

〔原 著〕

低アレルギー化卵白の開発

—加熱脱 Ovomucoid 卵白のアレルギー活性の検討—

藤田保健衛生大学医学部小児科

和田映子 宇理須厚雄 安藤仁志

森田 豊 矢崎雄彦

山田医院

山田一恵

キューピー株式会社研究所

後藤雅広 若松利男

加熱脱 ovomucoid (以下 OM) 卵白の低アレルギー化を RAST inhibition, 皮膚テスト, 卵白経口負荷試験を用いて検討した。卵白凍結乾燥粉末 (以下凍乾末), OM, ovalbumin (以下 OA) を disc 抗原とし, 卵白凍乾末, 加熱卵白, 加熱脱 OM 卵白を inhibitor として RAST inhibition を実施した。卵白凍乾末は全ての disc に対して有意な抑制がかかったが, 加熱卵白は OM-disc に対してだけ有意な抑制をみ, 加熱脱 OM 卵白は全ての disc に対して抑制はかからなかった。皮膚テストは56例を対象に, 経口負荷試験はそのうちの27例を対象に卵白凍乾末, 加熱卵白, 加熱脱 OM 卵白を用いて実施した。プリックテストで卵白凍乾末陽性だった25例中, 加熱卵白陽性は7例(陰性化率72%), さらに加熱脱 OM 卵白陽性は3例(陰性化率: 卵白凍乾末に対して88%, 加熱卵白に対して57%)であった。20分間パッチテストでもほぼ同様の結果が得られた。経口負荷試験では卵白凍乾末陽性の8例中加熱卵白陽性は4例(陰性化率50%), 加熱脱 OM 卵白では全例陰性だった。以上から加熱脱 OM 卵白の低アレルギー化が証明された。

Key words: heated and ovomucoid-depleted egg white — 20-minutes patch tests — ovomucoid — prick tests — RAST inhibition

はじめに

鶏卵アレルギーは乳幼児期に最も頻度の高い食物アレルギーの1つであり¹⁾, 湿疹を有する乳児では, 卵白特異的 IgE 抗体の陽性率は31%と高値を示している²⁾。また, 鶏卵は栄養価も高く安価であり, 消費量は増加している。従って鶏卵の低アレルギー化が可能であれば, 鶏卵アレルギーの患者にとって有益であるばかりでなく, 機能性食品としての商品価値もある。

卵白の主要アレルギーのうち, ovomucoid (Gal d1 以下 OM) は他の卵白成分である ovalbumin (Gal d2

以下 OA), ovotransferrin, lysozyme に比べて熱や消化酵素に対して安定である³⁾⁻⁶⁾。すなわち卵白を十分に加熱しても, あるいは腸管が成熟し十分な消化酵素を分泌できる年齢になっても, OM を抗原として強く認識している場合は経口摂取が難しいと予想される。筆者らは, 卵白特異的 IgE 抗体陽性にもかかわらず卵白凍結乾燥粉末 (以下凍乾末) 経口負荷試験が陰性の群は, 陽性群に比して OM に対する特異的 IgE 抗体価が他の卵白成分とは異なって有意に低値であったことから⁷⁾, 鶏卵アレルギーにおいて OM が最も重要であると推測している。以上から OM を除いた加熱卵白はアレルギー活性が減弱していると期待される。本稿では加熱脱 OM 卵白のアレルギー活性を RAST inhibition, 皮膚テスト (プリックテスト, 20分間パッチテスト)。経口負荷試験を用いて検討した。

Received: February 28, 1997

Accepted: June 13, 1997

Abbreviations: Ig immunoglobulin; OA ovalbumin; OM ovomucoid; RAST radioallergosorbent test; SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

方法と対象

1. 卵白抗原ならびに卵白成分；

卵白凍乾末，加熱卵白，加熱脱 OM 卵白はキューピー株式会社研究所から供与された．加熱卵白は液体卵白を90°C 60分加熱処理して作製した．加熱脱 OM 卵白は OM が他の成分とは異なって，加熱しても凝固しないことを利用して，加熱後，生食と蒸留水で洗浄し OM を除去した．すなわち，5kg の液体卵白を加熱後（90°C 60分間），20L の生食で洗浄と圧縮脱水を3回繰り返した．さらに同量の蒸留水で同様の処理を施した後，凍結乾燥しホモジェナイザーで粉末とした．

OM が除去されていることは加熱脱 OM 卵白，卵白凍乾末，加熱卵白を2-mercaptoethanol 加 digestive buffer で処理したのち14% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（以下 SDS-PAGE）で電気泳動を行うことによって確認した．

卵白成分としては OM（キューピー株式会社研究所から供与），OA（名古屋大学農学部中村教授から供与）を使用した．

2. 卵白凍乾末，加熱卵白，加熱脱 OM 卵白を inhibitor としての RAST inhibition；

卵白凍乾末，加熱卵白，加熱脱 OM 卵白を 0，10，100，1000 μ g/ml の濃度に希釈し，それぞれを inhibitor 用抗原溶液とした．抗原溶液25 μ l と卵白特異的 IgE 抗体高値血清（4検体）の pool 血清25 μ l を混和し，4°C 24時間静置後，CNBr 活性化 paper disc（直径5mm，東洋濾紙5号）に結合させた卵白凍乾末，OM，OA を固相とした RAST inhibition を行った．

% RAST inhibition は以下の式で求めた；

inhibitor 非添加の場合の isotope count (cpm)/inhibitor 添加の場合の isotope count (cpm)/ $\times 100$

この% RAST inhibition を縦軸とし，横軸には抗原 inhibitor の濃度を片対数表にとり，抑制率50%に対応する抗原濃度を求めた．

3. 皮膚テスト；

卵白凍乾末，加熱卵白，加熱脱 OM 卵白を，50%グリセリン-生食で160mg/ml に溶解したものを検査液として用いた．対照には50%グリセリン-生食を用いた．

プリックテストは，児の前腕内側に検査液を20 μ l 滴下し，プリック針（プロテクト社製 PRICKER）で皮膚表層に傷を付け，15分後に判定し，膨疹が直径5mm 以上の場合を陽性とした．

20分間パッチテスト⁸⁾⁹⁾は，フィンチャンバー（Epitest 社製，フィンランド）に検査液20 μ l をしみこませた濾紙をのせて，児の前腕内側に貼付し，20分後に判定した．判定は膨疹，水疱，サテライト疹などが出現した場合に陽性とし，紅斑のみでは陰性とした．

4. 皮膚テストの対象；

問診等で鶏卵アレルギーが疑われた56例（男児34例，女児22例，平均月齢 $\pm$ SD=33.4 $\pm$ 25.3カ月（範囲3～124カ月））を対象とした．内訳は，アトピー性皮膚炎41例，気管支喘息3例，じん麻疹2例，アトピー性皮膚炎と気管支喘息の合併9例，アトピー性皮膚炎，気管支喘息とじん麻疹の合併1例であった．対象者の Pharmacia 社製 Phadebas RAST キットによって測定された卵白 RAST スコアの内訳は，スコア0が9例，スコア1が5例，スコア2が14例，スコア3が22例，スコア4が6例であった．

検査の前，抗ヒスタミン剤，抗アレルギー剤は7日以上，気管支拡張剤は24時間以上中止した．なお，ステロイド剤を内服している患者はいなかった．

5. 卵白経口負荷試験の方法と対象；

皮膚テストの対象者の内27例（男児15例，女児12例，平均月齢 $\pm$ SD=44.6 $\pm$ 4.8カ月（範囲11～124カ月））で卵白経口負荷試験を実施した．

卵白経口負荷試験の少なくとも2週間前から鶏卵ならびにその加工品の除去を実施し，7日前から抗ヒスタミン剤，抗アレルギー剤などの薬剤を中止した状態で負荷試験を実施した．

負荷試験には卵白凍乾末，加熱卵白，加熱脱 OM 卵白それぞれ8g（鶏卵約1個分）を，日頃自宅で飲んでも即時型過敏症状を起こしたことがないジュース50ml に溶かしたものを用いた．卵白0.016g（0.1ml）から負荷を開始し，30分毎に増量した．即時型過敏症状が出現した時点で負荷試験陽性として負荷を中止した．最終投与後，2時間以内に症状が出現した症例を即時型過敏症状陽性とした．翌日まで観察し，症状陰性例に対しては再負荷をし，陰性を確認した症例を卵白負荷試験陰性とした．プラセボとして投与したジュースでは1例も陽性反応は呈さなかった．

結 果

1. SDS-PAGE；

Fig. 1 に示すように，卵白凍乾末，加熱卵白と比し

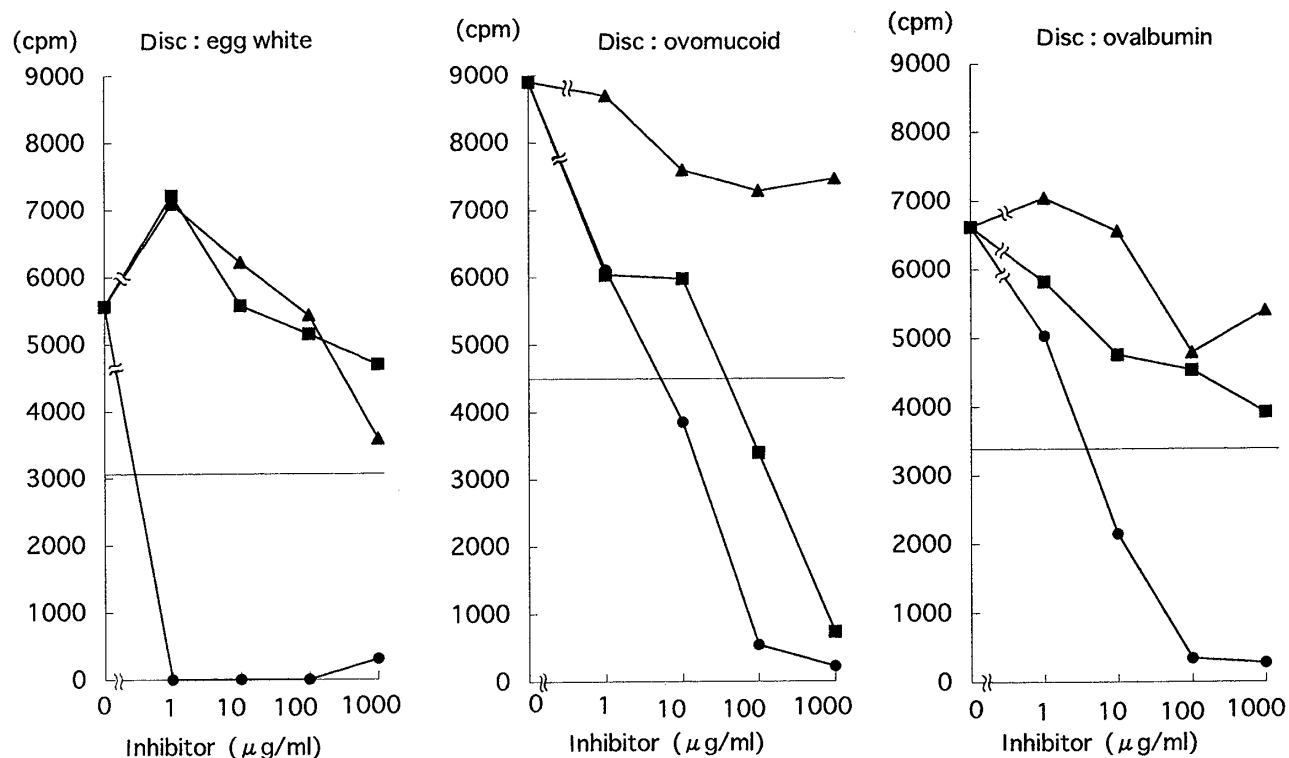


Fig. 1. RAST inhibition assay.

Inhibitor; —●— freeze-dried egg white, —■— heated egg white, —▲— heated and ovomucoid depleted egg' white.

て、加熱脱OM卵白でOMに相当するバンドの減少が確認できた。

2. RAST inhibition ;

RAST inhibitionの結果 (Fig. 2) は、抑制率50%に対応する必要抗原濃度で表現した。inhibitorを卵白凍乾末とすると、必要抗原濃度は卵白凍乾末-discに対しては10μg/ml, OM-discに対しては8μg/ml, OA-discに対しては7μg/mlであった。次にinhibitorを加熱卵白とすると、卵白凍乾末-discとOA-discに対しては1000μg/mlの抗原濃度でも50%の抑制が得られず、OM-discに対してのみ75μg/mlで抑制がかかった。inhibitorを加熱脱OM卵白にすると、すべてのdiscに対して1000μg/mlの抗原濃度でも50%の抑制は得られなかった (Table 1)。

以上から、卵白凍乾末中のOM, OAは十分なIgE結合能を有しているが、加熱卵白中のOAはIgE結合能をほとんど残しておらず、OMのIgE結合能も卵白凍乾末に比べると低下していることが証明された。さらに、加熱脱OM卵白はIgEに対するOMとの間の競合力が消失していることが明らかとなった。

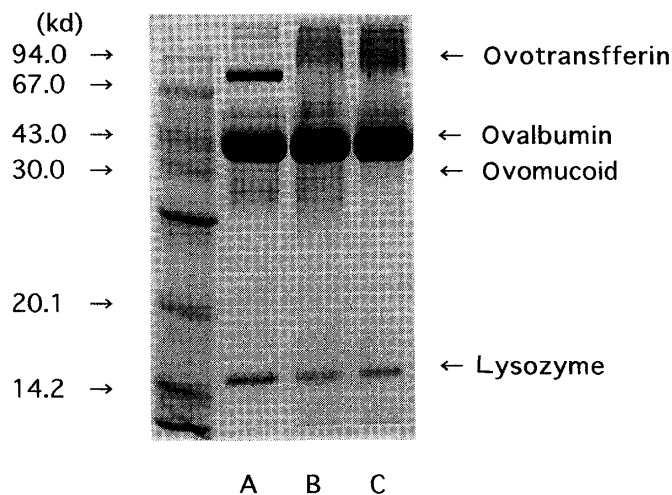


Fig. 2. SDS-PAGE (14% gel) of freeze-dried (A), heated (90°C 60min) (B) and heated and ovomucoid-depleted egg white antigens (C).

3. 皮膚テスト (Table 2) ;

プリックテストを実施した56例中、卵白凍乾末で陽性になったのは25例 (陽性率44.6%) だった。この25例中加熱卵白によるプリックテストで陰性になったのは18例で、陰性化率は72%だった。加熱脱OM卵白で

は、この7例中4例で陰性になり(陰性化率57%), 卵白凍乾末に対しては25例中22例が陰性となり、陰性化

Table 1 Concentration of inhibitors needed for 50% RAST inhibition

Disc	Inhibitor(micro g/ml)		
	Freeze-dried egg white	Heated egg white	Heated and ovomucoid-depleted egg white
Freeze-dried egg white	10	1000<	1000<
Ovomucoid	8	75	1000<
Ovalbumin	7	1000<	1000<

Freeze-dried egg white, ovomucoid and ovalbumin were coupled with CNB-activated paper discs.

Pooled serum from egg-hypersensitive subjects with high IgE antibody titers for egg white was used for RAST inhibition.

率は88%であった。

一方、20分間パッチテストを実施した56例中、卵白凍乾末で陽性になったのは25例(陽性率44.6%)と、プリックテストと同値であった。この25例中加熱卵白による20分間パッチテストで陰性になったのも18例(陰性化率72%)で、プリックテストと同値であった。加熱脱 OM 卵白では加熱卵白陽性の7例中5例で陰性となり、陰性化率は92%だった。

以上から、プリックテストおよび20分間パッチテストのいずれによっても、卵白凍乾末より加熱卵白が、さらに加熱脱 OM 卵白が低アレルゲン化されていることが示された。

4. 卵白経口負荷試験；

経口負荷試験を実施した27例中、卵白凍乾末陽性は8例であった。加熱卵白では4例が陽性となり、陰性化率は50%であった。このうち加熱脱 OM 卵白では全

Table 2 Comparison of allergenic activity of freeze-dried, heated, and heated and ovomucoid-depleted egg white by skin tests

		Freeze-dried egg white	Heated egg white	Heated and ovomucoid-depleted egg white
Prick test	Positive	25(44.6%)	7(12.5%)	3(5.5%)
	Negative	31(55.4%)	49(87.5%)	53(94.6%)
20-minutes Patch test	Positive	25(44.6%)	7(12.5%)	2(3.6%)
	Negative	31(55.4%)	49(87.5%)	54(96.4%)

Table 3 Relationship between prick tests, 20-minutes patch tests and oral challenge tests using freeze-dried egg white

		Oral challenge			
		Positive	Negative		
20-minutes patch test	Positive	5	3	8	Sensitivity 62.5 Specificity 84.2 Efficiency 77.7 Positive predict value 62.5 Negative predict value 84.2
	Negative	3	16	19	
		8	19	27	
		Oral challenge			
		Positive	Negative		
Prick test	Positive	2	7	9	Sensitivity 25.0 Specificity 63.2 Efficiency 51.9 Positive predict value 22.2 Negative predict value 66.7
	Negative	6	12	18	
		8	19	27	
		20-minutes patch test			
		Positive	Negative		
Prick test	Positive	3	6	9	Sensitivity 37.5 Specificity 68.4 Efficiency 59.3 Positive predict value 33.3 Negative predict value 72.2
	Negative	5	13	18	
		8	19	27	

例が陰性という結果であった。

5. 卵白経口負荷試験と皮膚テストとの比較 (Table 3) ;

卵白凍乾末経口負荷試験の結果を基準にしてプリックテストと20分間パッチテストを比較した。プリックテストの sensitivity 25.0%, specificity 63.2%, efficacy 51.9%, positive predict value 22.2%, negative predict value 66.7%であったのに対して, 20分間パッチテストの方はそれぞれ62.5%, 84.2%, 77.7%, 62.5%, 84.2%と, プリックテストよりも優れていた。

考 察

加熱脱 OM 卵白が低アレルゲン化されていることが RAST inhibition と皮膚テストによって証明された。すでに, 筆者らは経口負荷試験を用いて, 加熱脱 OM 卵白が加熱卵白よりも低アレルゲン化していることは報告した¹⁰⁾。皮膚テストと経口負荷試験との両者が実施できた症例でも, 経口負荷試験によって加熱脱 OM 卵白の低アレルゲン性は証明され, 同様の結果を得た。しかし, 加熱卵白から加熱脱 OM 卵白への陰性化率は, 経口負荷試験の方が皮膚テストよりも良い結果であった。OM は卵白成分の中で最も消化酵素に対して安定な成分である³⁾⁻⁷⁾¹⁰⁾。その OM を除去した製品であれば, 酵素の影響を受ける経口負荷試験の方が成績が良いのは当然の結果といえる。

皮膚テストとして20分間パッチテストとプリックテストを卵白凍乾末を基準にして比較検討した。20分間パッチテストの方がプリックテストよりも sensitivity, specificity, efficacy, positive predictive value, negative positive value いずれにおいても優れていた。小児に痛みや針に対する恐怖心を与えることなく, かつ, プリックテストのように検者による差異を生ずる可能性も少ないので, 20分間パッチテストの方が幾つかの長所があるといえる。今後, 年齢, 検査部位など20分間パッチテストに影響する要因を検討し, さらに有用性を検討していく必要がある。

本論文の要旨は第45回日本アレルギー学会総会(浦安)および第8回日本アレルギー学会春季臨床大会(横浜)において発表した。

文 献

- 1) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 駒田英勝, 山田政功, 他: アトピー性皮膚炎における食餌性アレルゲンの検討. 小児科臨床 38, 2543-2552, 1985.
- 2) 堀場史也, 宇理須厚雄, 和田映子, 近藤康人, 鶴田光敏, 他: 乳児期早期に特異的 IgE 抗体をスクリーニングする意義—食物アレルギーの早期発見と気管支喘息の予知—. 日小ア誌 7, 39-44, 1993.
- 3) 本間季里, 青柳正彦, 斉藤公幸, 西牟田敏之, 杉本和男, 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, 1991.
- 4) Honma, K., Kohno, Y., Saito, K., Shimojo, N., Tsunoo, H., et al.: Specificities of IgE, IgG and IgA antibodies to ovalbumin. *Int. Arch Allergy Immunol.* 103, 28-35, 1994.
- 5) Gu, J., Matsuda, T. and Nakamura, R.: Antigenicity of ovomucoid remaining boiled shell eggs. *J. Food Sci.* 51, 1448-1450, 1986.
- 6) Kurisaki, J., Konishi, J., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K.: Studies on the allergenic structure of hen ovomucoid by chemical and enzymatic fragmentation. *Agric. Biol. Chem.* 45, 879-884, 1981.
- 7) 山田一恵, 宇理須厚雄, 近藤康人, 八木映子, 駒田英勝, 他: 卵白経口摂取による即時型過敏反応と卵白成分に対する IgE 結合能. アレルギー 43, 1201-1209, 1994.
- 8) 松永佳代子: パッチテストの実際と問題点. 皮膚 32, 15-22, 1990.
- 9) Oranje, A.P., Aarsen, R.S., Mulder, P.G., Toorenenbergen, A.W., Liefwaard, G., et al.: Food immediate-contact hypersensitivity (FICH) and elimination diet in young children with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* 176, 41-44, 1992.
- 10) 宇理須厚雄, 安藤仁志, 森田 豊, 八木映子, 山田一恵, 他: 低アレルゲン食品の開発—卵—. 食品アレルギー対策ハンドブック(上野川修一, 近藤直実編), サイエンスフォーラム, pp.353-362, 1996.

ASSESSMENT OF ALLERGENIC ACTIVITY OF HEATED AND
OVOMUCOID-DEPLETED EGG WHITE

Eiko Wada, Atsuo Urisu, Yutaka Morita, Hitoshi Ando, Takehiko Yasaki,
Kazue Yamada¹⁾ and Masahiro Goto²⁾ and Toshio Wakamatsu²⁾

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine

¹⁾Yamada Clinic, QP Corporation R & D

We investigated allergenic activity of heated and ovomucoid (OM)-depleted eggwhite by RAST inhibition tests, skin tests and oral challenge tests. Freeze-dried eggwhite, OM and ovalbumin (OA) were coupled with CNBr-activated paper discs. Freeze-dried, heated, and heated and OM-depleted eggwhite antigens were used as inhibitors in RAST inhibition tests. Freeze-dried eggwhite significantly inhibited the IgE-binding to freeze-dried egg-white-, OM- and OA-discs. Heated eggwhite showed a significant inhibition against only OM-disc, but heated and OM-depleted eggwhite didn't effectively suppress IgE-binding to all discs. Fifty-six patients were subjected for skin tests and 27 patients for oral challenge tests with freeze-dried eggwhite, heated eggwhite and heated and OM-depleted eggwhite. Eighteen of 25 subjects with positive prick tests results to freeze-dried eggwhite showed negative results to heated eggwhite. Four of 7 cases with positive prick test results to heated eggwhite gave negative results to heated and OM-depleted eggwhite. 20-minutes patch tests showed almost similar results to prick tests. Four of 8 subjects showing positive oral challenge tests with freeze-dried eggwhite were negative to heated eggwhite. All of 4 with positive oral challenge tests by heated eggwhite were negative results to heated and OM-depleted eggwhite. These evidence indicated that heated and OM-depleted eggwhite was more hypoallergenic than heated eggwhite.
