らかにすることとした。profilin-ELISAの開発では、シラカバ花粉プロフィリンを免疫抗原として、マウスおよびラットから抗体をそれぞれ作製し、その組合せを最適化して測定系を構築した。profilin-ELISAを用いてミカン属果実11品種のプロフィリン濃度を測定したところ、8品種において果肉の濃度は果皮より約1.5-4倍高い傾向にあった。また、果実部位別のプロフィリン濃度に顕著な差は見られず、プロフィリンは果実全体に存在することが判明した。そのことから、オレンジアレルギー患者は生鮮果実に加え、果実全体が使用される加工品の摂取にも注意する必要があると考えられる。これらの結果を受け、オレンジ加工品におけるプロフィリン濃度の実態解明をさらに進めることとした。

ネーブルオレンジは消費量が大きく加工品の用途があり、かつ特定原材料に準ずるオレンジの該当品種であるため、オレンジアレルギー発症防止対策に重要な品種である。また、オレンジ加工品中の総タンパク量は加工処理により低下するが、profilin-ELISAは加工品に対しては感度不足であった。そこで、ネーブルオレンジのプロフィリン (Cit s 2) に着目し、高感度なCit s 2定量法 (Cit s 2-ELISA) を開発し、オレンジの生鮮品と加工品におけるCit s 2濃度を明らかにすることとした。Cit s 2-ELISAの開発では、リコンビナントCit s 2にSUMOタグを融合したrCit s 2-SUMOを作製し、これを免疫抗原としてマウスから5種類の抗rCit s 2抗体を作製し、その組合せを最適化して測定系を構築した。Cit s 2-ELISAは、Cit s 2の定量法としての妥当性を有しており、profilin-ELISAと比較して、操作時間が2時間短縮化し、定量下限値が4分の1で、Cit s 2に高い特異性を示した。Cit s 2-ELISAを用いてCit s 2濃度を測定したところ、ネーブルオレンジ生鮮品で26,400 ± 5,300 ng/gであった。一方、オレンジ加工品12製品中、ジュース2製品は生鮮品の1/20-1/10程度、その他10製品はすべて定量下限値未満であり、一部の加工品においてもアレルギー摂取リスクが存在することが示唆された。そのため、オレンジアレルギー患者は加工品の摂取にも注意が必要である。

次に、調理時のオレンジアレルギー衛生管理について研究を行った。オレンジ果汁は多糖類を含み粘度が高いため、オレンジの調理後に調理器具や食器に残留し、これらを介して食品への混入や誤食が起こり得る。したがって、調理現場でのオレンジアレルギーの衛生管理が必要であるが、残留した果汁の評価法がないため有用な情報が不足していた。そこで、果実全体に存在するプロフィリンを検出指標として残留オレンジ果汁評価法を開発し、調理器具に付着

したオレンジ果汁の残留性を明らかにすることとした。残留オレンジ果汁評価法の開発では、調理現場への導入のしやすさや今後の研究への波及効果を考慮して、簡便で安価に構築可能なオレンジ果汁定量法（orange-ELISA）と拭き取り試験を構築した。モノクローナル抗体よりも安価に作製可能なウサギポリクローナル抗Cit s 2-SUMO抗体を作製し、この抗体を用いてorange-ELISAを構築した。拭き取り試験では、4種類の調理器具材にオレンジ果汁の一定量を付着させ、綿棒で回収した拭き取り液をorange-ELISAに供してオレンジ果汁の残留性を評価した。残留オレンジ果汁を制御するためには、調理器具材の種類にかかわらず洗剤洗浄が必要であった。木やポリプロピレンと比較して、ステンレスとガラスでは水洗浄だけで洗浄効率95%以上のより高い洗浄効果が得られた。ステンレスやガラスは、洗浄時に細心の注意が必要な包丁やジューサー等の調理器具材としてよく使用されている。したがって、ステンレス製やガラス製の調理器具の利用により、果物の調理人や食品工場でのオレンジアレルギー衛生管理の負担軽減化に貢献することが期待される。

以上、本研究で開発した分析法は、これまで未開発であった特定原材料に準ずるオレンジに対する具体的な分析法として有用である。また、開発した分析法およびその研究手法は、食品製造における「プロフィリン低含有食品の製造」や「果物アレルギーの総合的な衛生管理」に、および臨床における「アレルギー診断の試験材料の標準化」に、それぞれ応用が期待される。これらにより、オレンジアレルギー患者の発症防止に貢献し、患者や食生活を共にする家族の生活の質を改善できるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (清田 恭平)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 平田 收正 副 査 教授 辻川 和丈 副 査 教授 高木 達也
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>オレンジは、花粉-食物アレルギー症候群 (PFAS) の原因となることから、食品アレルギー表示制度において特定原材料に準ずる果物に指定され、アレルギー発症防止対策が必要な果物となっている。本研究では、オレンジのアレルゲンであるプロフィリンの分析法としてELISAを開発した。これによって、オレンジにおけるプロフィリン濃度実態の把握と、その調理時のアレルゲン衛生管理を可能にすることにより、当該アレルギーの発症防止に役立つことが期待できる。</p> <p>まずPFASのアレルゲンになるプロフィリンの濃度実態について研究を行った。ミカン属果実間のプロフィリンはアミノ酸配列の相同性が高く、オレンジアレルギー患者の共通抗原となり得る。そこで、プロフィリンの交差反応性を利用した定量法としてprofilin-ELISAを開発し、複数品種の濃度分布を調べた。その結果、11品種中の8品種において果肉の濃度が果皮より約1.5-4倍高い傾向にあり、一方果実部位別の濃度に顕著な差は見られず、プロフィリンは果実全体に存在することが明らかとなった。これにより、オレンジアレルギー患者は生鮮果実に加え、果実全体が使用される加工品の摂取にも注意する必要があることが示された。</p> <p>そこで次に、オレンジ加工品中のプロフィリン濃度の実態解明を試みた。ネーブルオレンジは消費量が大きく加工品の用途があり、かつ特定原材料に準ずる該当品種であるため、アレルギー発症防止対策に重要な品種である。加工品では総タンパク量が加工処理により低下するため、profilin-ELISAでは感度が十分ではないので、ネーブルオレンジプロフィリン (Cit s 2) に着目しより高感度なCit s 2-ELISAを開発した。本法では操作時間が2時間短縮でき、また定量下限値が4分の1となり、Cit s 2に高い特異性を示した。本法を用いてCit s 2濃度を調べた結果、生鮮品では<math>26,400 \pm 5,300</math> ng/gで、一方加工品12製品中ジュースは生鮮品の1/20-1/10程度、その他は全て定量下限値未満となり、一部の加工品でアレルゲン摂取リスクが存在することが示された。したがって、オレンジアレルギー患者は加工品の摂取にも十分に注意が必要であると言える。</p> <p>さらに、調理時のアレルゲン衛生管理について研究を行った。オレンジ果汁は調理後に調理器具や食器に残留しこれらを介して食品への混入や誤食が起り得る。そこで、今後の波及効果を考慮して、簡便で安価な果汁定量法としてウサギポリクローナル抗rCit s 2-SUMO抗体を用いたorange-ELISAを構築し、4種類の調理器具材における果汁残留性を評価した。その結果、残留果汁の制御には器具材の種類にかかわらず洗剤洗浄が必要であったが、木やポリプロピレンと比較してステンレスとガラスでは水洗浄だけで洗浄効率95%以上が得られた。これにより、これらの材料の調理器具の利用によるアレルゲン衛生管理の負担軽減が可能であることが示された。</p> <p>以上、本研究で開発した分析法は特定原材料に準ずるオレンジに対して有用である。また、開発した分析法およびその研究手法は「プロフィリン低含有食品製造」や「果物アレルゲンの総合的衛生管理」、臨床における「アレルギー診断の試験材料標準化」に、それぞれ応用が期待され、オレンジアレルギー患者の発症防止に貢献できるものと考えられる。</p> <p>上記のように新規知見が得られ、これらは学術的価値も高く、また大きな社会貢献につながるもの評価できることから、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。</p>	