

〔原 著〕

卵殻未焼成カルシウムのアレルゲン性について

1) (独) 国立病院機構相模原病院小児科, 2) 同 臨床研究センターアレルギー性疾患研究部,
3) キューピー株式会社研究所

海老澤元宏¹⁾²⁾ 田知本寛¹⁾ 池松かおり¹⁾
杉崎千鶴子²⁾ 増田泰伸³⁾ 木村 守³⁾

【背景・目的】卵殻カルシウムの卵としてのアレルゲン性についての検討はほとんどされていない。卵殻カルシウムの中でも未焼成カルシウムのアレルゲン性については明確になっておらず、エビデンスがないということによりアレルギー表示の対象となっている。

【方法】市販の卵殻未焼成カルシウムのアレルゲン性について、電気泳動法 (SDS-PAGE), ウエスタンブロット法, inhibition ELISA 法および sandwich ELISA 法, さらには、卵アレルギー児に対する経口負荷試験を実施し検討した。

【結果】SDS-PAGE, ウエスタンブロット法および inhibition ELISA 法により、未焼成カルシウムの卵としてのアレルゲン性は焼成カルシウムと同等であることが確認された。また, sandwich ELISA 法でも未焼成カルシウムのアレルゲン性は低いことが確認された。さらに、卵白に対し強い即時型反応を認めた卵アレルギー児への卵殻未焼成カルシウムによる経口負荷試験においても 6 例すべて陰性であった。

【結語】卵殻未焼成カルシウムは卵のアレルゲンの混入がほとんど認められず、また、卵としてのアレルゲン性も低いことから、そのアレルゲン性を過度に危惧する必要はないものと考えられた。

Key words : egg hypersensitivity — inhibition ELISA — oral non-calcinated egg shell calcium challenge — SDS-PAGE

はじめに

カルシウムは体にとって必要なミネラルであるにもかかわらず、わが国においては国民栄養調査によると所要量に達したことは一度もない栄養素である¹⁾。このような状況を反映して、カルシウムを強化した飲料や菓子などの食品が数多く市販されており、乳幼児向け食品においてもカルシウムを強化したものが増えて

いる。食品に添加されるカルシウム剤としては、天然物、化学合成品を含めて数多くの素材が使用されている。その中でも卵殻カルシウムは古くから食経験がある天然素材で、体内への吸収率が良いと報告されていることから、幅広く利用されている²⁾。

卵殻カルシウムは大きく 2 種類に分けられる。まず、卵殻焼成カルシウム (以下、焼成カルシウム) であるが、主成分の炭酸カルシウムの大部分が酸化カルシウムに変わっているため、強いアルカリ性とえぐみを伴う食品の用途として限定される。もう一つの卵殻未焼成カルシウム (以下、未焼成カルシウム) は色が白く、かつ、臭いが少なく、品質改良効果を有しており、食肉加工品や魚肉練り製品まで活用されている。

近年、日本人の食生活に占める加工食品の利用割合は増加傾向にある。加工食品はアレルゲンを含む食品が混合されていても外観からはわからず、知らずに食べてアレルギー反応を起こす例もある。卵殻カルシウムの卵としてのアレルゲン性が明らかになれば、卵ア

Received : June 11, 2003

Accepted : February 2, 2005

Abbreviations : CAPRAST CAP radioallergosorbent test ; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ; PBS phosphate buffered saline ; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

海老澤元宏 : (独) 国立病院機構相模原病院〔神奈川県相模原市桜台 18-1〕

E-mail : m-ebisawa@sagamihara-hosp.gr.jp

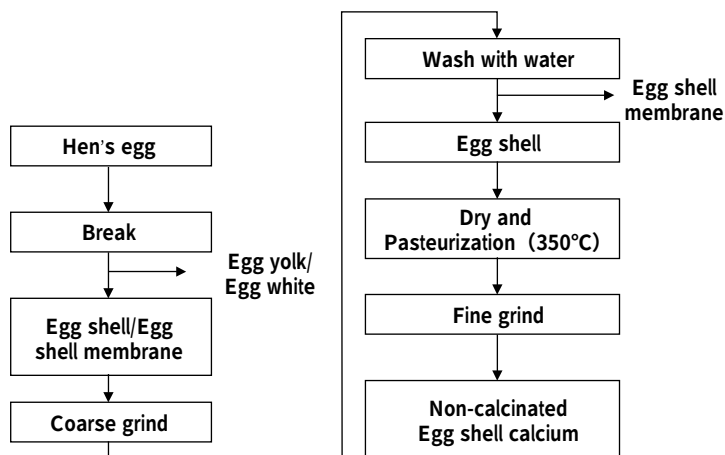


Fig. 1. Manufacturing process of non-calcinated egg shell calcium.

レルギーを有する人にとっても貴重な素材ともなる。しかしながら、現在までに、卵殻カルシウムのアレルゲン性についての研究報告はほとんどない。

焼成カルシウムは焼成しており、卵としてのアレルゲンは含まないと考えられているが、未焼成カルシウムのアレルゲン性については明確にされておらず、アレルギー表示の対象となっている³⁾。実際、未焼成カルシウムのアレルゲン性についての検討は千葉の報告⁴⁾があるが、詳細な検討はなされていない。そこで今回、市販されている未焼成カルシウムの卵としてのアレルゲン性について、電気泳動法(SDS-PAGE)、ウェスタンブロット法、inhibition ELISA 法および sandwich ELISA 法にて検討し、さらに、卵アレルギー児に対する経口負荷試験を実施したので報告する。

試験方法

用いた試料は未焼成カルシウムとしてカルホープ®(キューピー(株))、焼成カルシウムとして TEM (和光堂(株))を用いた。対照は乾燥卵白 K タイプ(キューピー(株))とした。

試験に用いた未焼成カルシウムの製造工程および成分を、それぞれ Fig. 1, Table 1 に示した。

なお、用いた血清は 7 名の卵アレルギー患者(卵白に対する IgE の CAPRAST スコア 6, 総 IgE 値 484~12700IU/mL)のものであり、本研究に用いる同意を得ている。

Table 1 Components of non-calcinated egg shell calcium

Moisture	0.5g
Protein	2.1g
Ash	96.9g
Calcium	38.0g
Potassium	41.6mg
Sodium	87.0mg
Phosphorus	99.3mg
Ferrum	0.5mg
Magnesium	375.0mg

(/100g)

次の 1) ~3) の方法で、試料のアレルゲン性について調べた。

1) 電気泳動(SDS-PAGE)およびウェスタンブロット

乾燥卵白および各種卵殻カルシウムを PBS (pH 7.3) でそれぞれ 100μg/mL, 100mg/mL となるように調製し測定試料とした。各種卵殻カルシウムについては、充分攪拌後、不溶な卵殻分を取り除くため、3000rpm×15 分の遠心分離を行い、得られた上清を試料とした。SDS-PAGE は 4~20% の GRADIENT GEL を用いて、Laemmli の方法⁵⁾に従い、試料 10μL を 18mA の定電流で泳動後、Silver Stain II Kit Wako (和光純薬工業(株))を用い染色した。

ウェスタンブロットは、上記方法で電気泳動後、Towbin らの方法⁶⁾によりニトロセルロース膜に転写

Table 2 Clinical features and results of oral non-calcinated egg shell calcium challenge in subjects with egg hypersensitivity

Initial	Age (y)	Sex	Serum IgE (IU/mL)	CAPRAST score to egg white	Whole egg challenge	Non-calcinated egg shell calcium challenge
S.W.	3	F	414	3	Positive	Negative
S.O.	4	M	431	3	Positive	Negative
Y.H.	2	M	932	6	Positive	Negative
S.M.	3	M	14900	6	Positive	Negative
M.S.	2	M	271	4	Positive	Negative
S.M.	6	M	4440	4	Positive	Negative

した。転写したニトロセルロース膜を 5% Bovine Serum Albumin (BSA) を含む 0.05% Tween20/PBS (T-PBS) を用い 4°C で一晩処理し、ブロッッキング操作を行った。T-PBS で洗浄後、1% BSA を含む T-PBS (BT-PBS) で 100 倍希釈した卵アレルギー患者血清を室温で 2 時間反応させた。洗浄後、BT-PBS で 2000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体 (ZYMED LABORATORIES 社) を室温で 2 時間反応させた後、3,3'-diaminobenzidine を基質として発色を行った。

2) 競争阻害酵素免疫測定法 (inhibition enzyme linked immunosorbent assay : 以下, inhibition ELISA 法)

乾燥卵白および各種卵殻カルシウムを PBS (pH 7.3) で 10mg/mL となるように調製した。各種卵殻カルシウムについては、3000rpm×15 分の遠心分離を行い、得られた上清を測定溶液とした。これらの溶液を PBS で 10 倍ずつ段階希釈したものと 1% BSA を含む T-PBS で 50 倍希釈した卵アレルギー者血清とを等量混合し、4°C で一晩反応させた。これらの反応液 100 μ L を乾燥卵白溶液 (100 μ g/mL PBS) 100 μ L で予めコーティングした ELISA 用 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、室温で 90 分間反応させた。次に、各ウェルを T-PBS で 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体を 100 μ L 分注し、室温で 90 分間反応させた。洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine を基質として 20 分間発色させた後、1N の H₂SO₄ で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定し、阻害率を求めた。

なお、阻害率は、

阻害率 (%) = 100 - (サンプルあるいは卵白の測定値 ÷ 対照の測定値) × 100 により求めた。

Table 3 Egg allergen in extraction of non-calcinated egg shell calcium matrix proteins

Yield of proteins (soluble form)	Egg allergen in soluble proteins
0.6mg/g non-calcinated egg shell calcium	8 μ g/g

3) 未焼成卵殻カルシウムの脱灰および抽出たん白質の卵アレルギーの測定

10g の未焼成卵殻カルシウムに 40% 酢酸 150mL を加えて攪拌しながら 4°C 下で 1 晩処理して完全に溶解させた後、透析膜 (Spectra/Por CE MWCO : 10,000, Spectrum Laboratories Inc.) を用いて蒸留水に対して 4 日間透析を行った。得られた透析物を凍結乾燥した後、たん白質測定キット (Modified Lowry Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc.) でたん白質量の測定を行うとともに、sandwich ELISA 法 (FASTKIT エライザ卵, 日本ハム(株)) を用いて卵アレルギー含量を測定した。

4) 卵アレルギー児に対する卵殻未焼成カルシウムによる経口負荷試験

平成 13 年 7 月から 8 月にかけて、国立相模原病院小児科において、6 名の患児を対象に文書同意を得た上で負荷試験を行った。

患児のプロフィールを Table 2 に示した。試料の負荷試験法については、当科およびその関連施設で行っている食物負荷試験法⁷⁾⁸⁾に準じた。アナフィラキシーショック対策から静脈ルートを確保し、患児の母親立ち会いのもとで空腹時に行った。対象とした患児はす

Time (min)	0	15	30	45	60	90	120	180	240	360	1440
Amount of load	1/20	1/10	1/5	1/3	all						
	(Non-calcinated egg shell calcium 1g/Strawberry pyre 120g)										
Symptoms (Scoring)											
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Symptoms : cutaneous symptoms, upper respiratory symptoms, lower respiratory symptoms and digestive symptoms.

Fig. 2. Method of oral non-calcinated egg shell calcium challenge.

でに全卵による負荷試験で全卵に対して陽性反応を示している6名であり、総IgE値は271~14900IU/mLで、IgE CAPRAST スコアは3~6であった。試料の負荷方法はシングルブラインド法にて、Fig. 2のように未焼成カルシウム 1g に砂糖 4g を混合し、さらにイチゴピューレ 120g に混ぜ、全体量の5%程度から負荷を開始して、15分間隔で増量し、1時間で投与を終了した。症状の評価には、皮膚症状・上気道症状・下気道症状・消化器症状に分けた米国アレルギー学会のマニュアルの症状スコアリングシステムによりスコアリングシートを用いて24時間までフォローアップした。

結 果

1) 電気泳動法およびウエスタンブロット

未焼成カルシウムは焼成カルシウム同様、卵アレルギー患者血清と反応するバンドを認めなかった (Fig. 3)。

2) inhibition ELISA 法

卵白は濃度が高くなるほど阻害率の増加が見られ、阻害率が50%になる濃度は約100ng/mLであった。一方、未焼成カルシウムは約10mg/mLでもほとんど反応の抑制を認めず、そのアレルゲン性は卵白と比べ明らかに低いものであった。また、焼成カルシウムと同等の値であった (Fig. 4)。

3) 抽出たん白質の卵アレルゲン性

今回の抽出法により、未焼成卵殻カルシウム 1g あたり 0.6mg の可溶性たん白質が抽出された。得られた可溶性たん白質の卵アレルゲン含量を測定したところ、可溶性たん白質 1g あたり 8μg の卵アレルゲンが検出された (Table 3)。

4) 卵アレルギー児への経口負荷試験

筆者らの食物負荷試験法⁷⁾⁸⁾に準じて行った。全卵での負荷試験では6名において陽性であった (皮膚症状は6名中4名に発疹、蕁麻疹を認め、消化器症状として下痢が3名、腹痛が2名に、呼吸器症状として咳嗽・喘鳴が2名に出現した)。その全卵負荷試験で陽性児6例すべてに対し、未焼成カルシウムによる負荷試験では、皮膚症状、消化器症状、呼吸器症状に関してフォローし陰性であった (Table 2)。

考 察

今回の試験の結果、電気泳動法 (SDS-PAGE)、ウエスタンブロット法および inhibition ELISA 法により、未焼成カルシウムのアレルゲン性は焼成カルシウムと同等であることが確認された。また、卵アレルギー児においても、経口負荷試験で6例すべてにおいて陽性を示した症例はなかった。

Fig. 1 に示すように、未焼成カルシウムは製造工程中水洗を行っており、卵由来のたん白質はそのほとんど

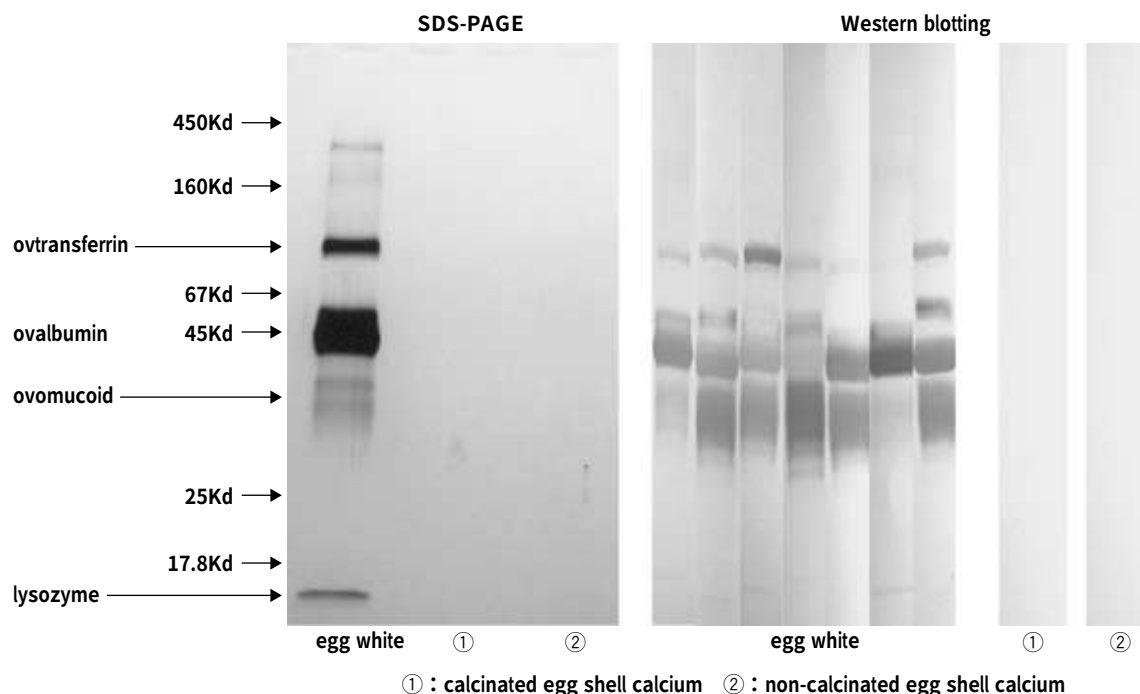
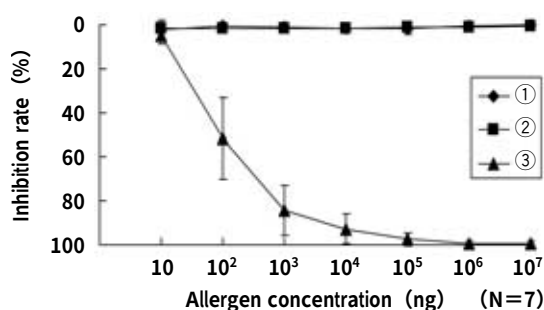


Fig. 3. SDS-PAGE and western blotting patterns of soluble fraction in two egg shell calciums.



- ① : non-calcinated egg shell calcium
- ② : calcinated egg shell calcium
- ③ : egg white

Fig. 4. ELISA competitive inhibition analysis against two egg shell calciums using human serum and their comparison to egg white.

どが除去されていると思われる。今回の試験においても卵たん白質の混入はほとんど確認されなかった。従って、卵殻カルシウム中のたん白質(2.1% 含有)は、卵殻中に元々含まれているたん白質であると考えられ

る。卵殻中のたん白質はコンドロイチン硫酸と結合して卵殻の構造中でマトリックスを構成している⁹⁾。そこで、卵殻中に含まれるたん白質のアレルゲン性を調べるために酢酸を用いた脱灰処理により卵殻中のたん白質を抽出したところ、可溶性たん白質に含まれる卵アレルゲンは10μg/g以下であった。千葉は卵アレルギー乳幼児を対象に、未焼成カルシウム(カルホープ®(キューピー(株)))のアレルゲン性を検討しており、未焼成カルシウムたん白質のアレルゲン性は卵白に比べて極めて低く、臨床症状や生化学所見において問題となる変化を認めなかったと報告している。そこで、千葉は卵殻中のたん白質と卵白との間に交叉アレルゲン性のある可能性は低いとしている⁴⁾。

平成12年度の厚生科学研究「食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究」の報告書によると、卵殻カルシウムについては詳細な調査をした例がないことから表示の義務は求めぬが、今後さらなる検討を要するとされていた¹⁰⁾。しかし、平成13年3月15日に厚生労働省令第23号「食品衛生施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令」により、アレルギー物質を含む食品の表示につい

て定められた。その中で卵殻カルシウムは、焼成カルシウムについてはアレルゲン性が知られていないことで表示の義務が免除となったが、未焼成カルシウムについては表示の対象となった³⁾。焼成カルシウムについては高温で熱処理をしており、表示免除となったと考えられる。

食品のアレルギー表示について現在の技術レベルでは確実な検査法はない。しかし今回の検討では、卵アレルギー患者血清を用いたウエスタンブロット法および inhibition ELISA 法で、未焼成カルシウムのアレルゲン性はほとんど認められず、焼成カルシウムと同等であった。また、脱灰処理により未焼成カルシウムから抽出されるたん白質中には卵アレルゲンはほとんど含まれないことが示された。さらに、卵アレルギー児、特に卵白に対し強い即時型反応を認めた患児への経口負荷試験においてもアレルギー症状の誘発は確認されなかったことから、今回使用したもののように十分な洗浄処理等を実施し、卵白の混入を極力低下させた未焼成カルシウムについては、そのアレルゲン性を過度に危惧する必要はないものと推察された。

未焼成カルシウムは、その製造方法により卵白の混入の程度が異なることが予想されるため、すべての商品が卵アレルギー患者にとって安全であるとは言い難い。また、今回の試験では大量摂取および長期間継続摂取した際の卵アレルギー患者への影響は明確ではない。しかし、充分管理された方法で製造されたものであれば、卵アレルギー患者が通常摂取量の範囲で未焼成カルシウムをカルシウム強化剤として利用することは可能であり、また、アレルゲン性についても焼成カルシウムと比較してほぼ同等と考えられた。

文 献

- 1) 国民栄養の現状(平成 14 年厚生労働省国民栄養調査結果)(健康・栄養情報研究編), 第一出版, 東京, p.208, 2004.
- 2) 増田泰伸: 卵殻カルシウムの生体内利用と機能. *FOOD Style* **21**(2), 68-71, 2002.
- 3) 厚生労働省医薬品食品保健部: アレルギー物質を含む食品に関する表示について. 食企発第 4 号, 食監発第 48 号.
- 4) 千葉友幸: 卵アレルギー児における卵殻カルシウムの抗原性について. *新薬と臨牀* **49**, 141-145, 2000.
- 5) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
- 6) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354, 1979.
- 7) 海老澤元宏, 赤澤 晃, 久能昌朗, 飯倉洋治: 食物アレルギー診断食の確立—乾燥食品を用いた食物負荷試験—. *医療* **54**, 79-84, 2000.
- 8) 海老澤元宏: 食物アレルギーの診断に関する研究. 厚生科学研究補助金「食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究」, 海老澤元宏, pp.4-6, 平成 12 年度研究報告書.
- 9) 佐藤 泰編: 食卵の科学と利用, 地球社, 東京, pp.45-46, 1980.
- 10) 海老澤元宏: アレルギー物質を含む食品に関する表示について. 厚生科学研究補助金「食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究」, 海老澤元宏, pp.37-39, 平成 12 年度研究報告書.

ALLERGENIC ACTIVITY OF NON-CALCINATED EGG SHELL CALCIUM

Motohiro Ebisawa¹⁾²⁾, Hiroshi Tachimoto¹⁾, Kaori Ikematsu¹⁾, Chizuko Sugizaki²⁾,
Yasunobu Masuda³⁾ and Mamoru Kimura³⁾

¹⁾*Division of Pediatric Allergy, National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital*

²⁾*Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, Department of Allergy,
National Hospital Organization, Sagamihara National Hospital*

³⁾*R&D Division, Q.P. Corporation*

Background : There is few data to prove the safety of egg shell calcium as allergen. Especially, non-calcinated egg shell calcium is not allowed to use without the description of origin of egg on food labels in Japan.

Method : We evaluated the possibly contaminated egg allergens in commercial non-calcinated egg shell calcium made from egg by in vitro methodologies (SDS-PAGE, western blotting, inhibition ELISA and sandwich ELISA) and by single-blind oral non-calcinated egg shell calcium challenge on 6 egg hypersensitivity patients.

Results : The allergenic activity of non-calcinated egg shell calcium was almost negligible compared to egg white by all in vitro methods. Furthermore, six patients with egg hypersensitivity were unresponsive to oral non-calcinated egg shell calcium challenge test.

Conclusion : These results indicate that there is little contamination of egg white in non-calcinated egg shell calcium, and that the allergenic activity of non-calcinated egg shell calcium is equivalent to that of calcinated egg shell calcium.
