

ゆで卵の作成と放置に伴うオボムコイドの卵黄への浸透

徳島大学医学部栄養学科

坂井堅太郎 松岡 葵 牛山 優

九州女子大学家政学部家政学科

下田妙子

宇都宮大学教育学部

上田伸男

鶏卵の卵白中のオボムコイド (OM) は、他の卵白タンパク質に比較してアレルギー活性が最も高く、加熱により凝固しない特徴を持っている。鶏卵を15分間沸騰水浴中で作成したゆで卵の卵黄を OM に対する特異抗体を用いたイムノブロットと ELISA により分析したところ、OM は加熱凝固卵白の水溶性成分として卵黄側へ拡散・浸透していることを認めた。卵黄中の OM は、ゆで卵作成直後で卵黄1g 当たり $4.8 \pm 0.8 \mu\text{g}$ と定量された。ゆで卵を室温に120分間放置したゆで卵から取り出した卵黄中の OM は卵黄1g 当たり $78.8 \pm 31.3 \mu\text{g}$ と定量され、ゆで卵作成直後の16.4倍であった。加熱凝固卵白水溶性画分の OM とタンパク質量は、それぞれ $14.2 \pm 11.9 \text{ mg/ml}$ と $37.7 \pm 3.2 \text{ mg/ml}$ と定量され、OM は全タンパク質量の約40%を占めていた。ゆで卵の作成により卵白中の OM が卵黄側へ拡散・浸透することは避けられないと思われるが、アレルギー性の強い OM の感作をできるだけ回避するには、長時間放置したゆで卵の卵黄を使用するのは望ましくないであろう。

Key words: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) — food allergy — hen's egg — immunoblot — ovomucoid

はじめに

鶏卵は、栄養供給の面から理想的な栄養バランスと安価な食品であるため、家庭の調理に頻繁に利用され、市販の多くの加工食品にも含まれている。一方、鶏卵は、成長・発達の重要な時期である小児期に発症頻度の高い食物アレルギーの主要なアレルギー食品として頻繁に検出される¹⁾。一般に鶏卵のアレルギー性は卵黄にはほとんどなく、卵白に強いとされている。このため離乳食として鶏卵を乳幼児に与える場合、ゆで卵の卵黄をつぶして与え、通常、卵白は与えない。これまでの卵白のアレルギーに関する研究から、オボアルブミン (OA)、オボムコイド (OM)、卵白リゾチーム

などが主要なアレルギータンパク質として同定されている²⁾³⁾。特に、OM は、他の卵白アレルギータンパク質と比較してアレルギー活性が最も高く、加熱により凝固しないという特徴も持っている。

ところで、鶏卵を長時間ゆでたり、またはゆで卵を放置しておくとも卵黄表面が暗緑色になることを通常の調理により経験する。これは、ゆで卵の作成によって卵白中に発生した硫化水素が卵黄側に拡散・浸透し、卵黄に多く含まれる鉄と反応して卵黄表面に暗緑色の硫化鉄が生成するからである⁴⁾。本研究では、加熱により凝固しない性質を持つ OM が、ゆで卵の作成と放置により卵白中に発生した硫化水素と同様、加熱凝固卵白中の水溶性成分として卵黄側へ拡散・浸透することを認めたので報告する。また、本来、卵黄中には含まれない OM がゆで卵の作成と放置により主要な卵白アレルギータンパク質として卵黄中に混入するという観点からも考察する。

Received: June 15, 1998

Accepted: August 11, 1998

Abbreviations: EDTA ethylenediamine tetraacetate; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; OA ovalbumin; OM ovomucoid; T-PBS tween20-phosphate buffered saline; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

実験方法

1. 実験材料

1) 卵黄抽出液の調製

ゆで卵は、スーパーマーケットで購入した L サイズの鶏卵を沸騰水浴中で15分間ゆで、1 l の水道水に1分間浸漬して作成した。ゆで卵は室温に10, 30, 60, または120分間放置し、殻と凝固卵白を除去して卵黄を取り出した。卵黄に重量の2倍量の生理食塩水を加え、ポリトロン (Kinematica) で60秒間ホモゲナイズし、遠心上清を得た。この抽出操作を再度行い、2回の抽出液を合わせたものを卵黄抽出液とした。また、卵黄は写真撮影し、イメージスキャナ (GT-9000ART, エプソン) で画像取得した。なお、ゆで卵を水道水に浸漬した後、直ちに卵黄を取り出したものを放置時間0分とした。ゆで卵作成直後の凝固卵白は、ポリトロンで60秒間ホモゲナイズし、遠心上清を加熱凝固卵白水溶性画分とした。

2) 市販 OM の再精製と抗体作製

OM (Oxford GlycoSystems) は、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーにより製品に含まれる不純タンパク質を除去し、再精製標品とした⁵⁾。OM に対する抗体は、500 μ g の再精製 OM を日本白色ウサギ (約2kg) にフロインドの完全アジュバンドとともに免疫し、追加免疫を非完全アジュバンドとともに3回行うことにより作製した。得られた抗血清から IgG 画分をプロテイン A によるアフィニティクロマトグラフィーにより調製した。また、調製した IgG の一部は EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Sulfosuccinimidyl-6(biotinamido)hexanoate) (PIERCE) によりビオチン化した⁶⁾。

2. SDS-PAGE およびイムノブロット

SDS-PAGE は Laemmli の方法⁷⁾に従い、12.5%ゲルに試料 (20 μ g) を泳動後、0.25%クマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。イムノブロット法は試料 (1 μ g) を電気泳動後、Towbin らの方法⁸⁾により泳動タンパク質をニトロセルロース膜に転写した。転写膜は0.05% Tween 20を含む PBS (T-PBS) で振とう・洗浄し、3%ゼラチンを含む T-PBS で一晩振とうした。一次抗体として1%ゼラチンを含む T-PBS で2000倍に希釈した抗 OA ウサギ血清 (Sigma) または抗 OM 血清を1時間反応させた。T-PBS で洗浄後、T-PBS で2000倍に希釈したアルカリホスファターゼ

結合抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Sigma) で1時間反応させ、アルカリホスファターゼ基質溶液 (Sigma) で発色反応させた。SDS-PAGE およびイムノブロット上の各バンドは上記イメージスキャナを用いて画像取得した。

3. ELISA による OM の定量

ELISA 用96穴マイクロプレート (Greiner Labortechnik) の各穴に、0.1M 炭酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解した抗 OM IgG (5 μ g/ml) を100 μ l 加え、4°Cで一晩放置した。T-PBS で各穴を5回洗浄した後、ブロック操作として、0.4%ヤギ正常血清 (Vector Lab. Inc.) を各穴に200 μ l 加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、100 μ l の試料または再精製 OM を各穴に加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、2次抗体としてビオチン化抗 OM IgG (5 μ g/ml) を100 μ l 各穴に加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、T-PBS で2000倍希釈したアビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼ複合体 (Vector) を100 μ l 各穴に加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、100 μ l のアルカリホスファターゼ基質溶液 (Kirkegaard & Perry Lab., Inc.) を加え、室温で20分間発色させた。50 μ l の150mM EDTA 溶液を加えて反応を停止した後、マイクロプレートリーダーで415nm の吸光度を測定した。

実験結果

1. ELISA による OM の定量

再精製 OM に対するウサギ IgG 抗体を ELISA プレートにコーティングし、ビオチン化同 IgG 抗体を2次抗体としてサンドイッチ ELISA による OM の定量法を構築した (Fig. 1)。試料の加熱による OM の抗体認識部位の減少を考慮して、OM の標準標品は、再精製 OM と再精製 OM を沸騰水浴中で15分間加熱したものをを用いた。標準標品として再精製 OM と加熱処理した再精製 OM を用いた場合の ELISA による測定限界は、それぞれ5ng/ml と20ng/ml であった。以降の実験からは、試料としてゆで卵を用いているので、加熱処理した再精製 OM を標準標品として試料中の OM 量を算出した。

2. ゆで卵の放置に伴う OM の卵黄への浸透

市販 L サイズの鶏卵を沸騰水浴中に15分間ゆで、ゆで卵を作成した。作成したゆで卵は室温に120分間まで放置し、卵黄を取り出した (Fig. 2)。ゆで卵作成直後

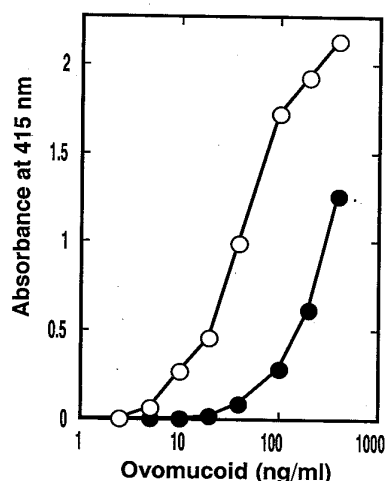


Fig. 1. Standard curves of ELISA for native (○) and heat-treated re-purified ovomucoid (●).

とゆで卵を10分間放置したものから取り出した卵黄の表面は鮮やかな黄色を呈していた。ゆで卵を30分間放置した卵黄表面には硫化鉄の暗緑色の形成が薄く見られた。ゆで卵を60分間または120分間放置して取り出した卵黄は、暗緑色の硫化鉄が卵黄表面全体に濃くみられ、凝固卵白から浸透してきたと思われる浸出液により卵黄表面に光沢が認められた。

室温に放置したゆで卵から取り出した卵黄中に含まれるOMをイムノブロットとELISAにより分析した (Fig. 3)。イムノブロットによりOMは、ゆで卵作成直後から卵黄中に検出され、ゆで卵の放置時間とともにOMのバンドは濃くなった。ELISAによるOMの定量ではゆで卵作成直後の卵黄で卵黄1g当たり $4.8 \pm 0.8 \mu\text{g}$ ($n=5$)と定量された。卵黄中のOM量は、ゆで卵の放置時間とともに急激に増加し、放置120分間後のゆで卵から取り出した卵黄では卵黄1g当たり $78.8 \pm 31.3 \mu\text{g}$ ($n=5$)と定量され、ゆで卵作成直後の16.4倍であった。なお、生卵から注射針(18G)を用いて卵白が混入しないように採取し、卵白のない状態で加熱した卵黄中のOMは、イムノブロットまたはELISAのいずれの分析においても検出限界以下であった。

3. 加熱凝固卵白水溶性画分中のOM

加熱凝固卵白から水溶性画分を調製し、SDS-PAGEとイムノブロットでタンパク質成分を分析した (Fig. 4)。SDS-PAGEによる泳動パターンから加熱凝固卵白水溶性画分中には、オボトランスフェリン(76.6kD)の薄いバンドとOMと思われる35~45kDのプロードな濃いバンドが認められた。卵白リゾチーム(14.4kD)のバンドは認められなかった。OAとOMに対する抗

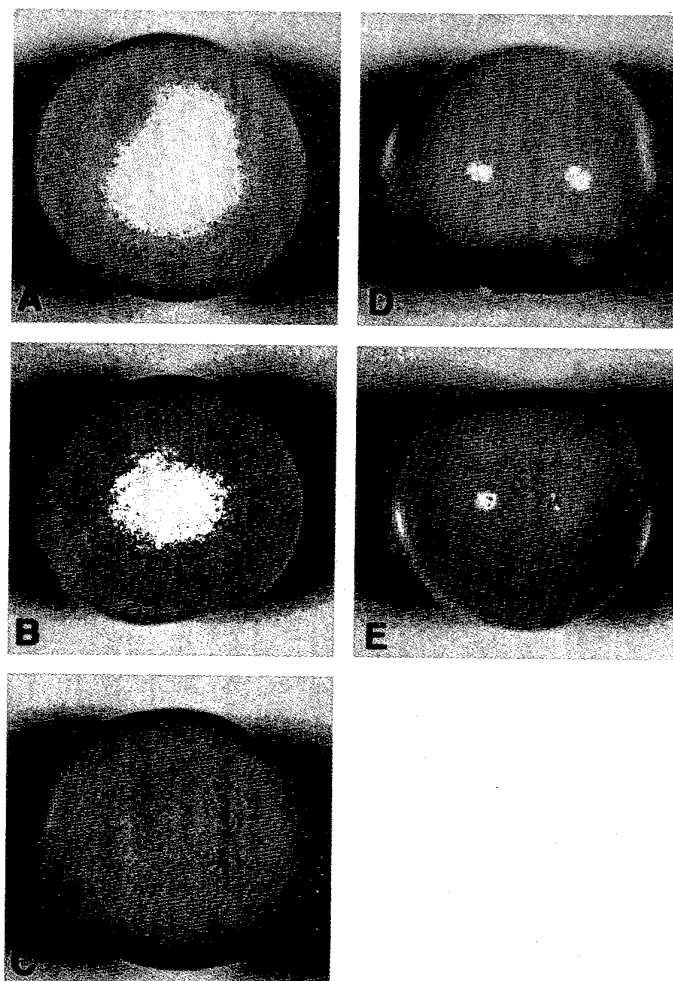


Fig. 2. Photographs of coagulated egg yolks. Hen's eggs were boiled for 15 min and then dipped in water at room temperature for 1 min. The boiled eggs were stood at room temperature for 10 (B), 30 (C), 60 (D) or 120 (E) min, and then coagulated yolk eggs were picked up to remove their shell and coagulated egg white, and photographed. Coagulated yolk egg immediately after preparation of boiled egg was also photographed (A).

体を用いたイムノブロットから、OAも加熱凝固卵白水溶性画分中にわずかに認められた。また、加熱凝固卵白水溶性画分中のタンパク質量とOM量は、それぞれ $37.7 \pm 3.2 \text{ mg/ml}$ ($n=5$)と $14.2 \pm 11.9 \text{ mg/ml}$ ($n=5$)と定量され、OMが全タンパク質量の約40%を占めていた。

考 察

本研究は鶏卵をゆで卵として調理する際、ゆで卵の作成と放置により卵白の主要なアレルゲンタンパク質

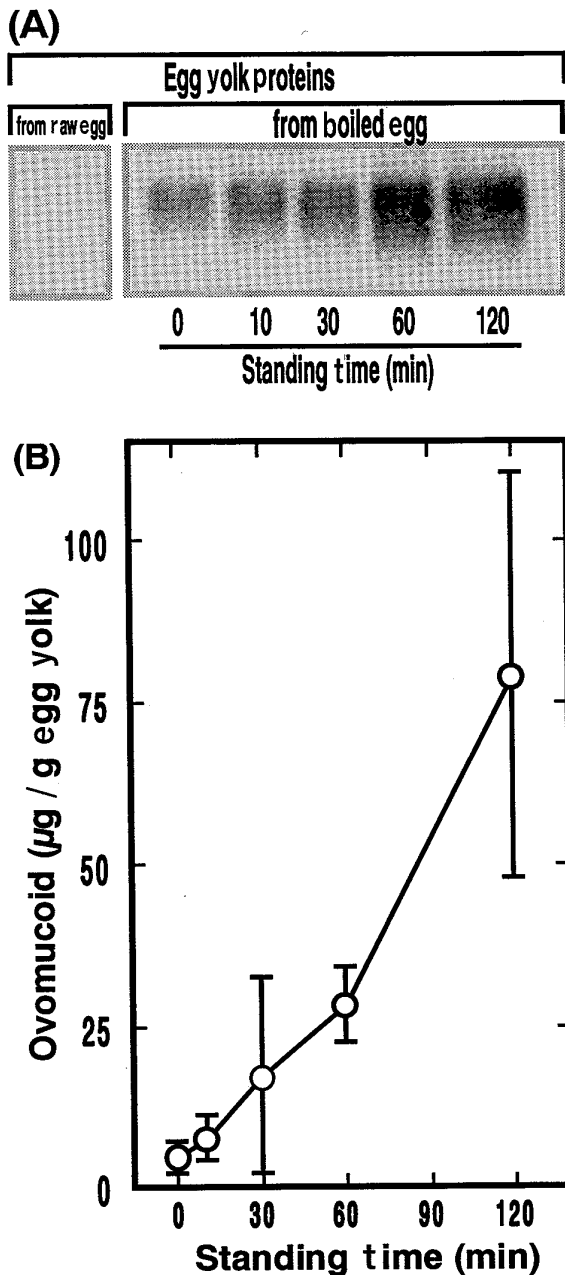


Fig. 3. Immunoblots (A) and ovomucoid contents (B) in coagulated egg yolks from boiled eggs. Egg yolk from raw egg was collected by insertion of a needle into the egg yolk cavity. Sample preparations were analyzed by immunoblotting (anti-ovomucoid) and the blots were scanned directly. The contents of ovomucoid in coagulated egg yolk were determined by ELISA. The data represent means $\pm$ SD from four to five separate assays in each point.

である OM が卵黄側へ拡散・浸透することを認めたものである。ELISA による定量から、卵黄中の OM 量は、ゆで卵を室温に放置する時間とともに増加し、120 分間放置したゆで卵から取り出した卵黄中の OM は

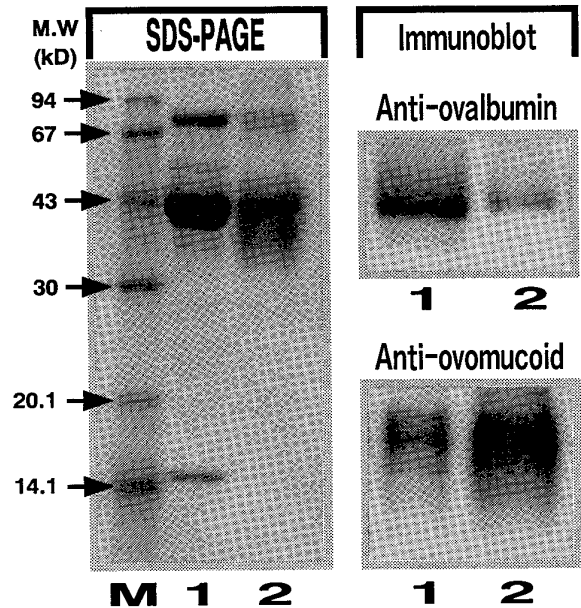


Fig. 4. SDS-PAGE and immunoblots of soluble fraction of heat-coagulated egg white from boiled egg. Sample preparations were analyzed by SDS-PAGE (Commassie brilliant blue staining) and by immunoblotting (anti-ovalbumin or anti-ovomucoid). Stained gel and blots were scanned directly. lane M; molecular weight standards, lane 1; egg white proteins, lane 2; soluble fraction of heat-coagulated egg white.

ゆで卵作成直後の16.4倍であった。

卵黄は卵白タンパク質のオボトランスフェリンを含み、OA や OM も痕跡程度に含むとされている⁹⁾が、本研究において、卵白を含まない状態で加熱した卵黄中の OM は、イムノブロットおよび ELISA のいずれの分析においても検出限界以下であった。加熱により鶏卵が凝固する際、卵白および卵黄は、ともに水分を分離することなく凝固する。OM は加熱により凝固しない特徴を持っているので、ゆで卵の場合、OM は凝固卵白中の水溶性画分に保持される。また、卵黄と卵白中の水分含量は100g 当たりそれぞれ51g と88g で、卵白中の水分含量が卵黄中のものに比べて高い。これらのことから、ゆで卵の作成と放置により卵黄中に検出された OM は、加熱凝固卵白の水溶性成分が卵黄側へ拡散・浸透したことによるものと推測された。

加熱凝固卵白の水溶性成分が卵黄側へ移行する現象は、鶏卵を長時間ゆでたり、またはゆで卵を放置しておくで卵黄表面が暗緑色になることで視覚的に確認できる。これは、ゆで卵の作成によって卵白中に発生した硫化水素が卵黄側へ拡散・浸透し、卵黄に含まれる鉄と反応して卵黄表面に暗緑色の硫化鉄が生成するか

らである⁹⁾。ゆで卵の作成直後またはゆで卵を室温に10分間放置した卵黄表面は、鮮やかな黄色を呈していたが、ゆで卵を60または120分間放置すると、卵黄表面全体が硫化鉄の暗緑色になり、凝固卵白から浸出してきたと思われる浸出液により卵黄表面に光沢が認められた。通常、ゆで卵による卵黄表面の硫化鉄の形成は、卵黄表面から浅い位置にとどまっているので、ゆで卵の作成と放置により加熱凝固卵白から拡散・浸透したOMも凝固卵黄の表面または表面から浅い部分にとどまり、卵黄深部には浸透していないと推測される。

ELISAによる加熱凝固卵白水溶性画分中のOM量を定量したところ、OMは全タンパク質量の約40%を占めていた。SDS-PAGEによる加熱凝固卵白水溶性画分の分析においてもOMと思われる35~45kDのブロードなバンドが主要タンパク質成分として検出された。オボトランスフェリン(76.6kD)も薄いバンドとして認められたが、卵白リゾチーム(14.4kD)のバンドは検出されなかった。また、イムノプロットにより加熱凝固卵白水溶性画分を分析したところ、SDS-PAGEで検出された35~45kDのブロードなバンドはOMと確認され、OMと電気泳動的に移動度が近いOAもわずかに検出された。OAは加熱により凝固するタンパク質である。本研究から、加熱凝固卵白水溶性画分にわずかに認められた凝固していないOAが、OMと同様にゆで卵の放置とともに卵黄中へ拡散・浸透していることも推察された。

離乳食として乳幼児に鶏卵を与える場合、ゆで卵の卵黄をつぶして与えることがある。これは、卵黄の高い栄養価と卵白と比較してアレルギー性が低いことに起因している。離乳食としてゆで卵の卵黄を与える場合、アレルギー性の強いOMの感作をできるだけ回避するには、長時間放置したゆで卵を使用するのは望ましくないであろう。一方、ゆで卵の作成により卵黄に混入するOM量は、OMの強いアレルギー性を考えると少なくないかもしれない。近年、経母乳感作による乳幼児のアレルギーの発症に関する研究から、母親の食事に由来する母乳中のアレルギータンパク質の存在が指摘されている¹⁰⁾¹¹⁾。Fukushimaらは通常の食事をしている母親の母乳中にOAが検出される頻度は8.3%であり、検出された母乳中のOA濃度は母乳1l当たり数百ng程度と報告している¹¹⁾。

食物アレルギーは、成人よりも小児に多く発症し、全国の保育園児に対する食物アレルギーの罹患率の調査では12.6%と報告されている¹²⁾。食物アレルギーの

治療は食物除去を基本に行われているが、食物アレルギーの予防と治療のための食生活指導を考えると、食品形態と献立の調理方法による食物アレルギーの混入とアレルギー性の増減に関する系統的な情報が必要とされるであろう。ゆで卵の作成と放置により卵白の主要なアレルギータンパク質であるOMが卵黄側へ拡散・浸透することを認めた本研究成果がその一助になることを期待する。

文 献

- 1) 山田一恵, 岸本真智子, 稲垣義影, 山田政功, 他: アトピー性皮膚炎における食餌性アレルギーの検討. 小児科臨床 38, 2543-2552, 1985.
- 2) 本間季里, 青柳政彦, 斉藤公幸, 西牟田敏之, 他: IgG および IgE 抗体により認識される卵白アルブミン, オボムコイド抗原構造についての検討. アレルギー 40, 1167-1175, 1981.
- 3) Gu, J., Matsuda, T. and Nakamura, R.: Antigenicity of ovomucoid remaining boiled shell eggs. *J. Food Sci.* 50, 1448-1450, 1986.
- 4) 山崎清子, 島田キミエ: 鶏卵の調理. 調理と理論, 同文書院, 東京, pp.268-298, 1986.
- 5) Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z. and Sampson, H.A.: Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93, 1047-1059, 1994.
- 6) Sakai, K., Kohri, T., Kweon, M.N. and Kishiho, Y.: A non-glycosylated form of pulmonary surfactant A appears in rat amniotic fluid. *Eur. Respir. J.* 7, 88-93, 1994.
- 7) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 8) 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. USA* 76, 4350-4354, 1979.
- 9) Langeland, T.: A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white VI. Occurrence of protein cross-reacting with allergens in hen's egg white as studied in egg white from turkey, duck, goose, seagull, and in henn egg yolk and henn and chicken sera and flesh. *Allergy* 38, 399-412, 1983.
- 10) 小倉英郎, 小倉由紀子, 友田隆士, 厨子徳子, 他:

母乳栄養のアレルギー学的研究 第1編 母乳中の卵白抗原および卵白抗体の検索. アレルギー 38, 342-351, 1989.

- 11) Fukushima, Y., Kawata, Y., Onda, T. and Kitagawa, M.: Consumption of cow milk and

egg by lactating women and presence of b-lactoglobulin and ovalbumin in breast milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 30-35, 1997.

- 12) 厚生省「食物アレルギー対策検討委員会」(飯倉洋治委員長)平成8年度報告書, pp.1-34, 1997.

APPEARANCE OF OVOMUCOID IN COAGULATED EGG YOLK PASSING THROUGH FROM SOLUBLE FRACTION OF COAGULATED EGG WHITE IN BOILED EGG

Kentaro Sakai¹⁾, Aoi Matsuoka¹⁾, Yu Ushiyama¹⁾, Taeko Shimoda²⁾ and Nobuo Ueda³⁾

¹⁾*Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima*

²⁾*Faculty of Home Economics, Kyushu Women's University*

³⁾*Faculty of Education, Utsunomiya University*

Ovomucoid is a egg white protein which has a strong allergenicity with a unique characteristic in heat-noncoagulable one contrast to heat-coagulable other major egg white proteins. By ELISA and immunoblots analysis, ovomucoid was detected in heat-coagulated egg yolk after immediate boiling of hen's egg for 15 min (boiled egg) at the concentration of $4.8 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ egg yolk, but not detected in raw egg yolk collected by insertion of a needle into the egg yolk cavity. Ovomucoid in heat-coagulated egg yolk was increased by standing the boiled eggs at room temperature for 10, 30, 60 and 120 min at the concentration of 7.5 ± 3.4 , 17.2 ± 15.1 , 28.1 ± 5.9 and $78.8 \pm 31.3 \mu\text{g/g}$ egg yolk, respectively. The soluble fraction prepared from heat-coagulated egg white of boiled egg contained $37.7 \pm 3.2 \text{ mg/ml}$ of proteins including $14.2 \pm 11.9 \text{ mg/ml}$ of ovomucoid as a major and minors of detectable ovalbumin and ovotransferrin. These results suggested that the appearance of ovomucoid in coagulated egg yolk of boiled egg was due to passing the soluble fraction rich in ovomucoid in heat-coagulated egg white through into the coagulated egg yolk, which may have notable consequences for the presence of ovomucoid as a major egg white allergen in yolk egg of boiled egg.