調査・資料

調理による卵アレルゲンの変性

（平成23年5月6日受理）

渡邊裕子[1,*] 赤星千絵[2] 関戸晴子[1]
田中幸生[3] 田中和子[4] 下条直樹[5]

Denaturation of Egg Antigens by Cooking

Hiroko Watanabe[1,*], Chie Akaboshi[2], Haruko Sekido[1],
Kouki Tanaka[3], Kazuko Tanaka[4] and Naoki Shimojo[5]

[1]Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health: 1–3–1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253–0087, Japan;
[2]Kawasaki City Institute for Public Health: 5–13–10 Ohshima, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210–0834, Japan;
[3](Former profession) Kawasaki City Institute for Public Health: 5–13–10 Ohshima, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210–0834, Japan;
[4]Department of Allergy & Immunology National Research Institute for Child Health and Development: 2–10–1 Ohkura, Setagaya-ku, Tokyo 157–853, Japan;
[5]Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University: 1–8–1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260–8670, Japan;
* Corresponding author

Changes in egg protein contents by cooking were measured with an ELISA kit using Tris–HCl buffer in model foods including cake, meatballs, pasta and pudding made with whole egg, egg-white and egg-yolk. The egg protein contents were lowest in the deep-fried model foods of cakes and meatballs. Ovalbumin (OVA) was undetectable (＜1 μg/g) and ovomucoid (OVM) was lowest in pouched meatballs, suggesting that processing temperature and uniform heat-treatment affect the detection of egg protein. Furthermore, egg protein contents were below 6 μg/g in the pouched meatballs and pasta made with egg-yolk, and OVA and OVM were not detected by Western blotting analysis with human IgE from patients' serum. On the other hand, processed egg proteins were detected with an ELISA kit using a surfactant and reductant in the extract buffer.

(Received May 6, 2011)

Key words: 調理cooking; 卵タンパク質egg protein; オボアルブミンovalbumin; オボムコイドovomucoid; 酵素免疫測定法ELISA method; ウエスタンブロット法Western blotting; ウサギIgG抗体rabbit IgG antibody; ヒトIgE抗体human IgE antibody

緒　　言

食品のアレルギー表示制度では，平成13年に特定原材料5品目（卵・乳・小麦・そば・落花生）の表示が義務化され，表示の判断を行うための科学的根拠として，平成14年に加工食品中の特定原材料を検出するための検査法が提示された．市販食品の検査が進められた結果，スクリーニング法であるELISA法では，加工処理によってタンパク質の変性が起こり，偽陰性（特定原材料を使用しているが検出値が極めて低くなり陰性となること）となる食品が見られたため[1]，平成17年に変性タンパク質の検出に対応した可溶化剤を用いた方法[2]に改訂された．

一方，食物アレルギー疾患では，アレルギー原因物質が含まれていても，調理・加工により摂取可能な場合があることが現象として知られている．また，食物アレルギー研究から，卵に対する特異的IgE抗体価が高い患者でも，経口負荷試験においてアレルギー症状が誘発されない場合が報告され[3),4)]，その要因の1つとしてアレルゲンタンパク

* 連絡先　Watanabe.jnsd@pref.kanagawa.jp
[1] 神奈川県衛生研究所理化学部：〒253–0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1–3–1
[2] 川崎市衛生研究所：〒210–0834 川崎市川崎区大島5–13–10
[3] (前職) 川崎市衛生研究所：〒210–0834 川崎市川崎区大島5–13–10
[4] 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部：〒157–8535 東京都世田谷区大蔵2–10–1
[5] 千葉大学大学院医学研究院小児病態学：〒260–8670 千葉市中央区亥鼻1–8–1

質の変性による抗体との結合能の低下が示唆されている．しかし，加工処理による食品中のアレルゲンの変性や変性を受けることにより起こる，抗体との結合能の変化について，日常の調理条件で検討した例は少ない．

そこで，本研究では6歳以下の食物アレルギー原因物質の第1位であり[4]，加熱処理によりアレルギー患者が摂取可能となるケースが多い卵[5]について，調理による食品中の卵アレルゲンタンパク質の変性と変性を受けることによる，抗体との結合能の変化について検討した．調理方法として，卵は，卵白，卵黄のみを用いる場合もあることから，全卵，卵白，卵黄に分けたモデル食品を作製した．主に未変性卵タンパク質を対象とした，平成14年採用のトリス塩酸緩衝液を抽出液に用いた旧検査法により[2]，卵タンパク質量の変化を測定した．また，卵黄使用のモデル食品および卵黄使用の市販食品では，卵白に対するアレルギー患者において低アレルゲン化を目的として卵白を除去した調理方法の利用があることから，未変性オボアルブミン（OVA）・オボムコイド（OVM）が残存しているか，ウサギIgG抗体および卵白への反応性がある卵アレルギー患者血清中のIgE抗体によるウエスタンブロット（WB）法で検出した．さらに，調理による卵タンパク質の変性状態を把握するため，変性タンパク質を対象とし，可溶化剤を用いた改訂後の検査法で定量，定性を行った．

方　　法

1. 食品試料

食品試料は，自家調製したモデル食品および市販食品を用いた．モデル食品は菓子，肉団子，パスタを全卵，卵白，卵黄に分けて調製し，プリンは全卵を用いた（33サンプル）．卵白，卵黄の分離は卵黄分離器で行い，メッシュ（1 mm）でこした．調理後の重量変化を調理前の重量を1としてTable 1に示し，データは重量変化を換算して示した．市販食品は卵黄使用の9サンプル（チョコレートラスク，ボーロ，クラッカー，ケーキ，マヨネーズ，しゅうまい，レトルトクリームソース，レトルトカルボナーラソース，缶詰カルボナーラソース）を用いた．

モデル菓子の調製方法

小麦粉300 g, バター180 g, 卵300 g, 砂糖200 g, ベーキングパウダー10 gの割合で作製し，各サンプルごとに耐熱性カップに採取した．焼サンプル（35 g）はオーブン（180℃ , 20分間）で焼いた．揚サンプル（30 g）はサラダ油（700 g）で揚げ（160 ℃ , 3.5分間；実測値160～180℃），蒸サンプル（35 g）は蒸し器で蒸した（13分間；実測値90.0～100.0℃）．レンジサンプル（35 g）は電子レンジ（500 W, 4分間）で加熱した（全卵のみ）．

モデル肉団子の調製方法

牛豚合挽き肉500 g，タマネギ300 g，パン粉75 g，牛乳75 g，卵100 g，塩10 g，コショウ10 gの割合で作製した．焼サンプル（50 g）は小判状（厚さ1.5 cm×長さ7 cm）にし，オーブン（200℃ , 4分間）で両面を焼いた．揚サンプル（50 g）も焼サンプルと同様に小判状にし，サラダ油（700 g）で揚げた（160℃ , 6分間；実測値160～180℃）．煮サンプル（100 g）は棒状（直径3 cm）にラップ包装し，沸騰したお湯（10分間；実測値99.5～100℃）で煮た．レトルトサンプルは市販加工食品を参考とし[1]，煮サンプルをオートクレーブ（124℃ , 40分間）で加圧加熱した．煮サンプル，レトルトサンプルはともに肉汁を含めてサンプルを調製した．

モデルパスタの調製方法

強力粉200 g, 卵100 g, オリーブオイル10 g, 塩5 gの割合で作製した．なお，卵黄使用では精製水を10 mL添加し調製した．ゆでサンプル（80 g）は生地（厚さ2 mm, 幅3 mm）を沸騰したお湯1 L（10分間；実測値99.5～100.5℃）でゆでた．

モデルプリンの調製方法

牛乳200 g，砂糖30 g，全卵120 gの割合で作製した．蒸焼サンプル（60 g）はアルミカップに取り，オーブントレーに水をはり，蒸し焼き（150℃ , 35分間）にした．

2. 試薬等

卵タンパク質量の測定には，森永生科学研究所製モリナガOVAキット（以下OVAキット），モリナガOVMキット（以下OVMキット），モリナガFASPEK OVAキット（以下FASPEK OVAキット），日本ハム製FASTKIT™卵エライザキット（以下卵キット），FASTKITエライザVer. II卵キット（以下Ver. II卵キット）を用いた．

OVA, OVMキットおよび卵キットは120 mMトリス塩酸に0.1%の牛血清アルブミンと0.05% Tween 20を添加した抽出液を用いた系である[2]．一方，FASPEK OVAキットおよびVer. II卵キットはOVAキットなどの抽出液に1%のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）と7%の2-メルカプトエタノール（2-ME）を添加した，可溶化剤を用いた系であり，さらにSDS処理した卵タンパク質に対するポリクローナル抗体を用いた系である[2]．なお，OVA, OVM, FASPEK OVAキットは，各タンパク質に対するポリクローナル抗体を用い，標準曲線の範囲は1～64 ng/mL（OVA, OVMキット）および0.78～50 ng/mL（FASPEK OVAキット）となっている[2,6]．また，卵キットおよびVer. II卵キットは卵タンパク質（OVA, OVM, オボトランスフェリン，リゾチームなど）および加熱変性した同卵タンパク質（60～120℃処理）に対するポリクローナル抗体を用い[7]，標準曲線の範囲は1～100 ng/mL（卵キット）および0.78～50 ng/mL（Ver. II卵キット）である．

ウサギIgGポリクローナル抗体を用いたWB法は（株）森永生科学研究所製モリナガ卵WBキット（OVA）および同（OVM）とELISAと同様に抽出液に可溶化剤および2-MEを用いた系であるモリナガFASPEK卵WBキット（OVA）および同（OVM）を用いた．感度の確認として，キット付属の卵標準品0.5 μg/mLを用いた．その他の試薬については，既報[1,8]と同様のものを用いた．

Table 1. Changes of egg protein contents in model foods

Model foods	Egg material	Cooking processing	Weight ratio (raw weight as 1)	ELISA* (μg/g)		
				OVA kit	OVM kit	Egg kit
Cake	Whole egg	Raw	1.00	140,000	95,000	72,000
		Baked	0.80	713	175	288
		Fried	1.19	3	56	30
		Steamed	1.07	5	309	80
		Microwaved	0.73	24,658	20,548	425
	Egg-white	Raw	1.00	144,000	108,000	76,000
		Baked	0.82	1,037	171	451
		Fried	1.14	1	70	21
		Steamed	1.11	7	1,802	667
	Egg-yolk	Raw	1.00	5,300	2,900	5,000
		Baked	0.85	16	14	10
		Fried	1.09	9	17	6
		Steamed	1.04	10	13	24
Meatball	Whole egg	Raw	1.00	28,000	31,000	21,000
		Baked	0.56	20	15,179	2,500
		Fried	0.35	7	10,286	1,543
		Boiled	1.00	160	9,300	1,800
		Retort packing	1.00	<1	260	100
	Egg-white	Raw	1.00	36,000	24,000	23,000
		Baked	0.59	9	16,271	3,051
		Fried	0.35	9	3,714	2,514
		Boiled	1.00	280	13,000	3,000
		Retort packing	1.00	<1	260	120
	Egg-yolk	Raw	1.00	1,500	1,100	1,800
		Baked	0.58	8	63	108
		Fried	0.38	<1	62	56
		Boiled	1.00	10	45	75
		Retort packing	1.00	<1	5	6
Pasta	Whole egg	Raw	1.00	130,000	99,000	63,000
		Boiled	1.74	1	5,230	80
	Egg-white	Raw	1.00	150,000	130,000	83,000
		Boiled	1.56	43	1,538	897
	Egg-yolk	Raw	1.00	5,100	2,800	4,700
		Boiled	1.79	<1	1	1
Pudding	Whole egg	Raw	1.00	160,000	150,000	51,000
		Steam-baked	0.98	79	54,082	7,959

These data are averages of two ELISA determinations (3 wells each).
*: Data were converted by weight ratio.
OVA: ovalbumin. OVM: ovomucoid

患者血清を用いたWB法では研究への使用に同意の得られた卵白への反応性がある卵アレルギー患者19名(Immuno-CAP法にて卵白に対しクラス5以上およびOVMに対しクラス4以上)のプール血清を用い，感度の確認として，モリナガ卵WBキット付属の卵標準品1μg/mLを用いた．また，アトー(株)製e・パジェル5–20%ポリアクリルアミドゲルE-T520L，SIGMA社製ヒト血清アルブミン，BIO SOURCE社製アルカリフォスファターゼ(Al-p)標識α-human IgE，プロメガ社製ニトルブルーテトラゾリウム/ブロモクロロインドリルりん酸(NBT/BCIP)および超純水を用いた．

3. 機器および測定条件

使用機器および測定条件は既法[1]と同様に行った．

4. 抽出溶液の調製

ELISAおよびWB法はキット付属のプロトコールに従い，抽出溶液を調製した．

5. ELISAおよびウエスタンブロット法

ELISAおよびウサギIgG抗体を用いたWB法は既報[1), 8)]に従い行った．患者血清を用いたWB法はLaemmliの方法[9)]により，SDS-PAGEを行い，PVDF膜にタンパク質を転写後，0.1%ヒト血清アルブミンでブロッキング(室温，2時間反応)し，患者プール血清(10倍希釈，4℃，一晩

Table 2. Detection of egg proteins in model foods and commercial foods made with egg-yolk

No.		Foods	Egg material	ELISA (μg/g)				Western blotting		
				OVA kit	Egg kit	FASPEK OVA kit	Ver. II egg kit	Rabbit IgG kit (OVA/OVM)	Human IgE (OVA/OVM)	Rabbit IgG FASPEK kit (OVA/OVM)
1	Model foods	Cake (baked)	Egg-yolk	13.7	8.2	20.0<	20.0<	+/+	−/+	nt
2		Cake (fried)	Egg-yolk	9.5	7.4	20.0<	20.0<	+/+	−/+	nt
3		Cake (steamed)	Egg-yolk	10.1	20.0<	20.0<	20.0<	+/+	−/+	nt
4		Meatball (baked)	Egg-yolk	4.6	20.0<	20.0<	20.0<	+/+	−/+	nt
5		Meatball (fried)	Egg-yolk	<0.4	20.0<	20.0<	20.0<	±/+	−/+	nt
6		Meatball (boiled)	Egg-yolk	10.3	20.0<	20.0<	20.0<	+/+	−/+	nt
7		Meatball (retort packing)	Egg-yolk	<0.4	6.1	9.2	20.0<	−/−	−/−	−/+
8		Pasta (boiled)	Egg-yolk	0.6	1.6	20.0<	20.0<	+/+	−/−	+/+
9	Commercial foods	Chocolate rusk	Egg-yolk	<0.4	<0.5	1.4	<1.0	−/−	−/−	−/+
10		Egg Portuguese cookie	Egg-yolk, Testa calcium	25.6<	20.0<	20.0<	20.0<	nt	nt	nt
11		Cracker	Egg-yolk	<0.4	1.4	<1.0	1.1	−/+	−/−	−/−
12		Cake	Egg-yolk	25.6<	20.0<	20.0<	20.0<	nt	nt	nt
13		Mayonnaise	Egg-yolk	25.6<	20.0<	20.0<	20.0<	nt	nt	nt
14		Chinese steamed meat dumpling	Egg-yolk	<0.4	<0.5	12.1	14.1	−/+	−/−	+/+
15		Cream sauce (retort packing)	Egg-yolk	<0.4	1.8	3.3	7.4	−/+	−/−	±/±
16		Carbonara sauce (retort packing)	Egg-yolk	<0.4	20.0<	20.0<	20.0<	nt	nt	nt
17		Canned carbonara sauce	Egg-yolk	<0.4	20.0<	20.0<	20.0<	nt	nt	nt

These data are averages of two ELISA daterminations (3 wells each).
OVA: ovalbumin, OVM: ovomucoid, +: detected, −: not detected, ±: trace, nt: not tested

反応）およびAl-p標識α-human IgE（3,000倍希釈，室温，2時間反応）と反応させた後，NBT/BCIPを用いて発色した．

ヒト血清を用いて行った研究については，千葉大学医学研究院および神奈川県衛生研究所倫理委員会にて審査，承認され，ヘルシンキ宣言の倫理基準および国が定める研究指針に従って行われた．

結果および考察

1. 調理によるOVA, OVM, 卵キット検出量の変化

卵を除く各モデル食品の生地を卵キットで測定した結果，肉団子は1μg/g検出された．これは，精肉による偽陽性であったが，Ver. II卵キットにおいては改良されている[8]．その他は検出限界以下（<1μg/g）であった．調理による卵タンパク質量の変化を3種類のELISAキットで測定した結果を表1に示した．

全卵を使用した場合の菓子の生地では，OVAキット量が最も高く，次いでOVMキット，卵キットとなり，いずれのモデル食品および卵白使用においても，ほぼ同様の結果となった．卵を卵殻部，卵白部，卵黄部に分けた場合，それぞれが約10%，60%，30%を占め[10]，卵白タンパク質に占めるOVAおよびOVMの割合はそれぞれ54%, 11%であることから[11]，OVAキットおよびOVMキットは，卵タンパク質の主要なアレルゲンを対象としている．また，卵キットは，OVA, OVM, オボトランスフェリン，リゾチームなどを対象とし，未変性卵タンパク質と加熱変性卵タンパク質を対象としたELISA系である[7]．

卵黄使用では卵黄分離器により分離したものを用いていることから，卵黄の周辺に卵白が残存し，卵白タンパク質の混入が考えられる．菓子の卵黄使用では，生地中に卵白タンパク質であるOVA，OVMがそれぞれ全卵使用の約1/26，1/33量と混入していた．また，卵キットは卵白のみでなく卵黄中のタンパク質に対する抗体も含む系であるが，その定量値はOVAキットと同様な値を示したことか

ら，卵黄タンパク質に対する反応の割合は低いことが示唆された．変性剤を用いて改良したVer. II卵キットの検出特性においても，卵黄タンパク質の検出力が極めて低かったことが報告されていることから[12]，同様な抗体による検出系である卵キットにおいても卵黄タンパク質の検出力は低いと考えられた．

1） モデル菓子

モデル菓子生地中の卵の割合は約30％（w/w）であり，調理後の重量変化は電子レンジ調理で約3割減少し，その他はほぼ1～2割の増減となった．

全卵を使用した菓子の調理による変化では，いずれのキットも揚調理が最も低下し，電子レンジ調理が高い値となった．OVAキットは揚調理に次いで蒸調理，焼調理，電子レンジ調理の順となった．調理条件では，焼調理（180℃ 20分間）に比べ，蒸調理（100℃ 13分間），揚調理（160℃ 3.5分間）の加熱温度が低いにもかかわらず，蒸調理と揚調理では5 μg/g以下に大きく低下した．OVAは95℃ 5分間で完全に三次構造が変化することが報告されていることから[13]，加熱変性にはいずれの調理法も十分な条件と考えられた．このことから，各調理における加熱状態を比較すると，焼調理ではオーブン中の空気を媒体とした加熱であるのに対し，蒸調理は蒸気を媒体とし，揚調理では油を媒体とした調理であることから，蒸調理および揚調理では食品全体が効率良く加熱調理され，OVAが変性したと考えられた．

また，食品中の成分による影響として，小麦を使用した麺類では，加熱処理によりグルテンとOVMのスルフヒドリル基が結合し，不溶化が起こることが報告されている[14]．OVMは，100℃ 120分間の処理ではほとんど変性しないことが報告され[15]，OVAに比べ熱耐性があることが知られている．しかし，いずれの調理においてもOVMキットの定量値は大きく低下した．ゆえに，調理によるOVMキットの低下は，菓子中の成分として約30％（w/w）含まれる小麦粉中のグルテンとの結合による不溶化と考えられた．さらに，この現象は，OVAにおいてもフリーのスルフヒドリル基が同様に存在することから，OVAもグルテンとの結合による不溶化が起こっていると考えられた．一方，OVMキットの調理による定量値の低下は，揚調理に次いで焼調理，蒸調理，電子レンジ調理の順となり，加熱温度に比例した．

卵キットは，電子レンジ調理以外はOVMキットとほぼ同様な低下を示し，加熱変性したタンパク質を対象とした系ではあるが，OVA, OVMキットと比べ調理後の定量値に大きな違いは見られなかった．一方，電子レンジ調理では，その定量値がOVA, OVMキットに比べ大きく減少した．これは卵キットのみが対象としているオボトランスフェリン，リゾチームなどの卵タンパク質が電子レンジ調理では変性しやすいと推察された．

卵白を使用した菓子の調理による変化は，OVAキットでは全卵使用とほぼ同様な結果となり，揚調理，蒸調理では10 μg/g以下となった．OVMキットおよび卵キットでは，蒸調理で全卵使用より高い値を示した．これは，検出系に用いたOVAとOVMとの熱耐性の差によると考えられた．

卵黄を使用した場合では，全ての調理法において，いずれのキットの定量値も同様に低下した．卵黄使用による卵白タンパク質の絶対量の低下により，ほとんどの卵白タンパク質が変性したと考えられた．卵キットでは，卵黄タンパク質も対象とした抗体を用いているが，卵黄タンパク質の検出についてのデータはほとんどないため，定量値と卵黄タンパク質量との関係は不明である．

以上の結果から，モデル菓子の調理では，揚調理の定量値がいずれのキットにおいても最も低くなった．また，菓子成分である小麦中のグルテンとOVMとの結合による不溶化の影響により，OVMキットの検出値は，大きく減少したものの，菓子中の卵タンパク質の検出には，熱耐性のあるOVMを対象としたキットが最も適していた．

2） モデル肉団子

モデル肉団子生地中の卵の割合は約9％（w/w）であり，調理による重量変化は焼調理で約4割，揚調理で約6割に減少した．

全卵を使用した肉団子の調理による変化では，OVAキットは揚調理が7 μg/gと最も低くなり，次いで焼調理，煮調理となった．さらに煮調理後のレトルト処理では，検出限界以下となった．焼調理（200℃ 8分間）と揚調理（160℃ 6分間）の加熱温度との逆転は，菓子のOVAと同様に焼調理における加熱の不均一が要因と考えられた．煮調理では，加熱温度は100℃でOVAの変性には十分な温度であり，水を媒体として加熱が均一に行われると考えられたが，160 μg/gとなった．ゆえに肉団子の煮調理では，サンプルの中心への熱伝導に時間がかかったものと考えられ，調理時間との関係についても検討する必要があると考えられた．

OVMキットは，調理による検出値の低下が約1/3～1/2と少なく，レトルト処理後も260 μg/g検出された．また，卵キットもOVAキットに比べ，定量値の低下は少なく，約1/13～1/10となり，OVMキットに比べ低下したが，レトルト処理後も100 μg/g検出された．肉製品では，115℃で高温殺菌した豚肉ペースト中の卵白アレルゲンをPBSで抽出し，卵白に対するウサギIgG抗体を用いたELISA法で検出可能であることが報告されている[16]．このことから，肉団子などの調理においても，OVMおよびOVMを含む卵タンパク質を対象とした検出系が，加熱処理後の卵タンパク質の検出に適していると考えられた．

卵白を使用した肉団子の調理では，OVMキットは揚調理で約1/6に減少した以外は，全卵使用と同様な結果を示した．すなわち，OVAキットは調理により定量値が大きく減少したが，OVM, 卵キットの減少の幅は小さかった．

卵黄を使用した肉団子の調理では，OVAキットはいずれも10 μg/g以下となり，揚調理およびレトルト処理で検

出限界以下となった．OVM, 卵キットは同様に低下し，レトルト処理後もそれぞれ5 μg/g, 6 μg/gを検出した．

以上の結果から，肉団子では調理後のレトルト処理でいずれのキットの定量値も最も低くなり，OVAキットでは検出限界以下となった．一方，OVMキットと卵キットは，調理後の定量値の低下が少なかったことから，卵タンパク質の検出に適していると考えられた．

3） モデルパスタおよびプリン

モデルパスタ生地中の卵の割合は約31％（w/w）であり，ゆで後の重量変化は6～8割の増加となった．

パスタをゆでたとき（80 g/L）のゆで汁への卵タンパク質の移行は，全卵，卵白，卵黄使用でそれぞれOVAキット260 μg/L, 230 μg/L, 25 μg/L, 卵キット4,200 μg/L, 8,900 μg/L, 690 μg/Lとなり，その移行は全卵使用のパスタのOVAキットでは0.003％，卵キットでは0.08％と低かった．

全卵使用のパスタでは，ゆで後，OVAキットは1 μg/gに減少した．Neogen社製のVeratox egg allergen kitを用い，全卵粉を添加したゆでパスタからの卵タンパク質の測定結果[17]と比較すると，調理後の定量値の低下はOVAキットの結果と同等であった．OVMキットおよび卵キットでは，ゆで後，肉団子の煮調理に比べ，大きく減少し，卵白使用においても，同様の結果となった．さらに，生地の卵タンパク質量が全卵・卵白使用の1/10以下となった卵黄使用のパスタでは，ゆで後，いずれのキットも1 μg/g以下となった．未変性の全卵とOVAおよび10分間固ゆでした全卵と卵白に対するウサギIgG抗体を用いたELISA系で測定したゆでパスタにおいても，卵タンパク質量が大きく低下しており[18]，調理後のパスタにおける卵タンパク質量の低下は，加熱によるグルテンとOVAおよびOVMとの結合による不溶化と考えられた[14]．

モデルプリン生地中の卵の割合は約34％（w/w）であり，蒸焼プリンの調理後の重量変化はほとんどなく，調理後の卵タンパク質量は，OVAキットでは79 μg/gと約1/2,000に減少したが，OVMキットおよび卵キットの減少は約1/3, 1/6となり，蒸焼き後もOVMのほとんどが未変性のままであったと考えられた．

2. 卵黄使用のモデル食品および市販食品からの卵タンパク質の検出

卵白に対するアレルギー患者において低アレルゲン化を目的として卵白を除去した調理方法の利用があることから，卵黄使用モデル食品および卵黄使用のみの市販食品について，未変性卵白タンパク質がどの程度含まれているのか定量し，ウサギIgG抗体および卵白への反応性がある卵アレルギー患者血清中のIgE抗体によるWB法で検出し，さらに加熱変性した卵白についても定量，定性を行った．

1） OVA, 卵キットによる定量

卵黄分離器で分離した卵黄を使用したモデル食品では全卵使用に比べ，OVA, 卵キットいずれも定量値は約1/10となり，調理後の卵タンパク質量は大きく低下した．

一方，表示から卵黄が主な原材料と考えられるボーロ（No. 10），ケーキ（No. 12），マヨネーズ（No. 13），レトルトカルボナーラソース（No. 16），缶詰カルボナーラソース（No. 17）の5つの市販食品では，OVAまたは卵キットで定量範囲以上（20 μg/g＜）となり，モデル食品と同様に卵黄使用のみの表示で卵白タンパク質が多く混入していた．その他4つの食品は数 μg/g以下となり，コンタミネーション程度であった．

2） ウサギIgG抗体および患者血清中IgE抗体による定性

生サンプルではSDS-PAGEにおける見かけ上の分子量として，OVAが約50 kDa, OVMが約38 kDa付近にウサギIgG抗体およびヒトIgE抗体との結合バンドが認められた．ウサギIgG抗体では，モデル菓子と肉団子の焼，煮調理でOVA, OVMが確認された．肉団子の揚調理ではOVMのバンドは検出されたが，OVAは痕跡程度となった．また，煮後のレトルト処理では，いずれのバンドも検出されなかった．ヒトIgE抗体では，モデル菓子と肉団子調理のいずれにおいてもOVMのバンドが検出されたが，肉団子のレトルト処理後では，OVMのバンドは不検出となった．

市販食品では，定量値の低かったチョコレートラスク，クラッカー，しゅうまい，レトルトクリームソース（No. 15）について検討した．ウサギIgG抗体による検出では，クラッカー，しゅうまい，レトルトクリームソースはOVMのバンドが認められ，卵キットの定量値が低くてもOVMは検出された．チョコレートラスクは，OVA, OVMのいずれのバンドも不検出となった．また，ヒトIgE抗体との結合バンドは，いずれの市販食品においても認められなかった．

ゆえにウサギIgG抗体およびヒトIgE抗体による検出では，OVAに比べOVMの検出率が高く，OVA, OVMはいずれもIgE抗体に比べIgG抗体による検出率が高かった．115℃ 90分間処理したブタ肉ペーストでは，卵白に対するウサギIgG抗体により，OVA, OVMがいずれも検出されたが，患者血清中のIgE抗体では検出されなかったことが報告されている[16]．また，100℃ 3分間処理したOVAおよびOVMに対するウサギIgG抗体の結合能は，それぞれ65％, 104％ととなり，患者IgE抗体では10％, 94％となったことから，OVAに対する患者IgE抗体はその高次構造よりなる抗原決定基を認識することが示唆され，OVMはさらにSDSや酸による変性によっても，その結合能が保たれていることが報告されている[19]．さらに，円偏光二色性スペクトルによる解析において，α-ヘリックスを含む二次構造が，OVMでは加熱処理後も保たれていることが報告されていることから[20]，加熱変性したOVAの検出にはIgG抗体が適し，OVMはいずれの抗体もほぼ同等に検出可能であると考えられた．今後この結果を踏まえ，加工食品中のOVAおよびOVMの検出について評価を行う必要があると考えられた．

3) 可溶化剤を用いた定量・定性

モデル食品では，肉団子のレトルト処理でFASPEK OVAキット検出量が検出限界以下から9.2 μg/gとなり，その他のモデル食品についても20.0 μg/g以上に検出値が上がった．ゆえにFASPEK OVAキットでは，SDSおよび2-MEを添加した抽出液で可溶化したOVAにより検出値が上がった．また，市販食品についてもチョコレートラスク，クラッカー，レトルトクリームソース以外は10 μg/g以上と検出値が上がり，Ver. II卵キットにおいても同様な結果となった．これらの食品については，食品成分中の卵黄の割合が高く，卵白の混入量も多いことが推察された．一方，肉団子レトルト処理では生地でのOVAキット量は1,500 μg/gであり，またWBにおけるFASPEKキットにおいて，OVAのバンドが確認されなかったことから，レトルト処理によりOVAが低分子化されたと考えられた[21]．

以上の結果から，トリス塩酸緩衝液を抽出液に用いたOVA，OVM，卵キットによる卵タンパク質量の測定では，調理により定量値が最も低下したのは，モデル菓子では揚調理，モデル肉団子ではレトルト処理であった．ゆえに，調理条件として加熱温度や時間とともに加熱処理を均一に行った場合に，食品中の卵タンパク質が効率的に変性すると考えられた．特に菓子の蒸調理におけるOVA量の低下が顕著であった．また，小麦粉を用いた調理の場合は，小麦中のグルテンとの反応により，不溶化が起こり，OVA, OVMの定量値が顕著に減少した．一方，調理食品の卵使用を検出するためのキットとして，OVA, OVM, 卵キットのうち，熱耐性のあるOVMを対象としたOVMキットが最も適していた．これらの食品中の卵タンパク質をSDSで可溶化した抽出液を用いたELISAキットで測定した結果，検出値が上がり加熱変性したタンパク質が検出された．

謝　　辞

本研究の一部は財団法人旗影会の研究助成事業により実施した．

文　　献

1) Watanabe, H., Kai, S., Mitani, T., Yokoyama, H., Kishi, M. Study on detection of allergic substances (egg and milk) in processed meat products and frozen foods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **46**, 139–147 (2005).
2) Watanabe, Y. *et al.* Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. J. Immunol. Methods, **300**, 115–123 (2005).
3) Ogura, Y., Ogura, H., Zushi, N., Morita, H., Kurashige T. The usefulness and limitations of the radioallergosorbent test in diagnosing food allergy in atopic dermatitis. Arerugi, **42**, 748–756 (1993).
4) Ebisawa, M. Managemant of food allergy. Arerugi, **55**, 107–114 (2006).
5) Lemon-Mule, H. *et al.* Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. J. Allergy Clin. Immunol., **122**, 977–983 (2008).
6) Mamegoshi, S. Detection methods for allergic substances in foods by enzyme linked immunosorbent assay (2). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J277–J279 (2002).
7) Takahata, Y. Detection methods for allergic substances in foods by enzyme linked immunosorbent assay (1). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J275–J277 (2002).
8) Watanabe, H. *et al.* Comparison between old and new methods for detection of allergenic substances (egg and Milk). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **52**, 71–77 (2011).
9) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680–685 (1970).
10) 加藤丈雄．“第1章　卵の構造”．食品の科学–卵の科学，中村　良編，東京，朝倉書店，2001，p. 1–9．(ISBN 4–254–43071–X)
11) 中村　良．“第2章　卵の成分”．食品の科学–卵の科学，中村　良編，東京，朝倉書店，2001，p. 9–29．(ISBN 4–254–43071-X)．
12) Muto, T. *et al.* Improved capability of a revised test kit, FASTKIT ELISA version II (egg), to detect heated proteins of egg white but not egg yolk. Arerugi, **58**, 1544–1547 (2009).
13) Rumbo, M. *et al.* Analysis of structural properties and immunochemical reactivity of heat-treated ovalbumin. J. Agric. Food Chem., **44**, 3793–3798 (1996).
14) Kato, Y., Oozawa, E., Matsuda, T. Decrease in antigenic and allergenic potentials of ovomucoid by heating in the presence of wheat flour; Dependence on wheat variety and intermolecular disulfide bridges. J. Agric. Food Chem., **49**, 3661–3665 (2001).
15) Matsuda, T., Watanabe, K., Nakamura, R. Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. Biochim. Biophys. Acta, **707**, 121–128 (1982).
16) Leduc, V., Demeulemester, C., Polack, B., Guizard, C., Le Guern, L., Peltre, G. Immunochemical detection of egg-white antigens and allergens in meat products. Allergy, **54**, 464–472 (1999).
17) Williams, K. M., Westphal C. D. Determination of egg proteins in snack food and noodles. J. AOAC Int., **87**, 1485–1491 (2004).
18) Yeug, J. M. Determination of egg proteins in food products by enzyme immunoassay. J. AOAC Int., **83**, 139–143 (2000).
19) Honma, K. *et al.* Antigenic determinants on ovalbumin and ovomucoid; Comparison of the specificity of IgG and IgE antibodies. Arerugi, **40**, 1167–1175 (1991).
20) Mine, Y., Zhang, J. W. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. J. Agric. Food Chem., **50**, 2679–2683 (2002).
21) Honma, K. *et al.* Specificities of IgE, IgG and IgA antibodies to ovalbumin. Comparison of binding activities to denatured ovalbumin or ovalbumin fragments of IgE antibodies with those of IgG or IgA antibodies. Int. Arch. Allergy Immunol., **103**, 28–35 (1994).