

卵の低抗原化に関する研究

キューピー (株) 基礎研究所

久富道江 木村 守 犬飼 進 押田一夫

群馬大学医学部小児科

森川昭廣

卵アレルギー患者にとって卵の極めて強い抗原性は問題とされている。そこで卵の抗原性を低下させるために、先ず最初に乾燥全卵を種々の pH の緩衝液に溶解し、120°C で10~40分間加熱処理した。その結果、加熱した乾燥全卵は無加熱のものよりも抗原性の低下がみられ、pH が低いほどまた加熱時間が長いほど著しかった。しかし期待したほどの低下は認められなかったので、次に、加熱処理にサクシニル化およびアルカリ処理を併用したところ、加熱処理単独よりもさらに抗原性の低下が認められた。そこで、dot blotting, inhibition ELISA, RAST inhibition および PCA 試験を用いて詳細に抗原性の測定を行った。測定方法の違いにより抗原性の低下度に差がみられたが、ほとんどの方法から抗原性は1000分の1以下まで低下していることがわかった。また、SDS-PAGE とゲル濾過を用いて卵のタンパク質の変化を調べたところ、卵の主なアレルゲンといわれているオボアルブミンやオボムコイドに相当するタンパク質のバンドやピークは認められなかった。

Key words: allergenic activity — egg — IgE — IgG — inhibition ELISA

緒言

近年世界的に気管支喘息、アレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患は増加の一途をたどっており、小児の食物アレルギーについても同様に増加の報告¹⁾²⁾がある。さらに本症は成人するまでには軽快することがほとんどであったが、最近では成人まで継続する例、あるいは成人で初めて発症する例もあり社会的な問題となってきた³⁾。

アレルギー学、免疫学の発展に伴って食物アレルギーのメカニズムは次第に明らかにされてきたが、その治療法は除去食物療法中心であり、その他に抗ア

ルギー剤の投与が行われているにすぎない。除去食物療法を行う場合、成長期の乳幼児アレルギー患者には食物の種類、量ともに大きな制限が加わることになる。患者はもとより家族にとっても大変深刻な問題である。特に卵は食物アレルゲンのなかでは RAST で陽性になることが多く、食物アレルゲンとして重要であり、食物から除去される率が高い。卵と並んで栄養価の高い牛乳についてはアレルギーの主たる原因タンパク質である β -lactoglobulin などの抗原性を低下させる目的で酵素処理⁴⁾⁵⁾、加熱処理^{4)~6)}、あるいは化学的修飾^{7)~11)}などが試みられており、既に商品として利用されているものもある。卵における抗原性成分は主として卵白にあり、その中でも ovalbumin (以下、OA) および ovomucoid (以下、OM) が特に抗原性が強いといわれている。しかし、それぞれのタンパク質の抗原性に関する報告^{12)~14)}はあるが、牛乳ほど低抗原化の研究は進んでいないようである。そこで、著者らは食品として許容できる範囲で卵を加工処理し、低抗原化を試みたので報告する。

材料および方法

① 低抗原化卵の調製

Received: July 5, 1991

Accepted: September 11, 1991

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; CBB Coomassie brilliant blue; DES dried whole egg solid; MES modified whole egg solid; HPLC high pressure liquid chromatography; IgG immunoglobulin G; IgE immunoglobulin E; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; PBS phosphate buffered saline; RAST radio-allergosorbent test; PCA passive cutaneous anaphylaxis; OA ovalbumin; OM ovomucoid; SDS-PAGE sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

卵の個体差による影響を防ぐため市販の乾燥全卵(キューピー(株)製, dried whole egg solid, 以下 DES)を供試した。0.1M 炭酸緩衝液(pH 8.5)900ml に100g の DES を溶解し, 2M NaOH で pH 8.5 に調整しながら無水コハク酸10g を徐々に添加した。その後, 精製水で透析し, 凍結乾燥したものを1900ml の精製水に溶解した。これに NaOH 6.6g を添加し, 50℃の湯浴中で2時間攪拌した後, 70℃で15分加熱した。さらに精製水で透析した後, 凍結乾燥した。これを以下の試験に供試した(modified whole egg solid, 以下 MES)。

② 卵の加熱処理

乳製品などのタンパク質を加熱変性させると, その抗原性は低下すると言われている¹⁵⁾。一方, 卵の場合は100℃, 45分の加熱処理でも抗原性は消失するまでには至らないという報告¹²⁾がある。卵の OA は熱に対する感受性が高く, OM は低いといわれていることから, 100℃, 45分の加熱条件でも OM の抗原性が残存しているのかもしれない。そこでこの条件より更に厳しい加熱条件, すなわち一般に低酸性食品の加熱殺菌処理で常用されている温度条件(120℃)で DES を処理した時, 加熱時間および pH が DES の抗原性にどのように影響するかを検討した。0.2M リン酸-0.1M クエン酸緩衝液(pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)に10mg/ml になるよう DES を溶解し, 硬質ガラス試験管(外径10mm, 内径8mm, 長さ150mm)に1ml ずつ分注した。口部を溶封し, オイルバスで120℃, 10, 20, 40分加熱処理した。冷却後, 1200×g 10分遠心し, その上清を用いて酵素抗体間接法により抗原性の確認を行った。

③ Dot blotting による酵素抗体間接法

Towbin ら¹⁶⁾の方法を若干変更して行った。

(a) 96ウェル blotting 装置(Milli Blot™-D, Millipore 製)に PBS で段階希釈した DES または MES を100μl ずつ注入し, トランスファーメンブラン(IPVHR 8510, Millipore 社)に吸着させた。

(b) 抗体の非特異的吸着を防止するため0.4% Triton X-100 / PBS に溶解した1% normal goat serum で処理した後, rabbit anti whole egg serum で2時間反応させた。次に, 0.4% Triton X-100 / PBS で3回洗浄した後, peroxidase 標識 anti rabbit IgG (Cappel 製)で2時間反応させた。

(c) 0.4% Triton X-100 / PBS で3回洗浄した後, 基質(3,3-diaminobenzidine 20mg, 0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 7.6, 100ml, 30% H₂O₂ 20μl)を加え反応さ

せた。発色したスポットの濃淡はデンストメーター(TEFCO 製)で比較した。

④ inhibition ELISA による抗原性の比較(ウサギ抗血清)

Heppell ら¹⁷⁾の方法を若干変更して行った。

(a) DES を0.1M 炭酸緩衝液(pH 9.5)に100μg/ml になるよう溶解し, その100μl を96穴マイクロプレート(Immuno Plate Maxi Sorp, Nunc 製, 以下プレート)に注入, 4℃で一晩放置した。

(b) PBS で段階希釈した DES または MES と PBS で10⁴倍希釈した rabbit anti egg white serum を同量ずつ混合し, 4℃で一晩放置した。

(c) DES をコートしたプレートのウェルを0.05% Tween 20 PBS 溶液で3回洗浄した後, (b)の混合溶液を各ウェルに100μl ずつ注入, 室温で6時間放置した。

(d) 3回洗浄し, PBS で1000倍希釈した alkaline phosphatase 標識 anti rabbit IgG AM (PA310, The Binding Site 製)を100μl ずつ注入, 4℃一晩放置した。

(e) 再びプレートを0.05% Tween 20 PBS 溶液で3回洗浄後, diethanolamine 緩衝液(pH 9.5)に溶解した0.1% para-nitro phenyl phosphate disodium salt 溶液を100μl ずつ注入, 30分室温に放置した。

(f) 2M NaOH を50μl ずつ各ウェルに追加注入して反応停止後, マイクロプレートリーダー(MTP-32, コロナ電気製)にて405nm における吸光度を測定した。バックグラウンドの吸収は PBS を注入したウェルより求めた。すべての実験区は duplicate で行った。inhibition は下記の式に従って計算した。

$$\frac{\text{抗原無添加の OD} - \text{抗原添加の OD}}{\text{抗原無添加の OD}}$$

⑤ inhibition ELISA による抗原性の比較(ヒト抗血清)

(a) 乾燥卵白を0.05M 炭酸緩衝液(pH 9.6)に10μg/ml になるよう溶解し, 96穴プレートに100μl ずつ注入後, 4℃で一晩放置した。

(b) PBS で段階希釈した OA (Sigma 製), DES または MES と1% BSA / PBS (バクスター製)で50倍希釈した強陽性患者血清(予備実験で卵特異 IgG 抗体が高いものと判明した3名の患者血清)を等量ずつ混合し, 4℃で一晩放置した。

(c) 抗原をコートしたプレートを0.05% Tween 20 を含む生理食塩水で3回洗浄した後, (b)の混合液を100μl ずつ注入し, 37℃で2時間インキュベートした。

(d) 3 回洗浄し, PBS で1000倍希釈した peroxidase 標識 anti human IgG (E.Y LABS. 製) を100 μ l ずつ各ウェルに注入後, 37 $^{\circ}$ C で2時間インキュベートした。

(e) 3 回洗浄し, 基質(0.1M リン酸-クエン酸緩衝液 pH 5.0 100ml, ortho-phenylenediamine 40mg, および30% H₂O₂ 40 μ l) を100 μ l 加え, 室温で20分放置した。

(f) 2.5M H₂SO₄ を100 μ l ずつ追加注入して反応を停止させ, 490nm における吸光度を測定した。

⑥ RAST inhibition

Gleich ら¹⁸⁾の方法を若干変更して行った。

(a) PBS で段階希釈した OA または MES 溶液と強陽性患者血清(卵特異 IgE 抗体が高いものと判明した, 5名の血清を等量混合したもの)を70 μ l ずつ混合し, 4 $^{\circ}$ C で一晩放置した。

(b) (a)の混合液50 μ l と卵白ディスク(アレルゲンディスク F1卵白, Pharmacia 製)を試験管に入れ, 室温で6時間振盪した後, 0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。

(c) ¹²⁵I で標識した anti human IgE (RAST kit, Pharmacia 製)50 μ l を各試験管に添加し, 室温で一晩振盪した。

(d) 0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄後, radioactivity を計測(CPM: count per minute)した。抗原の各濃度における inhibition は下記の式に従って計算した。

$$\frac{\text{抗原無添加の CPM} - \text{抗原添加の CPM}}{\text{抗原無添加の CPM}}$$

⑦ SDS-PAGE および Western blotting

SDS-PAGE (TEFCO 製の4~12% gradient gel を使用)を行った後, トランスファーマンブラン(Millipore 製)に150mA の定電流で1時間電気転写した。転写されたタンパク質は rabbit anti whole egg serum を一次抗体として, 酵素抗体間接法で抗原性の確認を行った。また, 同時に SDS-PAGE を行ったゲルを CBB で染色を行った。

⑧ HPLC

OA, OM, DES および MES を2mg/ml の濃度になるよう50mM phosphate buffer (pH 7.2), 150mM NaCl の溶出液に溶解し, 0.22 μ m のメンブランフィルターで予め濾過した。カラムは SuperoseTM6 (HR16/50, Pharmacia 製)を用いた。上記の溶出液を用い0.5 ml/min の流速で流し, 280nm における吸光度を測定

した。

⑨ 抗血清の調製

IgG 抗体(ウサギ抗血清)の調製には100mg/ml の濃度の抗原溶液(DES または乾燥卵白)と同量の complete Freund's adjuvant (ヤトロニ製)を用い, ウサギの腹部に皮下投与した。1ヵ月後に2回目の免疫を行い, さらに1ヵ月後に全採血し, 常法に従い抗血清を得た。IgE 抗体(マウス抗血清)の調製には10 μ g/ml の抗原(DES) 0.1ml と10mg/ml の Al (OH)₃ 0.1ml をよく混合し, 6週齢の BALB/c 雄マウスに0.2ml, 腹腔内投与した。2週間ごとに計3回免疫し, 最後の投与より1週間後に全採血を行い抗血清を得た。

⑩ PCA 試験

ウサギ抗血清(IgG 抗体)を用いた PCA 試験は Ovary ら¹⁹⁾の方法に準じて行った。約300g の雄モルモット(n=5)の背部に, PBS で2倍段階希釈した抗血清をそれぞれ0.1ml 皮内投与した。4時間放置後, 1mg/ml の抗原溶液(DES または MES)0.5ml と0.3% Evans' blue PBS 溶液0.5ml を混合したものを静脈から投与した。30分後, 直径5mm 以上の青色斑を呈する抗血清の最終希釈倍率の逆数をもって PCA 抗体価とした。

マウス抗血清(IgE 抗体)を用いた PCA 試験は Mota ら²⁰⁾の方法に準じて行った。10週齢の Sprague Dawley 系雄ラット(n=5)を用い, 2倍段階希釈した抗血清を皮内投与して, 1日放置後, 抗原溶液と Evans' blue 溶液の混合溶液を静脈投与した。以下は上記と同様に行った。

結 果

① DES の抗原性に及ぼす pH および加熱の影響

一般に低酸性食品の加熱殺菌処理で常用されている温度条件(120 $^{\circ}$ C)で DES を処理したとき, 加熱時間および pH が DES の抗原性にどのように影響するかを検討した(Fig. 1)。いずれの加熱時間においても pH の低下に伴い抗原性は低下する傾向が認められ, 特に加熱時間の長いものほど顕著であった。しかし, 供試した pH 範囲内において最も抗原性の低下がみられた pH 5.0 で40分の加熱処理の時でも無処理の乾燥全卵(DES)の10分の1も低下していなかった。

② in vitro における MES の抗原性低下度の測定

(a) 酵素抗体間接法による測定

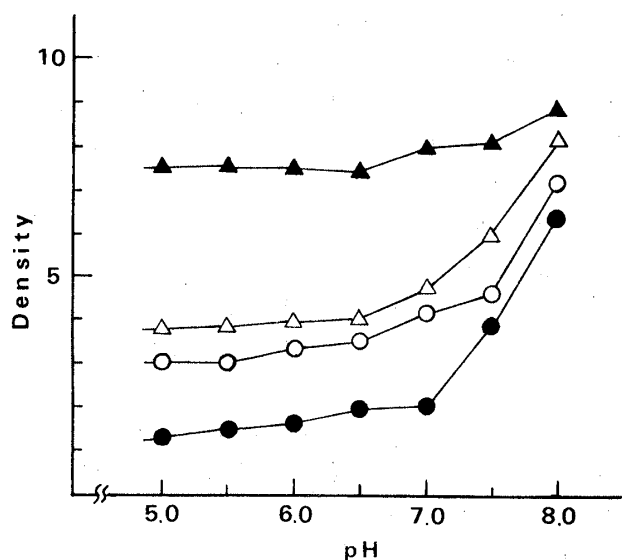


Fig. 1. Effect of pH and heat treatment on antigenicity of DES by enzyme immunoassay (dot blotting). 100 μ l of samples (50 μ g/ml) were applied. ▲; unheated, △; 120°C, 10min, ○; 120°C, 20min, ●; 120°C, 40min.

Fig. 2 に抗原濃度と発色したスポットの density との関係を示した。DES ではほぼ直線関係 ($r=0.993$) にあった。すなわち、抗原濃度と density 間は比例関係にあり、DES を standard として、MES と抗原性を比較することが可能であることがわかった。MES の供試した最大濃度である 1000 μ g/ml における density は

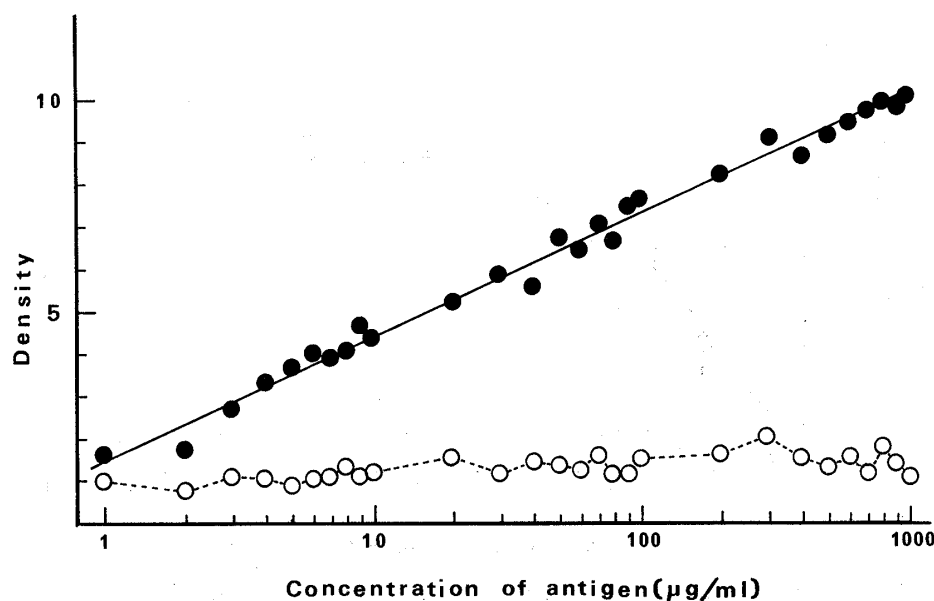


Fig. 2. The correlation between concentration of antigen and density of spots obtained from enzyme immunoassay (dot blotting). ●; DES, ○; MES.

DES の最低濃度である 1 μ g/ml の density の値より低かった。MES の抗原性を DES と正確に比較するには MES の濃度を更に高くする必要があるが、今回用いた濃度がメンブランフィルターに対するタンパク質吸着能はほぼ限界であり、これ以上の濃度では試験しなかった。この測定法での結果より、MES の抗原性は DES の 1000 分の 1 以下まで低下していることが明らかとなった。

(b) Inhibition ELISA による測定

酵素抗体間接法より更に感度の高い inhibition ELISA で測定した。乾燥卵白に対するウサギ抗血清を一次抗体、抗ウサギ免疫グロブリンを二次抗体として、抗原性を測定した結果を Fig. 3 に示した。50% inhibition における inhibitor 濃度は DES が 3.4 μ g/ml, MES が 64mg/ml であり、およそ 19000 分の 1 に抗原性が低下していた。

次に、卵白に対し IgG 抗体を有しているヒト血清を一次抗体、抗ヒト IgG を二次抗体として抗原性を測定した結果を Fig. 4 に示した。50% inhibition における inhibitor の濃度は DES が 7.4 μ g/ml, OA が 7.0 μ g/ml および MES がおよそ 10mg/ml であった。したがって MES は DES に対して 1350 分の 1、また OA に対しては 1400 分の 1 に低下していた。

(c) RAST inhibition による測定

卵に対して IgE RAST スコアの高かったアレルギー患者血清を用いて、MES の抗原性を検討した結

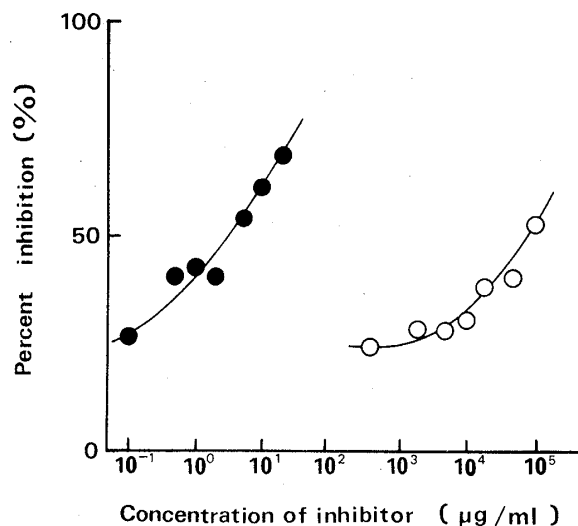


Fig. 3. Inhibition ELISA for DES (●) and MES (○). Flat bottomed microtiter plates were coated with 100 μ l of DES (100 μ g/ml), and inhibitor antigens diluted serially were mixed with same volume of rabbit antiserum (1: 10000) against egg white, and added into each well. After reacting with second antibody conjugated alkaline phosphatase, the substrate was added and optical density at 405nm was measured.

果を Fig. 5 に示した。50% inhibition における inhibitor の濃度は OA が 5 μ g/ml, MES がおよそ 10mg/ml であった。したがって MES は DES に対して 2000 分の 1 に低下していた。

③ PCA 試験による測定

ウサギ抗血清 (IgG 抗体) を用いて測定した結果を Fig. 6 に示した。MES の PCA 抗体価は 1.4 ± 0.5 , DES は 7372.8 ± 1831.7 であったので、およそ 5000 分の 1 に低下していた。マウス抗血清 (IgE 抗体) を用いて測定した結果を Fig. 7 に示したが、DES が 230.4 ± 57.2 であったのに対し、MES では原液抗血清でも反応が認められなかった (<1)。したがって MES は DES に対して少なくとも 200 分の 1 以下に低下していた。

④ SDS-PAGE および Western blotting

抗原性の低下が認められた MES における OA および OM がどのように変化したかを確認するため SDS-PAGE を行った (Fig. 8)。DES (Lane B) および乾燥卵白 (Lane C) におけるバンドを標準の OA (Lane D) および OM (Lane E) と比較すると、それらに相当する明瞭なバンドが認められた。MES (Lane F) では広い範囲 (24~200kD) にブロードな CBB 染色された部分が認められたが、OA および OM に相当するバンドは確認できなかった。SDS-PAGE の CBB で染色された部分に抗原性があるのかどうかを確認するため Western blotting を行った (Fig. 9)。DES (Lane B)、OA (Lane C) および OM (Lane D) には抗原性を有する OA、OM などのタンパク質のバンドが認められたが、MES (Lane A) については抗原性を示す発色が認められなかった。

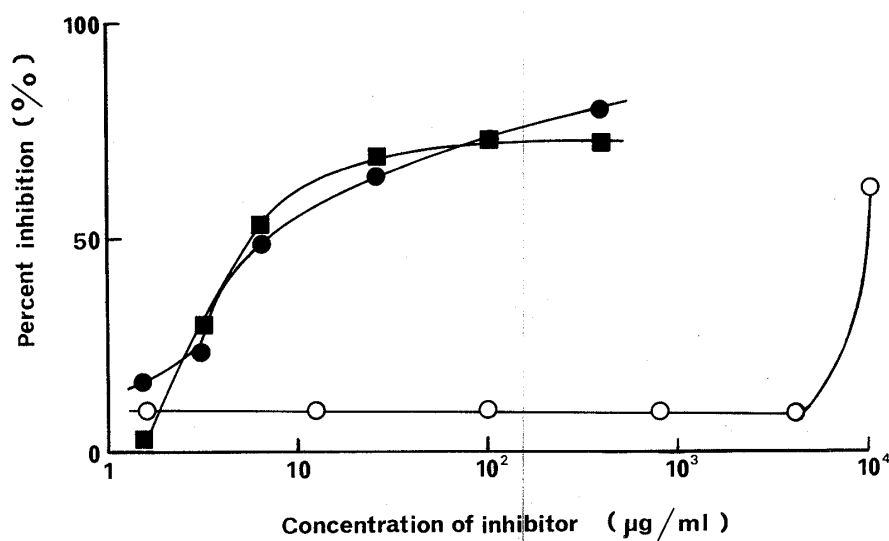


Fig. 4. Inhibition ELISA for DES (●), OA (■) and MES (○). First anti-serum and second antibody were patient's serum (1: 50), anti-human IgG conjugated peroxidase (1: 1000), respectively.

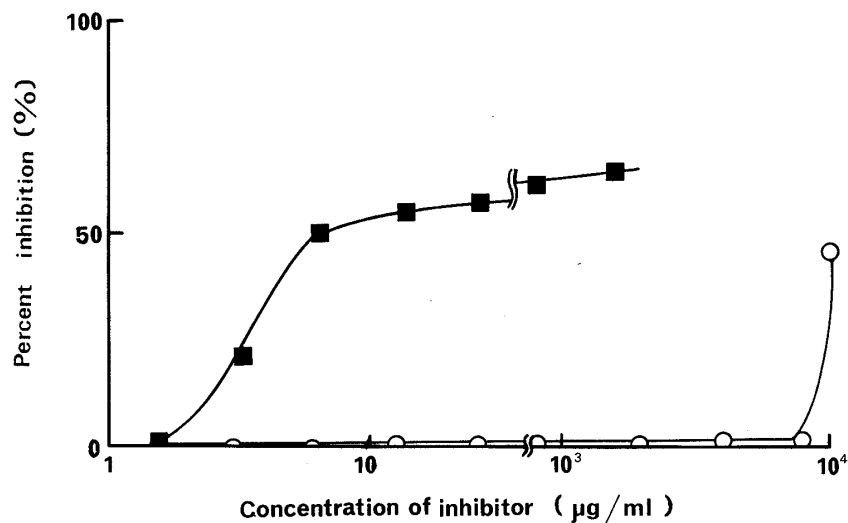
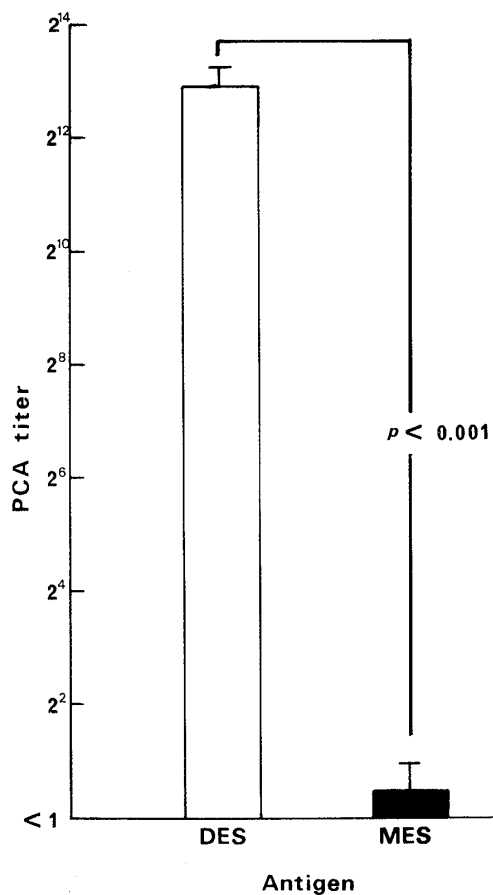


Fig. 5. Inhibition RAST for OA (■) and MES (○). First antiserum and second antibody were patient's serum, anti-human IgE labelled by ^{125}I , respectively.

⑤ HPLCによるゲル濾過

MESの分子量分布を明らかにする目的でゲル濾過を行った。Fig. 10の(A)にはOAとOMを、(B)にはDESを、(C)にはMESの溶出パターンを示した。DES

にはOAおよびOMに相当するピークが認められたが、MESにはそれらのピークは認められなかった。ただし、OAやOMを包含する大きなピークとこのカラムの担体で分画できない分子量(5×10^6 以上)を示すvoid volumeにピークが認められた。このような高分子量のタンパク質はDES(B)にはみられなかった。



考 察

現在までに明らかにされている卵アレルギーの主要原因物質はタンパク質であり、これまでそのタンパク質の同定は種々研究されてきた。例えば、Hoffmanら¹³⁾は卵アレルギー患者の血清を用いて免疫学的方法により血清中のIgE抗体と卵白タンパク質の反応性

Fig. 6. Antigenic reactivity of MES to specific rabbit antiserum containing IgG antibody to DES. The values of column represent PCA titers. Two-fold serially diluted antiserum were injected intracutaneously into the shaved back of five guinea pigs. Four hours later, 1.0ml of 0.15% Evans' blue solution containing 10mg of antigen (DES or MES) was injected intravenously into each guinea pig. These guinea pigs were sacrificed 30 min later. Minimum concentration of antiserum detected as positive spots were considered as PCA titers.

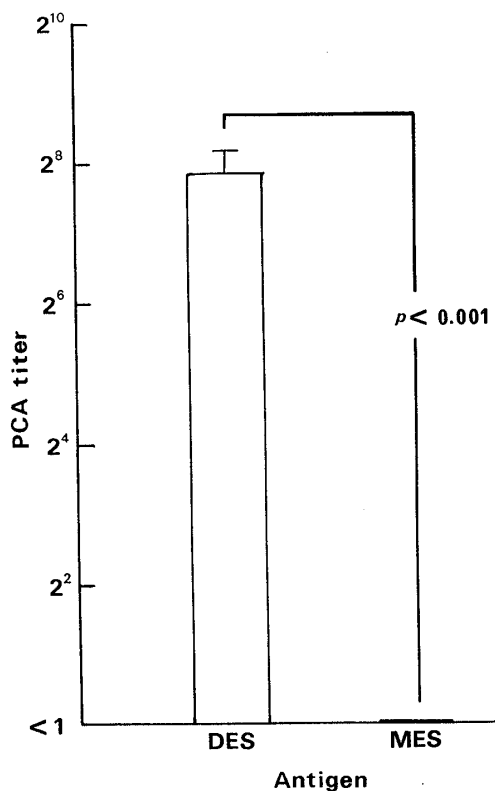


Fig. 7. Antigenic reactivity of MES to specific BALB/c mice antiserum containing IgE antibody against DES. BALB/c mice were immunized with 1 μ g of antigen (DES) in 0.2ml of saline together with alum intraperitoneally. Two-fold serially diluted antiserum were injected intracutaneously into the shaved back of five Sprague Dawley rats. Twenty four hours later, 1.0ml of 0.15% Evans blue solution containing 10mg of DES or MES was injected intravenously into each rat. These rats were sacrificed 30 min later and determined PCA titers.

を測定した。それによると OA と OM の両者に最も高い抗原性があったこと、およびコンアルブミンにも強い反応性を示したと報告している。さらに、Langeland¹⁴⁾や Anet²¹⁾も OA, OM およびコンアルブミンの抗原性が高かったと報告している。一方、卵白以外すなわち卵黄の中のタンパク質にも抗原性を有するものがあると Anet²¹⁾や Langeland²²⁾は報告している。このようにアレルギーの原因となるタンパク質は卵白のみではなく卵黄にも存在することから、OA および OM などの主要原因物質の個々の抗原性を低下させることだけでは利用範囲が狭くなると思われる。そこで著者らは卵全体すなわち全卵の抗原性を低下させることを試みた。実験をする前に卵の抗原性をどの

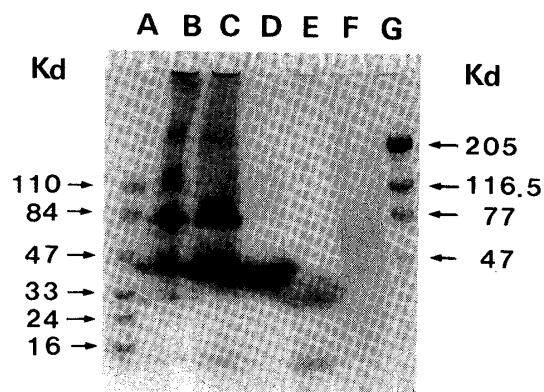


Fig. 8. Estimation of molecular weight of MES by SDS-PAGE stained with CBB. 100 μ g of DES (Lane B), dried egg weight (Lane C), and MES (Lane F), and 10 μ g of OA (Lane D) and OM (Lane E) were applied a well. Lane A and Lane G were used standard marker of BIO RAD.

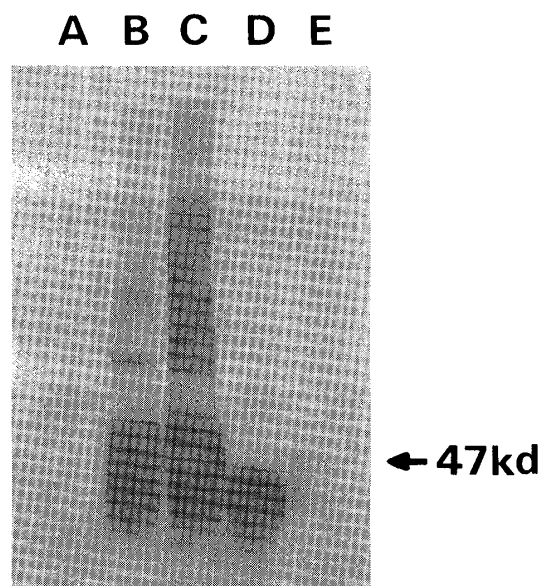


Fig. 9. Detection of antigenic activity of MES by Western blotting. First antibody and second antibody were rabbit anti egg white and goat anti rabbit IgG conjugated with peroxidase, respectively. Lane A; MES, Lane B; DES, Lane C; OA, Lane D; OM, Lane E; marker.

程度まで低下させればアレルギー患者にとって安全であるかという問題がある。この問題に対して、患者の卵に対する感受性が一様でないため具体的な数値を伴う定説はないが、本実験の一応の目標として、抗原性が1000分の1以下となるようにした。

まず最初の食品としての安全性を考慮し、物理的な

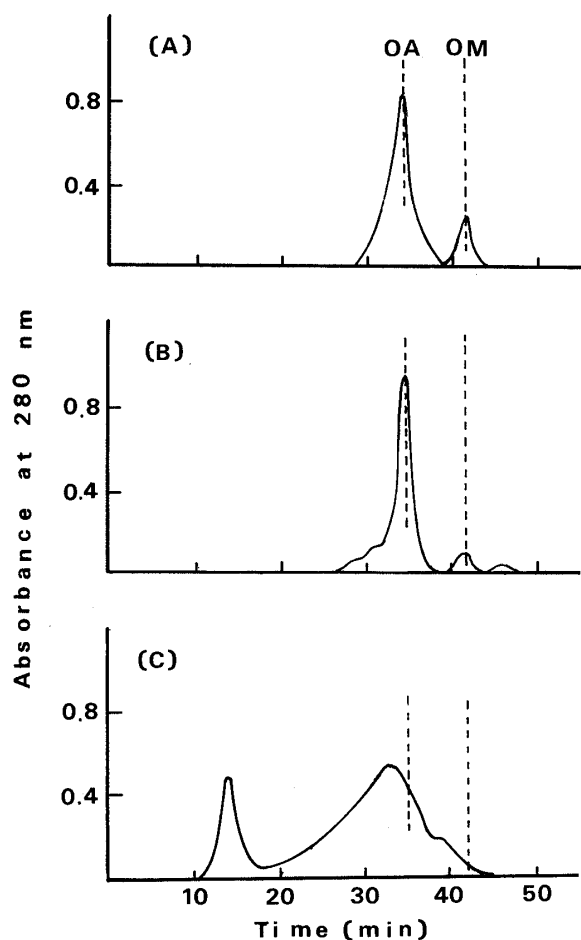


Fig. 10. Gel filtration pattern of OA (A), OM (A), DES (B) and MES (C) on Superose™6 column. Dotted lines in figure indicate retention time of OA and OM.

方法すなわち高温加熱処理 (Fig. 1) や超高压処理 (未発表) などを試みた。それらの中でわずかであるが抗原性に低下が認められたものもあったが十分といえるものは得られなかった。また、かなり抗原性が低下し

たものであっても、色調や味の面で食品として許容できるものではなかった。食品の加熱殺菌処理では一般に120℃で40分間も加熱することはほとんどなく、抗原性を消失させるだけの目的でこれ以上に厳しい条件を施すことは品質を損なうことになる。しかもこの処理方法では抗原性を完全に消失させることは難しいと考えられた。このようなことから、加熱処理などの物理的な方法だけでは抗原性を低下させるのに限界があると考えられたので、サクシニル化やアルカリ処理などの化学的修飾も併用することにした。サクシニル化は化学修飾の中でも比較的穏和な条件で反応し、しかも食品として利用しやすいものである。卵を含めて多くの食品タンパク質は疎水的であり、サクシニル化によりアミノ基は陰イオン性の残基に変化し、その結果陰イオンの同一荷電間の反発作用により分子表面が増加され、水分散性がよくなる。このようなアミノ基の分子表面の増加効果によりアルカリ処理や加熱処理などが容易に進み、抗原基であるエпитープが変化し、抗原性が低下することが考えられる。

大谷ら¹¹⁾は牛乳アレルギーの原因タンパク質の一つである β -lactoglobulinをサクシニル化処理だけ行い、抗原性を大きく低下できたと報告している。全卵 (DES) で同様の処理をした場合、わずかに抗原性の低下は認められたものの目標である1000分の1には及ばなかった。また、アルカリ処理は食品タンパク質を可溶化させる目的でよく使用される。DESをアルカリ処理しただけでも、かなり抗原性の低下が認められたが、サクシニル化処理と同様に1000分の1まで低下するには至らなかった。そこでサクシニル化処理後、アルカリ処理および加熱処理を併用したところ、急激な抗原性の低下がみられた。これらの処理が相乗的に作用し、抗原性を低下させたものと考えられる。Table 1は

Table 1 Comparison of the antigenicity between MES and DES

Method	First antiserum	Second antibody	MES/DES* ¹
Dot blotting	Rabbit anti DES	Anti rabbit IgG	<1/ 1000* ²
Inhibition ELISA	Rabbit anti egg white	Anti rabbit IgGAM	1/19000* ³
Inhibition ELISA	Patient's serum	Anti human IgG	1/ 1350* ³
RAST inhibition	Patient's serum	Anti human IgE	1/ 2000* ³
PCA(IgG)	Rabbit anti DES	—	1/ 5000* ⁴
PCA(IgE)	Mouse anti DES	—	<1/ 200* ⁴

*¹ the antigenic ratio of MES to DES.

*² calculated from density.

*³ calculated from concentration of 50% inhibition.

*⁴ calculated from PCA titer.

MES の抗原性を各種の方法で測定した結果をまとめたものである。抗血清の種類や測定方法で抗原性の低下度に差がみられた。dot blotting 法では測定限界の1000分の1以下まで低下していることがわかった。またPCA (IgE 抗体) 法ではMESを抗原とした場合には全く反応が認められないためDESに対する比較はできないが、この方法を除けば、いずれの測定法においても目標の1000分の1以下まで低下していた。ウサギの抗血清とヒト抗血清を用いた inhibition ELISA でMESの抗原性の低下度におよそ14倍の差がみられた。両者に標識した酵素と基質の違いはあるものの基本的な原理は同じであることから、抗血清の由来による差か、もしくはプレートにコートした抗原の種類によるものと推察される。MESの最終目的は食品としての利用にあるので、ヒトの経口摂取におけるアレルギー反応を抑制できるかどうか最も大きい問題である。この点からヒト抗血清を使用した実験結果、すなわちヒト抗血清を用いた inhibition ELISA および RAST inhibition がよりヒトの生体に近く、信頼度が高いものと思われる。PCA 法では動物の抗血清を使用している点で、この結果を直ちにヒトに置き換えることはできないが、in vivo の実験系であることから無視することはできない。いずれにしてもPCA法を除くどの測定方法においてもほぼ測定限界近くまで抗原性が低下していることから、さらに精度の高い測定方法を用いる必要がある。また、1000分の1以下の抗原性の低下と臨床的なアレルギー反応の誘発能の低下との相関についても今後詳細な検討が必要である。瀬川ら²³⁾はOAを化学修飾し、抗原性を1/16に低下できたと報告している。本実験では抗原性の高いOAおよびOMをそれぞれ単独で処理していないのでOAの抗原性がどの程度低下していたかについて、単純な比較はできないが、Fig. 9で示した、Western blottingの結果でOAに相当するバンドが見当たらないことから、OAの抗原性はほぼ消失しているものと推察される。サクシニル化処理およびアルカリ処理により各種のタンパク質がどのように変化したかを推測するため、SDS-PAGE (Fig. 8) とゲル濾過 (Fig. 10) を行った。しかし、SDS-PAGE では特定のバンドがなく、24~200 kd の範囲にCBBで染色された部分が認められた。またゲル濾過においても同様に各タンパク質の分子量に相当するピークはなく、OAおよびOMを含む大きなピークが認められた。これらのことから化学的な処理により、各タンパク質が凝集と分解をおこしたものと

推察される。しかしながら、今回作成したMESは未知物質であるので、食品としての安全性・栄養素の栄養価およびMES自身の免疫原性を今後詳細に検討する。

稿を終えるにあたり、本研究に御指導を賜った群馬大学医学部小児科黒梅恭芳教授に深謝致します。

文 献

- 1) 井上和子, 住友真佐美, 荒木益雄, 山中栄一, 外丸弘子, 他: 小児気管支喘息の臨床疫学(第I報)大島におけるアレルギー疾患実態調査. アレルギー 32, 138-147, 1983.
- 2) 井上和子, 大谷武司, 荒木益雄, 丹波俊朗, 倉科周介, 他: 小児気管支喘息の臨床疫学(第II報)大島における喘息児の経過調査と家庭内環境調査. アレルギー 34, 1063-1071, 1985.
- 3) 荒井康男, 宮本康文, 松崎 剛, 佐野靖之, 岩崎栄作, 馬場 実: 食物アレルギーの加齢による変遷—成人の食物アレルギーを中心として. アレルギー 39, 243, 1990.
- 4) Matsuda, T., Tsuruta, K., Nakabe, Y. and Nakamura, R.: Reduction of ovomucoid immunogenic activity on peptic fragmentation and heat denaturation. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2237-2241, 1985.
- 5) Fushiki, T., Yamamoto, N. and Iwai, K.: Investigation of digestion and absorption of a dietary protein by using its antigenicity as an index: Gastrointestinal digestion of ovalbumin. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1335-1342, 1985.
- 6) Kaminogawa, S., Hattori, M., Ando, O., Kurisaki, J. and Yamauchi, K.: Preparation of monoclonal antibody against bovine β -lactoglobulin and its unique binding affinity. *Agric. Biol. Chem.* 51, 797-802, 1987.
- 7) Matsuda, T., Kato, Y., Watanabe, K. and Nakamura, R.: Immunochemical properties of proteins glycosylated through Maillard reaction: β -lactoglobulin-lactose and ovalbumin-glucose systems. *J. Food Sci.* 50, 618-621, 1985.
- 8) Usui, M. and Matsushashi, T.: IgE-selective and antigen-specific unresponsiveness in mice. I. Induction of the unresponsiveness by administration of ovalbumin-pullulan conjugate. *J. Immunol.* 122, 1266-1272, 1979.
- 9) Okada, M., Matsushima, A., Katsuhata, A.,

- Aoyama, T., Ando, T. and Inada, Y.: Suppression of IgE antibody response against ovalbumin by the chemical conjugate of ovalbumin with a poly-aspartic acid derivative. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 76, 79-81, 1985.
- 10) 松島瑞子, 八倉隆保, 稲田祐二: 抗原タンパク質の化学修飾. *生化学* 52, 1255-1267, 1980.
 - 11) 大谷 元, 嶋田文三郎: アミノ基の各種修飾 β -ラクトグロブリン血清と抗 β -ラクトグロブリン血清との反応性. *日畜会報* 54, 699-705, 1983.
 - 12) Gu, J., Matsuda, T. and Nakamura, R.: Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. *J. Food Sci.* 51, 1448-1450, 1986.
 - 13) Hoffman, D.R. and Greenville, N.C.: Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 481-486, 1983.
 - 14) Langeland, T. and Harbitz, O.: A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. V. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen's egg white. *Allergy* 38, 131-139, 1983.
 - 15) Heppell, L.M.J., Cant, A.J. and Kilshaw, P.J.: Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment; a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *Br. J. Nutr.* 51, 29-36, 1984.
 - 16) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gel to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 4350-4354, 1979.
 - 17) Heppell, L.M.J.: Determination of milk protein denaturation by an enzyme-linked immunosorbent assay: In "Immunoassays in Food Analysis" (ed. by B.A. Morris and M.N. Clifford), Elsevier Applied Science Publisher, London, pp.115-123, 1985.
 - 18) Gleich, G.J., Larson, J.B., Jones, R.T., Baer, H., Rochester, M. and Rockville, M.: Measurement of the potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in the radio-allergosorbent test. *J. Allergy Clin. Immunol.* 53, 158-169, 1974.
 - 19) Ovary, Z.: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Prog. Allergy* 5, 459-508, 1958.
 - 20) Mota, I. and Wong, D.: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 8, 813-820, 1969.
 - 21) Anet, J., Back, J.F., Baker, R.S., Barnett, R.W., Burley, R.W. and Howden, M.E.H.: Allergens in the white and yolk of hen's egg. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 77, 364-371, 1985.
 - 22) Langeland, T.: A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. III. Allergens in hen's egg white studied by crossed radio-immunoelectrophoresis (CRIE). *Allergy* 37, 521-530, 1982.
 - 23) Segawa, A., Borges, M.S., Yokota, Y., Matsu-shima, A., Inada, Y. and Tada, T.: Suppression of IgE antibody response by the fatty acid-modified antigen. *Int. Allergy Appl. Immunol.* 66, 189-199, 1981.

DEVELOPMENT OF HEN'S EGG WITH LOW ANTIGENICITY FOR ALLERGIC PATIENTS

Michie Hisatomi, Mamoru Kimura, Susumu Inukai and Kazuo Oshida
Basic Research Laboratory Q.P. Corp.

Akihiro Morikawa
Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine

We tried to prepare hen's egg with low antigenicity for allergy patients. First, we examined the effects of pH, heating temperature and time on antigenicity of egg. Dried whole egg solid (DES) was dissolved in the buffer solution adjusted at various pH and heated at 120°C for 10, 20 and 40 min. As a result the antigenicity didn't significantly decrease. Next, DES was treated with succinic anhydride, sodium hydroxide and was heated. The antigenicity of the resultant modified whole egg solid (MES) was much lower than that of heated whole egg solid. Antigenicity was measured precisely by enzyme immunoassay, inhibition ELISA, RAST inhibition and PCA. It was found that the antigenicity of MES was decreased less than 1/1000 of that of DES. Then SDS-polyacryl-amide gel electrophoresis and gel filtration were performed to clarify the degree of the change of egg proteins. The bands and peaks which corresponded to ovalbumin and ovomucoid known to be major allergenic proteins responsible for egg allergy disappeared and new bands and peaks were detected.