

バター, マーガリンに含まれる牛乳, 卵, 大豆蛋白の免疫学的 検討と低アレルギーマーガリンの有用性について

横浜市立大学医学部小児科, 1) 神奈川県立こども医療センター, 2) 横浜市立アレルギーセンター

横田俊平 高橋由利子 相原雄幸
栗原和幸¹⁾ 勝呂 宏²⁾ 松山秀介

市販のバター, マーガリンに含まれる蛋白を抽出し, SDS-PAGE 法および免疫家兎血清を用いた ELISA 法により牛乳, 卵, 大豆蛋白の検出を試みた。バターおよび検討した10種のマーガリン中9種は主として牛乳蛋白を含み, また卵, 大豆蛋白も検出された。一方低アレルギーマーガリン (hypoallergenic margarine: HAM) として市販されている1種はいずれの蛋白も検出されなかった。ついで牛乳, 卵, 大豆特異 IgE 高値のアトピー性皮膚炎患児血清にはそれぞれの蛋白抗原に反応する IgG 抗体を検出したが, これらの血清はバター, マーガリン抽出蛋白を抗原とした IgG-ELISA により, 強い抗体活性を示した。しかし, HAM に対しては抗体は検出されなかった。除去食を必要とする牛乳, 卵, 大豆アレルギー患児に, バター, マーガリンも二次食品のひとつとして考慮すべきであり, 他方 HAM はその代替品として有用であることが示唆された。

Key words: egg-white allergen — food allergy — hypoallergenic food — milk allergen
— soy bean allergen

緒言

小児期に発症するアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) の原因はいまだ明らかにされていないが, 特異な食物抗原に対する IgE 高値例が存在すること, IgE 高値例の特異抗原が年齢に対応した食品に中心的であること, 除去食により症状の改善が認められる例が存在すること, などの知見から, 食物抗原に対するアレルギー反応が発症の重要な要因になっていることが示唆されている^{1)~3)}。

食物アレルギーへの対応は, 厳重な管理下に食物除去試験と食物負荷試験とを行い, 特定の食品にアレルギー性を認めた場合, 除去食を考慮する場合も存在する⁴⁾。しかし成長期にある小児にとって食生活は生活の重要な部分を占めており, かつ食物に対する嗜好が

いまだ定まっていない時期にある小児の今後の成長に配慮すると, 食物除去を行うより低アレルギー食品を開発し, 食しても発症に至らないよう考慮することがより優れたアプローチの方法であると考えられる。実際私たちは低アレルギー小麦を開発し小麦アレルギー患者の約70%に有用性を認めている⁵⁾⁶⁾。

ところでパン食の普及に伴い, バターやマーガリンを低年齢から食する機会が増えているが, バターには多くの牛乳蛋白が含まれ, またマーガリン製造の過程では乳製品のほか, 卵, 大豆由来の素材が添加されている場合も多い。したがって通常のバター, マーガリンを食物アレルギーの観点からみると, 除去を考慮するに充分値する食品であるが, 優良な低アレルギー・マーガリンがあればこれを代用することも有用な治療選択であろう。そこで私たちは, 牛乳, 卵白, 大豆を含まない低アレルギー・マーガリン (hypoallergenic margarine: HAM) について, 抗原蛋白含有の有無を一般のバター, マーガリンと免疫学的に比較検討し, またこれらの蛋白に感受性のある患児に対して二次食品としての有用性を検討したので報告する。

Received: July 26, 1996

Accepted: October 24, 1996

Abbreviations: AD atopic dermatitis; BSA bovine serum albumin; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; HAM hypoallergenic margarine; OPD orthophenylene diamine; PBS phosphate-buffered saline; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

材料と方法

1. バターおよびマーガリン

低アレルギー・マーガリン (HAM) としてはパーム油と菜種油を主原料とし、牛乳、卵、大豆を含まない「青空ソフト®」(旭電化工業 (株) 社製) を用い、対照として市販のバター 1 種、マーガリン 10 種 (4 社) を用いた。

2. バター、マーガリンからの蛋白抽出

バター、マーガリンは温浴中で溶解後、10倍量の 4M 尿素-phosphate buffered saline (U-PBS) を加え 15 分間超音波処理した。ついで恒温槽内で 50°C, 60 分間攪拌し、遠心分離 (4°C, 1300×g, 10 分) の後、水相を蛋白分画とした。抽出した蛋白分画は少量ずつ分注し -20°C にて保存した。

3. 免疫家兎血清の作製

1) 抗原の調製

牛乳抗原は、脱脂粉乳に 10 倍量の 4M U-PBS を加え、60 分間攪拌後遠心分離し (4°C, 1300×g, 10 分)、上清を PBS に対して透析後、透析内液を凍結乾燥して牛乳抗原原末とした。卵抗原は、新鮮鶏卵全卵に 10 倍量の 4M U-PBS を加え、以下牛乳抗原の調製と同様の操作にて卵抗原原末を得た。大豆抗原は、粉碎した大豆に 10 倍量の 4M U-PBS を加え、以下同様にして原末を調製した。

2) 家兎への免疫

抗原原末をそれぞれ PBS にて 20mg/ml 濃度に調製し、等量の Freund 完全アジバント (FCA) と混合し懸濁液としたものを家兎 (ニュージーランドホワイト: 2.5~3kg) の四肢掌筋肉内に 2ml ずつ投与した。1 週間ごとに同様の抗原投与を繰り返し、4 週間後に全採血を行った。血液は室温にて静置後、遠心分離 (室温, 1000×g, 10 分) して免疫血清を得た。

それぞれの免疫血清の活性を以下の抗原を用いて ELISA 法で検討した。抗牛乳血清には、牛乳抗原原末、

α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、 α -カゼイン、抗卵血清には、卵抗原原末、オボアルブミン、オボムコイド、卵白リゾチーム、抗大豆血清には、大豆抗原原末、大豆トリプシンインヒビターを用いた。この結果、それぞれの免疫血清は用いた抗原すべてに対し反応することを確認した。またそれぞれの免疫血清の交叉反応性についても検討したが、免疫に用いた抗原以外の蛋白に反応する血清は認めなかった。

4. IgE-CAP RAST 高値患者血清

患者血清は、アレルギー外来通院中のアトピー性皮膚炎患者で、牛乳、卵、大豆に対する特異 IgE-CAP RAST が高値の 5 症例の血清を実験に用いた。患者背景を Table 1 に示した。

5. SDS-PAGE

抗原成分の SDS-PAGE 解析は Laemmli の方法によった。acrylamide gel は 10~20% の gradient gel (第一化学薬品) を用いた。分子量マーカーは SDS-PAGE 用マーカー III (第一化学薬品) を用いた。各ウエルに 10 μ L のサンプルを添加し、泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルー R250 (CBB R-250) にて染色し、メタノールを含む酢酸水溶液で脱色を行った。

6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

バター、マーガリンの抽出蛋白画分を、4M U-PBS で 10 倍に希釈し、96 穴 ELISA プレート (Costar 社) に 100 μ l ずつ加え、4°C にて一昼夜放置し抗原コーティングを行った。PBS にて 3 回洗浄後、2% bovine serum albumin (BSA) を 200 μ l 加え 37°C, 60 分間ブロッキングを行った。PBS にて 3 回洗浄し、2000 倍希釈した患者血清または健常者血清をそれぞれ 100 μ l ずつ加え、37°C, 2 時間反応させた。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) にて洗浄後、2500 倍希釈液ビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Sigma 社) を 100 μ l 加えて 37°C, 2 時間反応させた。洗浄後 4000 倍希釈ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン 100 μ l を加え、37°C, 2 時間反応させた。洗浄後基質溶液 (0.034% H₂

Table 1 Profile of patient's sera studied in the experiments

Serum	Sex	Age	Total IgE (IU/ml)	IgE-CAP RAST score (titer U _A /ml)		
				Milk	Egg	Soybean
A	male	13y	35246	3(12.9)	4(39.8)	3(8.89)
B	female	2y	5617	5(65.3)	4(41.3)	4(20.9)
C	male	2y	2892	0	3(5.13)	2(0.82)
D	female	4y	1969	2(0.70)	4(40.0)	4(29.1)
E	male	7y	2878	3(10.8)	3(4.95)	1(0.50)

O₂を加えた0.1% ortho-phenylene diamine (OPD) 液を100 μ lを加えて37°C, 30分間反応させた後, 4N 硫酸を40 μ l加えて発色を停止させ, 492nm のフィルターを用いて吸光度を測定した。

家兔免疫血清は, 抗牛乳血清10万倍希釈, 抗卵血清5万倍希釈, 抗大豆血清2000倍希釈にて使用した。血清の希釈はいずれも PBS-T にて行った。また二次抗体はビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Tago 社) を用いた。

7. アンケート調査

アレルギー外来を受診した牛乳, 卵, 大豆のいずれか, あるいは複数の食品に感受性のある患児15例を対象に HAM を使用してもらい, 臨床症状の観察およびアンケートの記載を母親に依頼した。対象年齢は3~15歳, 男女別は11例対4例, アレルゲン性を認める食品は卵14例, 牛乳13例, 大豆12例, 小麦11例, 米9例, そば3例, 魚介類1例, ごま1例, とうもろこし1例, 油脂1例であった。アレルギー疾患の内訳は, アトピー性皮膚炎15例全例, 気管支喘息8例, アレルギー性鼻炎4例, 運動誘発性アレルギー2例であった。HAM 使用中に発現した蕁麻疹を含む皮疹, アナフィラキシー症状については微細なものも記載を依頼した。

結 果

1. 市販バター1種, マーガリン中の蛋白質の解析

市販のバター1種, マーガリン10種および HAM の計12種について蛋白成分を抽出し, SDS-PAGE により含有蛋白を分析した。Fig. 1 に示したように, 市販マーガリン1種 (lane 4) と HAM を除き, バターおよび9種のマーガリンでは, CBB-R250にて染色される複数の蛋白が検出された。これらの蛋白の多くは, 同時に泳動した牛乳, 卵, 大豆蛋白の主要蛋白, とくに牛乳蛋白の移動度と一致するものが多数含まれていた。これに対し HAM (lane 1) についてみると, CBB-R250で検出される蛋白はまったく含まれていなかった。

2. 免疫家兔血清を用いたバター, マーガリン中の牛乳, 卵, 大豆抗原の検出

市販バター, マーガリン中に含まれる蛋白成分の微量分析を目的として, 免疫家兔血清を用いた ELISA 法を確立した。まずそれぞれの免疫血清の抗原に対する力価を検定したところ, どの血清も対応抗原に対し充分高力価の抗体を有していることが確認された (Fig. 2)。

次にこの ELISA 法を用いて, バター, マーガリン抽

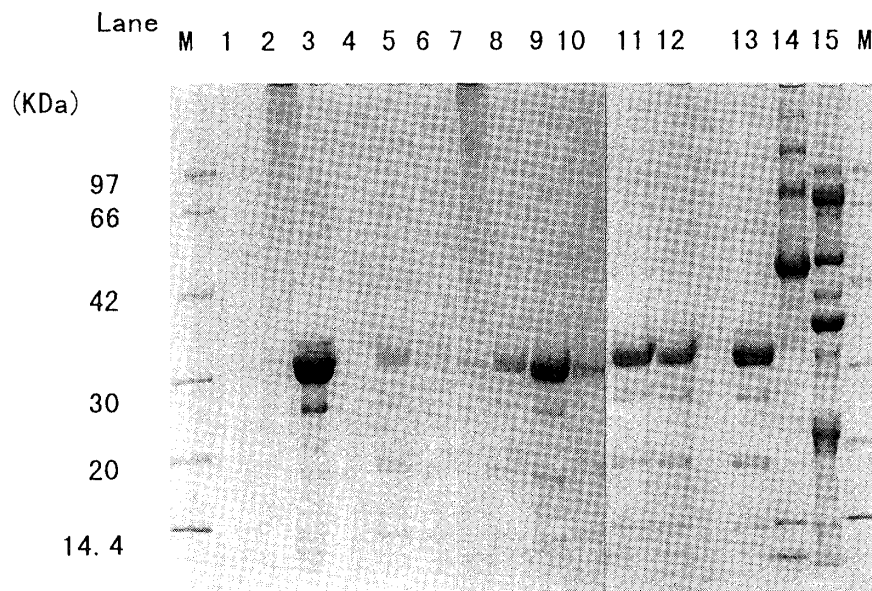


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of proteins extracted from butter and margarine.

Proteins were extracted from HAM (Lane 1), commercially available margarine (Lane 2~11), and analyzed by 10~20% gradient polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250. M: molecular weight marker, Lane 13: milk proteins, Lane 14: egg proteins, Lane 15: soybean proteins.

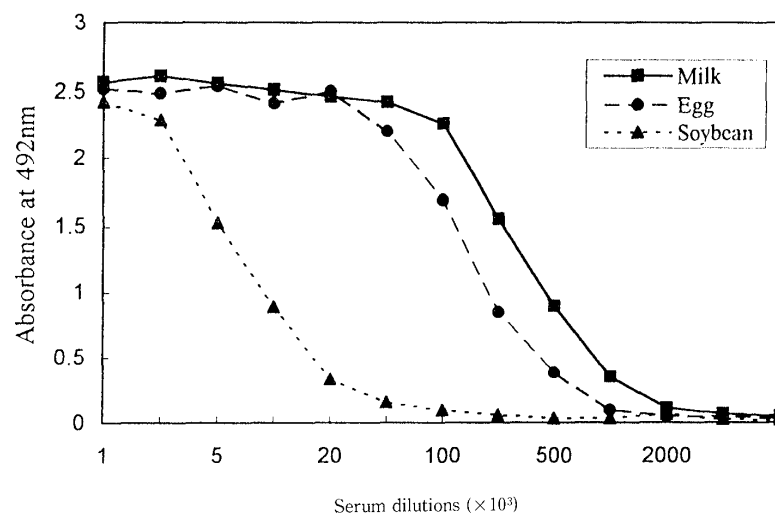


Fig. 2. Representative of dilution curves of rabbit antisera against milk, egg, and soybean proteins by IgG-ELISA.

Each serum was diluted at $10^3 \sim 10^7$ with PBS, was added to the plates coated with milk, egg, and soybean proteins. After incubation, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody, and then OPD solution was used for visualization.

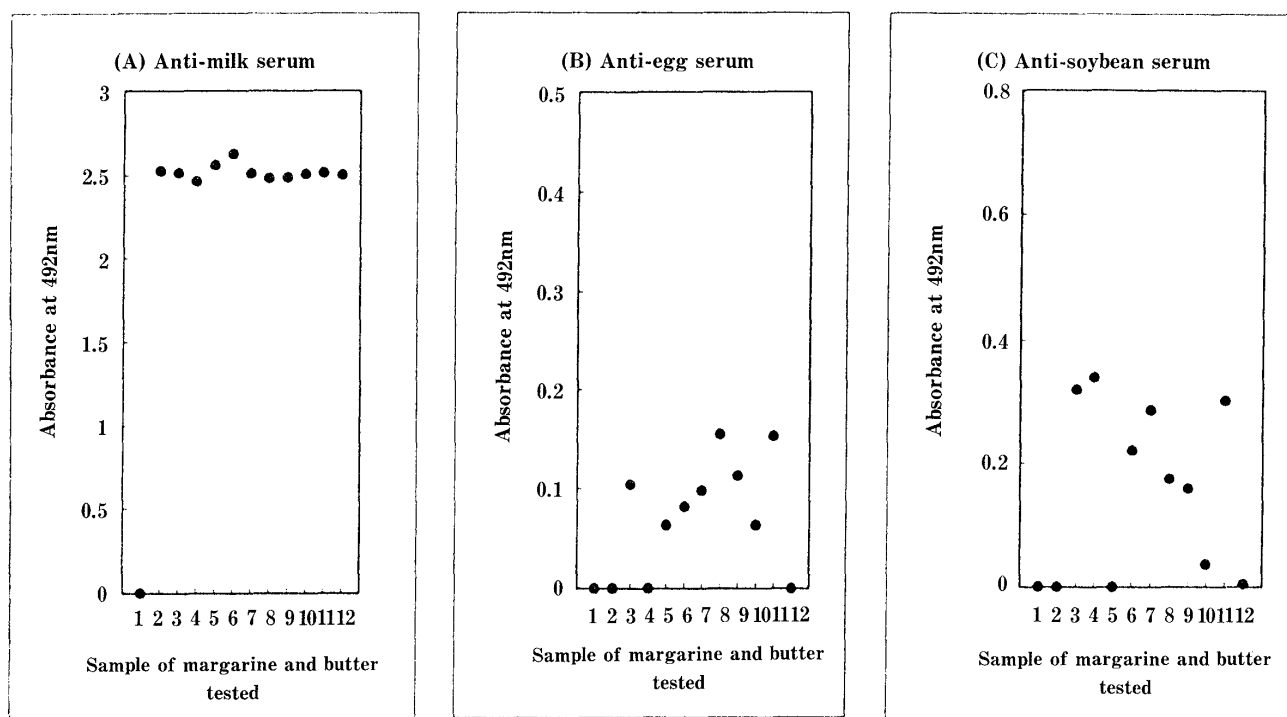


Fig. 3. Detection of milk, egg, and soybean proteins in samples extracted from butter and margarine.

The plates coated with proteins extracted from milk, egg, and soybean were reacted with rabbit antisera: (A) anti-milk antiserum, (B) anti-egg antiserum, and (C) anti-soybean antiserum. The titers of each protein were demonstrated by O.D. absorbance at 492nm.

#1: HAM extracts, #2~11: margarine extracts, #12: butter extracts.

出蛋白中の抗原蛋白の検出を試みた (Fig. 3). 抗牛乳血清では, HAM とは反応せず, 他のバター, マーガリン中の蛋白とはいずれも強い反応を示した. 抗卵血清では, HAM, マーガリン 3 種 (#2, #4), およびバター (#12) では反応は認められず, しかし低値ながらもマーガリン 8 種で反応が認められた. 抗大豆血清では, HAM, マーガリン 2 種 (#2, #5) およびバター (#12) で反応は認められず, 他のマーガリン 8 種では大豆蛋白が検出された.

3. ELISA 法によるヒト血清に反応するバター, マーガリン抽出蛋白

牛乳, 卵白, 大豆に対する特異 IgE 抗体を有するアトピー性皮膚炎患児の血清を用いて, バター, マーガリン中の蛋白抗原とどのように反応するかを ELISA 法により検討した. 対照血清にはアレルギー歴がなく, 総 IgE 値が感度以下の健常児血清を用いた.

患児血清, 対照血清の牛乳蛋白, 卵蛋白, 大豆蛋白に対する IgG 抗体の有無を検討した結果を Fig. 4 に示した. 患児 A~D 血清中にはそれぞれの蛋白に対する IgG 抗体が存在したが, 血清 E のそれぞれの蛋白抗原に対する IgG 抗体は対照と同程度であった. なお血清 C は牛乳 IgE RAST 陰性であったが IgG 抗体は高値で, 他方血清 B は牛乳 IgE RAST 高値であったが IgG 抗体は低値であった. それぞれの蛋白抗原に対する IgE RAST 値と IgG 抗体の値との相関は認められ

なかった.

バター, マーガリン抽出蛋白と患児血清との反応は Fig. 5 に示したように, HAM 抽出蛋白に対しては健常児血清および患児 5 例の血清とも反応はまったく認められなかった. バター 1 種, マーガリン 10 種の抽出蛋白については, 血清 A~D は強い反応を示したが, 血清 E のみはすべての抽出蛋白に対し対照血清と同等の反応しか示さなかった.

5. 牛乳, 卵, 大豆蛋白を含まないマーガリンの食品としての有用性の検討

牛乳, 卵白, 大豆のいずれか, あるいは複数の食品に対して感受性のあるアトピー性皮膚炎患児 15 例に HAM を食してもらい, アンケートの記載を依頼した. HAM は 2~4 週間に 200g 量使用しており, その使用方法は 15 例全例で食パンに塗って食していたが, 6 例では料理にも用いていた. HAM の試食により皮疹の増悪, かゆみの出現, アナフィラキシーショック, 喘息様発作の出現など, 異常な臨床所見を呈した例はなかった. HAM の食品としての有用性を, 1) かたさ, 2) 口あたり, 3) 香り, 4) 塩味, 5) あぶらっぽさ, 6) おいしさ, の 6 項目について 5 段階評価 (良, やや良, 普通, やや悪, 悪) してもらった. その結果を各項目 5 点満点として 15 例の総合点 75 点を最大点として表すと, 1) 45 点 (60%), 2) 62 点 (83%), 3) 47 点 (61%), 4) 46 点 (61%), 5) 49 点 (65%), 6) 57 点 (76%)

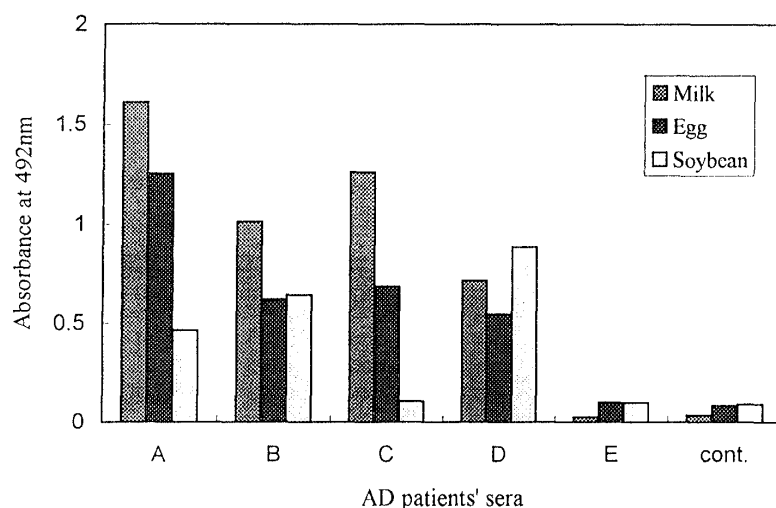


Fig. 4. Detection of IgG antibodies to milk, egg, and soybean proteins in sera from patients with atopic dermatitis positive for IgE-CAP RAST.

The plates coated with milk, egg, and soybean proteins were reacted with sera obtained from patients with atopic dermatitis positive for IgE-CAP RAST (A~E) or healthy control (cont). The IgG antibodies in sera were detected by IgG-ELISA.

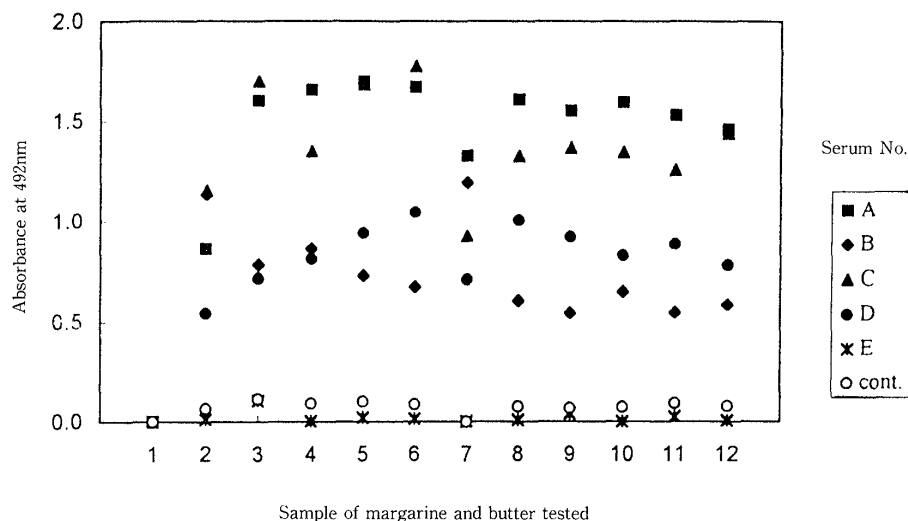


Fig. 5. Detection of IgG antibodies in sera from atopic dermatitis and healthy control to proteins extracted from HAM, butter and margarine.

The plates coated with proteins extracted from HAM (sample 1), margarine (samples 2~11), and butter (sample 12) were reacted with sera from patients with atopic dermatitis (A~D) or healthy control (E). IgG antibodies in sera was detected by IgG-ELISA.

と、いずれの項目も全例「普通」とした場合の合計点45点（60％）以上であった。

考 察

市販バター、マーガリン11種について牛乳蛋白、卵蛋白、大豆蛋白の含有について検討したところ、低アレルギーマーガリン (HAM) 1種を除き牛乳蛋白はバター、全マーガリンに、卵蛋白と大豆蛋白は8種のマーガリンに、含まれていることが判明した。

マーガリンの組成はメーカーにより異なるが、今回の検索に用いたものではパーム油、トウモロコシ油、大豆油などの植物油を原料に、食感、食味を高めるために牛乳、卵、大豆などが添加されている。しかし実際にはその認識は低く、バター、マーガリンに含有されるアレルギー性蛋白の同定、また牛乳、卵、大豆蛋白に過敏性のある患児への影響などはほとんど調査されていないのが現状である。今回の免疫家兔血清を用いた検討から、バター、多くのマーガリンに牛乳、卵、大豆蛋白が含まれることが明らかになった。とくに牛乳蛋白はHAMを除く全マーガリンに含まれており、SDS-PAGEによる解析からもマーガリンの主要な蛋白成分であった。

牛乳、卵、大豆それぞれの蛋白に感受性のあるアレルギー児にとってバター、マーガリンに含有されるこれらの蛋白がアレルゲンとなり得るかどうか検討が必要である。そこで食物アレルギーの関与が疑われ、抗原特異IgE値が高値であるアトピー性皮膚炎患児の血清と、バター、マーガリンから抽出したこれら蛋白との反応を検討したところ、抽出蛋白には血清IgG抗体で充分認識される抗原が含まれていた。すなわち、少なくとも患児の血清と反応し得る蛋白抗原がバター、マーガリン中に存在したことになる。他方低アレルギーマーガリンとして開発されたHAMは、パーム油を原料とし牛乳、卵、大豆などの蛋白を使わずに調製されており、今回の検討でもこれらの蛋白はまったく検出されなかった。

小児期の食物を原因とするアトピー性皮膚炎患児のうち、牛乳蛋白に感受性のあるものは30~40%、卵蛋白には30~40%、大豆蛋白には約20~30%と報告されている⁷⁾⁸⁾。また牛乳、卵、大豆それぞれに対し即時型、とくにアナフィラキシーショックを呈する患児の報告もある⁹⁾。とくに二次食品の除去まで必要な患児にとって、今回の検索からバター、マーガリンも牛乳、卵、大豆蛋白を含みその対象となること、またそのような患児にとってHAMは試みるべき有用なマーガリンであることが推察された。

ところでHAMの食品としての有用性は、たんに「低アレルギー」ということだけでは実際的ではない。そこで香り、かたさ、風味などについて患児の食後感をアンケート調査したところ、いずれの項目も「普通」以上の良好な評価を得た。以上より牛乳、卵、大豆について二次食品の除去の必要な患児に、HAMは食品として充分使用できる低アレルギーマーガリンということができる。

文 献

- 1) 諸井 孝：小児アレルギー疾患における特異IgE, IgG₄抗体値について 第1編 IgG₄抗体値とIgE RAST 値およびアレルギー諸因子の関係について. アレルギー 37, 331-343, 1988.
- 2) 三河春樹：小児期のアレルギー疾患の特徴について. アレルギー 37, 63-67, 1989.
- 3) Jones, S.M. and Sampson, H.A.: The role of allergens in atopic dermatitis. *Clin. Rev. Allergy* 11, 471-490, 1993.
- 4) Chandra, R.K., Gill, B. and Kumari, S.: Food allergy and atopic disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 13, 293-314, 1995.
- 5) Yokota, S., Tsubaki, K., Shimizu, H., Matsuyama, S., Takahashi, K. et al.: Study of immune-responsiveness to wheat antigen by IgG, IgA, and IgE immunoblotting with sera from patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* 176, 45-48, 1992.
- 6) 池沢善郎, 椿 和文, 横田俊平：アトピー性皮膚炎におけるアレルギー低減化小麦(HAW-A1)の有用性とその臨床効果の血清学的な解析. アレルギー 43, 679-688, 1994.
- 7) 小屋二六：0歳アレルギー患児の研究 第1編 食物3大抗原, 卵白・牛乳・大豆に対する特異IgE, IgG₄抗体について. アレルギー 39, 330-338, 1990.
- 8) Watson, W.T.A.: Food allergy in children; diagnostic strategies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 13, 347-359, 1995.
- 9) 岩崎栄作：食物アレルギー小児の臨床像とその臨床経過について. *Ther. Res.* 10, 3081-3089, 1989.

IMMUNOLOGIC ANALYSIS OF MILK, HEN EGG, AND SOYBEAN PROTEINS IN BUTTER AND MARGARINE, AND CLINICAL ASSESSMENT FOR AVAILABILITY OF HYPOALLERGENIC MARGARINE (HAM)

Shumpei Yokota, Yuriko Takahashi, Yukoh Aihara, Kazuyuki Kurihara¹⁾,
Hiroshi Suguro²⁾ and Shuusuke Matsuyama
*Department of Pediatrics, Yokohama City University, ¹⁾Division of Allergy,
Kanagawa Children's Hospital, ²⁾Yokohama City Allergy Center*

To determine the allergenic proteins in commercially available butter and margarine, protein fractions were extracted and immunologically analyzed against milk, hen egg, and soybean antigens. Butter and 10 kinds of margarine were proved to contain these proteins in various concentrations by ELISA and immunoblotting methods by use of the rabbit antisera developed against each food proteins. However, hypoallergenic margarine was found to contain no such proteins at all. Using sera obtained from atopic dermatitis patients, previously detected high levels of IgE antibodies to milk, hen egg, or soybeans, the extracted protein fraction from butter and margarine was analyzed whether these proteins react with IgG antibodies in patients' sera. The sera with high levels of specific IgE recognized protein antigens in these extracts except those from hypoallergenic margarine, suggesting that proteins in butter and margarine may become allergenic for the patients sensitive to the proteins, and that hypoallergenic margarine will be a reasonable alternative for the allergic patients to milk, hen egg, or soybeans.