

Enzyme Immunoassay (EIA) を用いた 米のアレルゲン性評価法の検討

柳原 哲司*

抗原抗体反応を利用した米のアレルゲン性測定法について検討を行った結果, Enzyme Immunoassay (EIA) の基本条件として, 抗原濃度 $50\mu\text{g/ml}$, 血清希釈濃度10倍, 2次抗体希釈10,000倍で良好な結果が得られた。この条件で測定を行うと, 10mlの患者血清, $20\mu\text{l}$ の2次抗体で約2,000点の分析が可能である。また, 標準タンパク質による検量線を作成することにより, 精度および再現性を高めることができた。抗体結合活性の血清の違いによる差異は比較的小さく, 今回用いた患者血清によって, 米の一般的なアレルゲン性の違いを評価できると判断した。さらに, 米のアレルゲン性について3つの評価値を提案し, 主要流通品種を用いた変動解析を行った。その結果, 明確な品種間差は認められなかったが, 品種内の変動幅は比較的大きく, 今後臨床試験と組み合わせた変動要因解析が必要である。

諸 言

近年アレルギー症状を持つ人が増加し, 社会的にも大きな問題となっている。平成3年の厚生省保健福祉動向調査¹⁾によると, 全人口の34.9%が何らかのアレルギー症状に悩んでいることが示されており, これらの理由として住環境の変化を含む生活環境の変化, 大気汚染, あるいは肉体的, 精神的なストレスの増加などの要因が挙げられているが, 食生活の変化も含めた食品の影響も非常に大きいといわれている。いずれにしても, 食物を原因とするアレルギー患者が増加していることは事実であり, 農産物に対してもアレルギー症状を誘発しないことが求められている。

食物アレルギーの中でも, 米をはじめとする穀物アレルギーは, 患者から主食を奪う結果となることが多いため, 栄養学的な面で大きな問題となる。さらに, アトピー性皮膚炎に対する米アレルギーの関与の重大性も指摘されており^{1,6)}, 日本人にとっては特に重要な意味を持つアレルギーである。そのため低アレルゲン米の開発が各方面で精力的におこなわれている^{2,7,10)}。しかし, 米アレルギーの発症機序については未だ不明な点が多く, 今後とも基礎的な研究が必要である。特に北海道の臨床医の間では, 米の品種, 産地によるアレルゲン性の違いが注目されており, その変動要因の解明およびそれを応用した米の低アレルゲン化が求められている。

米のアレルゲンについては, 以前から塩可溶タンパク質画分に最も高い活性の存在が明らかにされており⁸⁾, その後アレルギー患者血清との反応を指標として, 米塩可溶タンパク質画分から分子量約16,000のタンパク質がアレルゲンとして同定・精製されている⁵⁾。

北海道米の低アレルゲン化を図るためには, 米のアレルゲン性がどのような要因により, どの程度変動するかを解析する必要がある。そのためにはまず米のアレルゲン性を正確に評価するための測定法を開発する必要がある。そこで本報告では, 米アレルゲンの抗体結合活性を測定するためのEIA (Enzyme Immunoassay: 酵素免疫測定法) について分析条件を検討するとともに, その測定値に基づく米のアレルゲン性評価値を策定した。また, この評価値を用いて品種, 産地が異なる米を供試した米アレルゲン性の変動要因解析をおこなった。

試験方法

試験1. アレルゲン性評価法の検討

(1) 米アレルギー患者血清

米アレルギー患者血清は長谷川クリニック(札幌市)において, 米抗原に対する特異抗体検査である米RAST (Radioimmunoassay Solvent Test) 値が陽性と判定され, 臨床的にも米アレルギーと診断された患者(20才, 女性)の血清を供試した。また抗体陰性対照として, アレルギー経歴のない成人より採取した血清を用いた。

(2) 米塩可溶タンパク質(アルブミン+グロブリン)の抽出および定量

米粉に20倍量の0.5M-塩化ナトリウム溶液 (pH7.4)

2000年2月15日受理

* 中央農業試験場 〒069-1395 長沼町東6線北15号

を加え、120分しんとう後の遠心分離上清を塩可溶タンパク質とした。タンパク質の定量は、プロテインアッセイキット (BIO RAD社) を用い、米 (乾物) あたりの含量 (GC%) として示した。

(3) EIAによる塩可溶タンパク質の抗体結合活性測定条件の検討

以下の手順に従い、吸着させる米の塩可溶タンパク質濃度、患者血清の希釈倍率および2次抗体の希釈倍率の組み合わせについて最適な測定条件を検討した。求める測定条件の要件として、一般米試料×患者血清の組合せで適度な結合活性が認められ、特定保健用食品および抗体陰性対照ではできるだけ活性が低くなる条件とした。また、患者血清および2次抗体の使用量はできるだけ少なくなるようにした。

1) 抗原の固相化: 抽出した塩可溶タンパク質を沈殿、乾燥後、リン酸緩衝液に再溶解したものを一定濃度に調製し抗原溶液とした。抗原溶液をマイクロプレート (Nunc社, Maxi Sorp) に50 μ lづつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して抗原を固相に吸着させた。吸着させる米のタンパク質濃度について、0.05, 0.5, 5, 50, 100 μ g/mlの5水準で比較検討した。なお、低抗原対照として市販特定保健用食品を用いた。

2) ブロッキング: 洗浄液 (0.1% tween20を含むリン酸緩衝液) でプレートを洗浄後、1% BSA (牛血清アルブミン) 溶液を200 μ lづつ各穴に分注し37 $^{\circ}$ Cで30分静置した。

3) 血清の注入: 洗浄液でプレートを洗浄し、一定倍率に希釈した血清を50 μ lづつ加え37 $^{\circ}$ Cで1.5時間静置した。患者血清の希釈倍率について、10, 100, 1000倍の3水準で比較検討した (抗体陰性対照として健康者血清をもちいた)。

4) 酵素標識2次抗体の注入: プレートを洗浄した後、一定倍率で希釈したパーオキシダーゼ標識抗ヒト抗体 (抗ヒト免疫グロブリンG抗体 (ヤギ) にパーオキシダーゼを結合させた2次抗体) を一定倍率に希釈後、各穴にそれぞれ50 μ lづつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。2次抗体の希釈倍率については5,000, 10,000, 20,000, 40,000倍の4水準で比較検討した。

5) 発色: プレートを洗浄し、基質溶液 (2mg/ml OPD; クエン酸・リン酸緩衝液, pH5.0) を各穴に100 μ lづつ分注し発色させた。15分経過後、4N-硫酸を50 μ lづつ分注し反応を停止させ、492nm (reference; 405nm) の吸光度をマイクロプレートリーダー (生化学工業社wel reader501) で測定し、米塩可溶タンパク質の抗体結合活性とした。

(4) 標準タンパク質による濃度検量線の作成

標準タンパク質は、1996年、北海道産米「きらら397」

を用いて塩可溶タンパク質を抽出後、沈殿、真空乾燥し-20 $^{\circ}$ Cで保存した。これをリン酸緩衝液に再溶解、遠心分離後濃度調整し、5~300 μ g/mlの範囲でスタンダード系列を作成した。

(5) 血清の違いによる抗体結合活性の変動解析

抗体の抗原との反応性には個人差があることが指摘されている、そのため抗体結合活性の血清による変動性を解析した。検討には上記血清に加え長谷川クリニックより提供を受けた米RAST陽性血清6検体を用い、表1に示した5種類の米の抗体結合血清を測定した。測定結果は、各血清と品種1の抗体結合活性を100として、他の米の抗体結合活性の相対値として求めた。品種1~3は一般北海道品種である。「低アレルギー米」はアレルギーショップで市販されている高度精白米である。また、「特定保健用食品」は米に含まれる塩可溶性タンパク質を工業的に除去した製品で、厚生省の許可により米アレルギーに対する軽減効果が表示されている。

表1 血清による抗体結合活性変動解析に供試した米試料

| 試料名 | 摘要 |
|-------------|-----------------|
| 品種1 | 北海道品種 |
| 品種2 | " |
| 品種3 | " |
| 市販「低アレルギー米」 | 高度精白処理米 |
| 市販 特定保健用食品 | 酵素処理によりアレルギーを除去 |

試験2. アレルゲン性の変動解析

表2に示した北海道内外の主要流通品種について、試験1により得られた測定条件に基づきアレルゲン性を測定し、アレルゲン性の変動範囲、品種間差、タンパク含有率およびアミロース含量との関係について検討した。

表2 アレルゲン性の変動解析に供試した主要流通品種

| 品種 | 産地* |
|----|--------------------------------|
| A | 秋田 (4), 岩手 (1), 大分 (1) |
| B | 北海道 (6) |
| C | 千葉 (1), 大分 (2), 広島 (1), 福岡 (1) |
| D | 宮城 (3), 秋田 (2), 岩手 (1) |
| E | 北海道 (6) |
| F | 北海道 (6) |

*: 生産道県 (点数)

結果および考察

試験 1. アレルゲン性評価法の検討

(1) EIA基本条件の検討と測定スキームの設定
 基本的なEIA条件の検討結果を図1に示した。

検討した範囲で十分な抗体結合活性が得られた条件は、タンパク質濃度50および100 $\mu\text{g/ml}$ 、血清希釈倍率10倍、2次抗体の希釈倍率は5,000および10,000倍であった。このうちタンパク質濃度は50と100 μg とで大きな差がないことから、マイクロプレートの標準量である50 $\mu\text{g/ml}$ に設定した。また、2次抗体濃度は5,000倍では抗体陰性対照および特定保健用食品の活性がやや高いため10,000倍と設定した。この設定条件に基づく測定スキームは図2に示したとおりであり、この条件で測定をおこなうと、10mlの患者血清、20 μl の2次抗体で約2,000点の測定が可能である。

(2) 標準タンパク質による濃度検量線の作成

本研究では、品種、産地、栽培法および育成系統などのアレルゲン性評価を最終目標としているため、成

分変異の狭い試料を大量に処理できる測定法でなくてはならない。そのためには測定精度が高く、かつ測定ロット間のばらつきをできるだけ抑える必要がある。そこで、標準タンパク質を調製し、測定ロット毎にタンパク質濃度系列を作成して検量線とすることを検討した。

図3に標準タンパク質を用いて作成した濃度検量線を示した。図のように、抗体結合活性はタンパク質濃度に依存しており、精度の高い検量線を作成することができた。このことから、測定にあたっては各マイクロプレート毎に標準タンパク質による濃度系列を配置し、その検量線から抗体結合活性を求めることとした。

また、多くの測定過程での条件を完全に統一することは難しく、測定ロットによるデータの偏りが大きい。そのため吸光度の絶対値を比較することが困難であった。しかし、本測定法では標準タンパク質による検量線をロット毎に配置することによりデータのばらつきはほぼ完全に消去することができた。

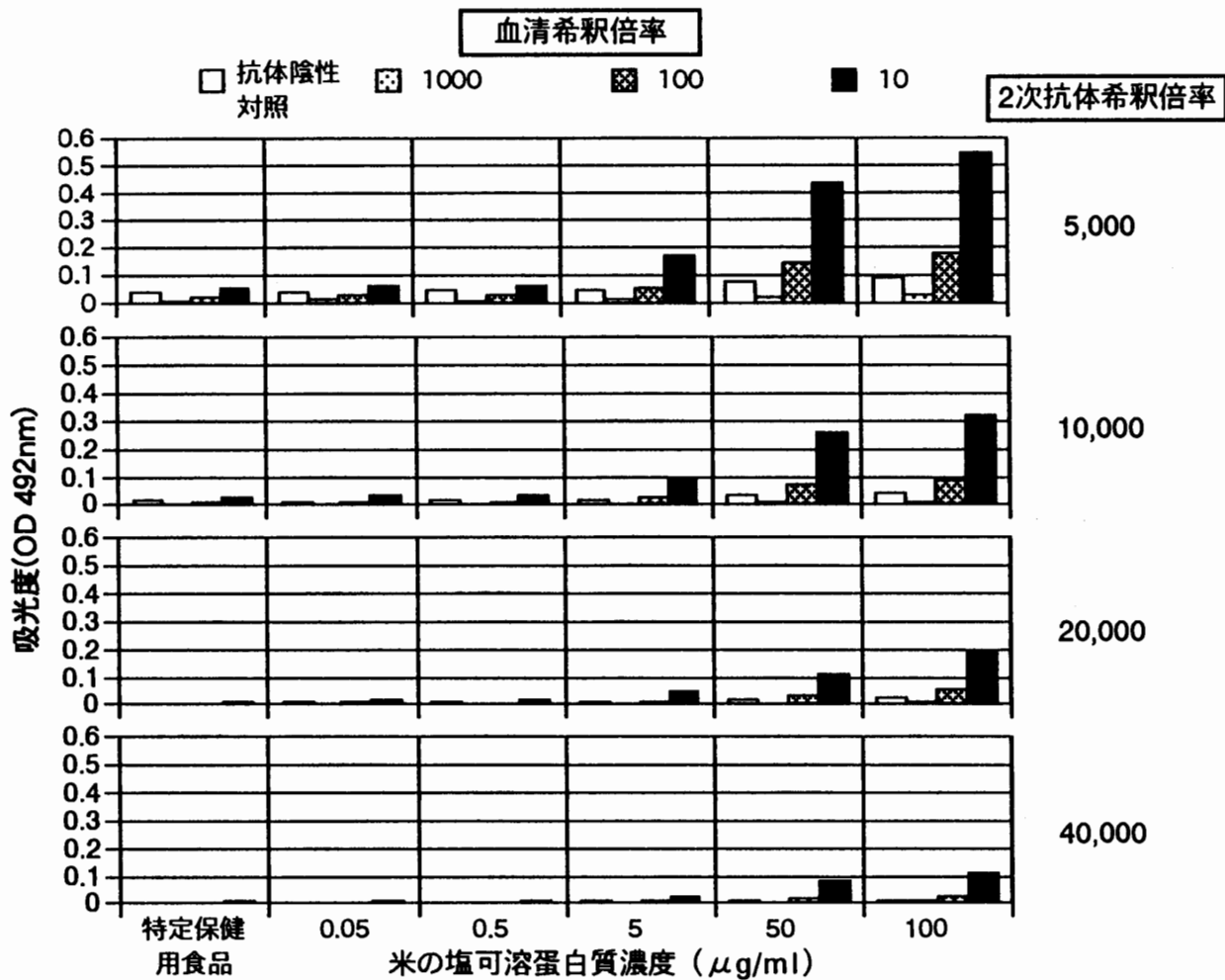


図1 血清、2次抗体希釈倍率および塩水可溶蛋白質濃度と抗体結合活性 (OD492nm) の関係

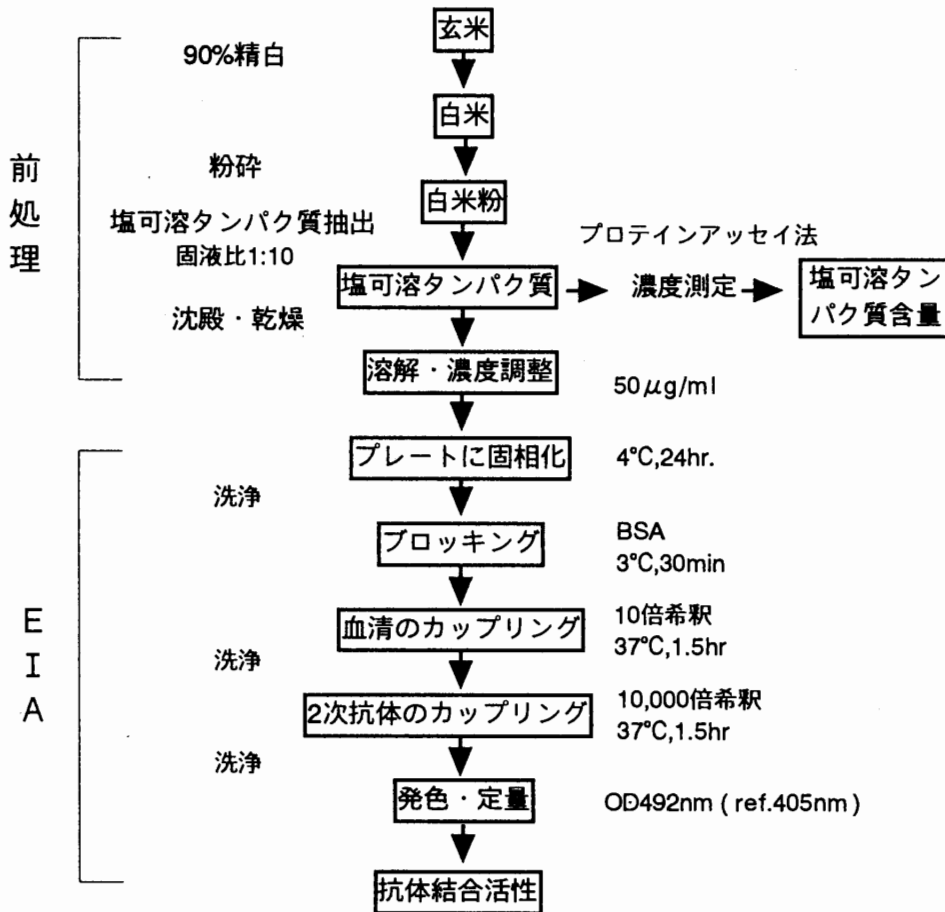


図2 アレルゲン性評価法の測定手順

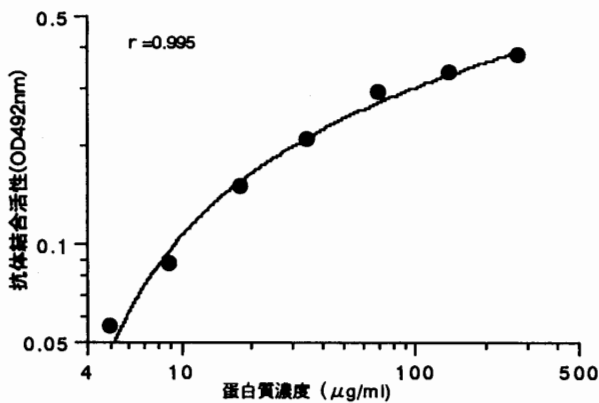


図3 標準蛋白質濃度と抗体結合活性 (OD492nm) の関係

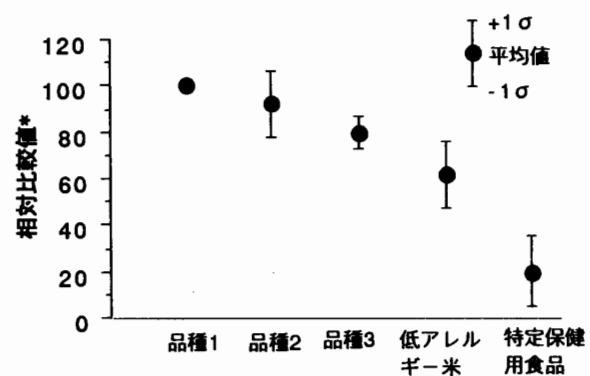


図4 患者血清の違いによる抗体結合活性の変動
*品種1を100とした抗体結合活性の相対値

(3) 血清の違いによる抗体結合活性の変動解析

ここまでの条件検討には単一の患者血清を使用した
が、血清と米タンパク質の反応性には個人差のある可能性が指摘されている。そのため、患者血清の違いによる抗体結合活性の変動程度について検討し、図4に示した。

患者血清の違いにより、相対比較値に若干のばらつきはみられたが、各米の相対的な順位はほぼ同様な傾向となり、血清の違いによる抗体結合活性の変動は少ないと考えられた。また、品種1～3に比較して低ア

レルギー米および特定保健用食品の測定値は低く、一般的な評価とも矛盾しなかった。

このように、米間のアレルゲン性の相対比較を目的とした測定であれば、血清の違いによる抗体結合活性の変動は小さく、本試験で用いた患者血清での評価は、他の患者に対しても広く適用できるものと判断した。

(4) アレルゲン性評価値の定義

これまでの検討の結果、EIAにより米タンパク質の抗体結合活性を高精度に再現性良く測定することが可能となった。ここで得られる測定値は、米塩可溶タンパ

表3 米のアレルゲン性評価値の定義とその意味

| アレルゲン性評価値 | 定義 | 意味 |
|-----------------|--------------------------|--------------|
| 塩可溶タンパク質含量 (GC) | 白米乾物当たりの塩可溶タンパク質含量 | アレルゲン性の容量因子 |
| アレルゲン強度 (ARA) | 塩可溶タンパク質当たりの抗体結合活性 | アレルゲン性の強度因子 |
| アレルゲン指数 (AI) | 白米乾物当たりの活性量 AI=GC×ARA | アレルゲン性の総合評価値 |

ク質一定量当たりの抗体結合活性（標準タンパク質の結合活性に対する相対値）であり、アレルゲン性の強度因子を示す値であることから、これをアレルゲン強度（ARA）と定義することとした（表3）。

また、品種や栽培来歴の異なる米のアレルゲン性を比較する場合、米に含まれる塩可溶タンパク質含量（GC）は大きく変動することが予想されるため、ARAに加えGCをアレルゲン性の容量因子として考慮する必要がある。さらに、米のアレルゲン性を総合的に示す評価値としては、ARAとGCの積（すなわちアレルゲンの強さ×量）が重要であり、この値をアレルゲン指数：AIと定義した。

試験2. アレルゲン性の変動解析

試験1で得られた評価法について、北海道内外の主要流通6品種36点を供試して用いて米アレルゲン性の変動解析をおこなった。

(1) アレルゲン性評価値の変動幅

図5に各アレルゲン性評価値の全試料での変動幅をヒストグラムで示した。容量因子であるGCは平均1.60

％、1.27～2.12％の範囲で変動した。GCの変動幅は比較的小さなものであったが、最低値と最高値の間には1.7倍ほどの開きがあった。

次に、強度因子であるARAをみると、平均は98で、最低値（49）と最高値（156）では3倍以上の差が認められ、GCよりも大きな変動幅を持つことが明らかとなった。これは、塩可溶タンパク質の中に含まれるアレルゲンタンパク質の量あるいは組成が試料により大きく異なることを示している。

GCおよびARAの変動を反映して、AIの変動幅は71～249と最低、最高値の間に3.5倍の差があった。このように36点の分析点数ではあるが、品種および産地の違いによるアレルゲン性の変動は大きく、その内容としては主に塩可溶タンパク質当たりのアレルゲン性の変動に基づくことが明らかとなった。この範囲の変動が実際のアレルギー症状とどの程度の関係があるかは、今後臨床試験の結果と組み合わせて解析する必要がある。

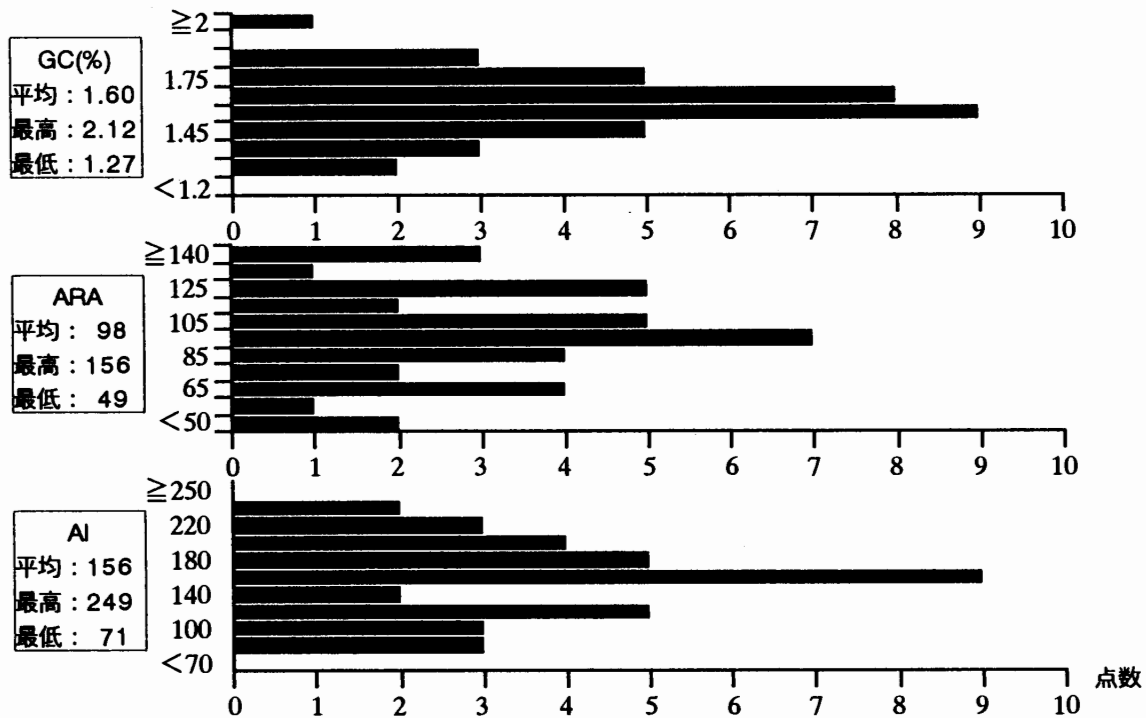


図5 アレルゲン性評価値の変動範囲（ヒストグラム）

(2) 品種間差

GC, ARAおよびAIを品種毎に比較し図6に示した。いずれの評価値も品種間より品種内での変動が大きく、供試試料の範囲内では明確な品種間差は認められなかった。杉山ら⁹⁾は米に含まれるアレルゲンの量は品種により差がないとの見解を示しており、本報告での結果はこれと矛盾しないものである。しかし、アレルゲン性品種間差の有無は重要な検討課題であり、今後さらに測定点数、品種を多数重ねて結論を出す必要がある。

(3) 米の食味とアレルゲン性の関係

現在、米の品質の中で最も重要視されている特性は食味である。米の食味は一般的に品種と産地により評価される一方、内部成分との関係では、アミロース含量および米粒中タンパク質含量の影響が大きいことが知られており、これらの値が米の食味を評価するため

の重要な指標として利用されている³⁾。そこで、これら米の食味とアレルゲン性の関係を知るために、アミロース含量およびタンパク質含量とアレルゲン性評価値(GCおよびARA)の関係を検討した。

図7に示したように、アミロース含量とアレルゲン性評価値との間に関連性は認められなかった。一方、図8のタンパク質含量との間では、ARAとは明確な関係が認められなかったが、GCとは有意な正の相関関係が認められた。すなわち、タンパク質含量が高い米は塩可溶タンパク質含量も高い傾向があることを示しており、アレルゲン性に関するリスクが高まる可能性がある。このことから、北海道でも積極的に推進されている低タンパク米生産の方向性は、アレルゲン性の低減に関して有効と推測される。

以上のように、米の塩可溶タンパク質の抗体結合活性を精度高く評価できる測定条件を設定することがで

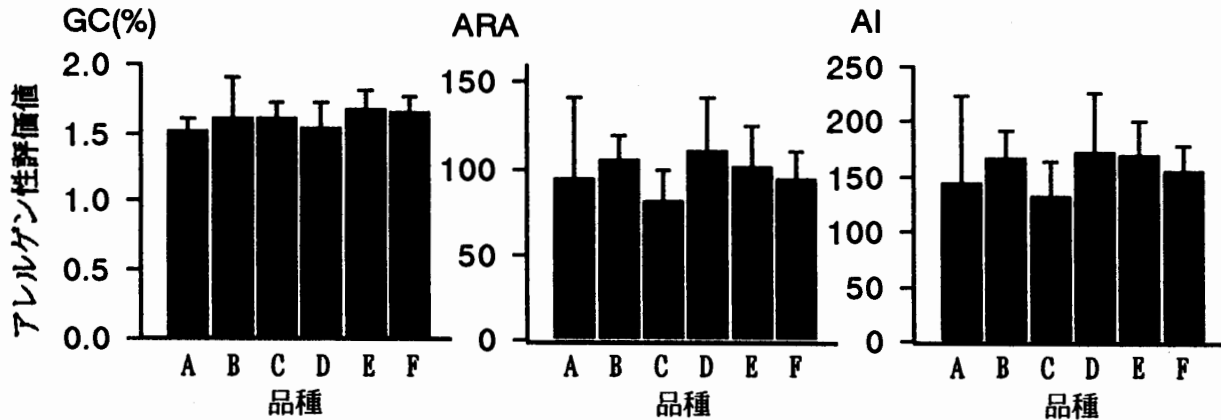


図6 アレルゲン性評価値の品種間比較

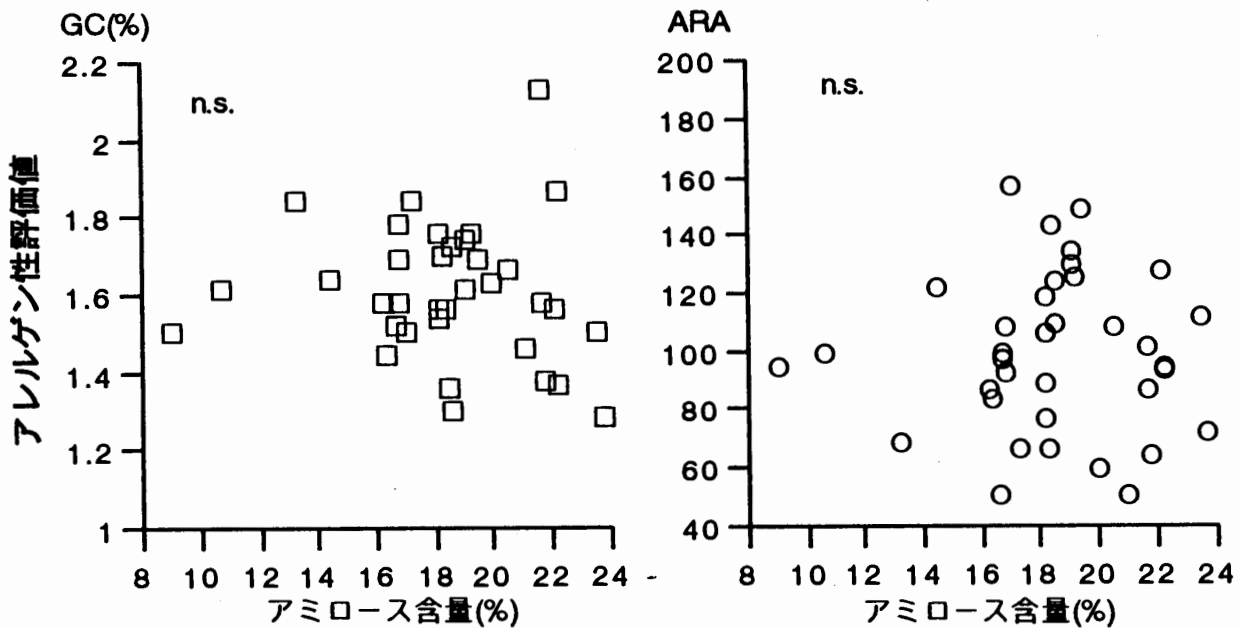


図7 アミロース含量とアレルゲン性評価値 (GC, ARA) の関係

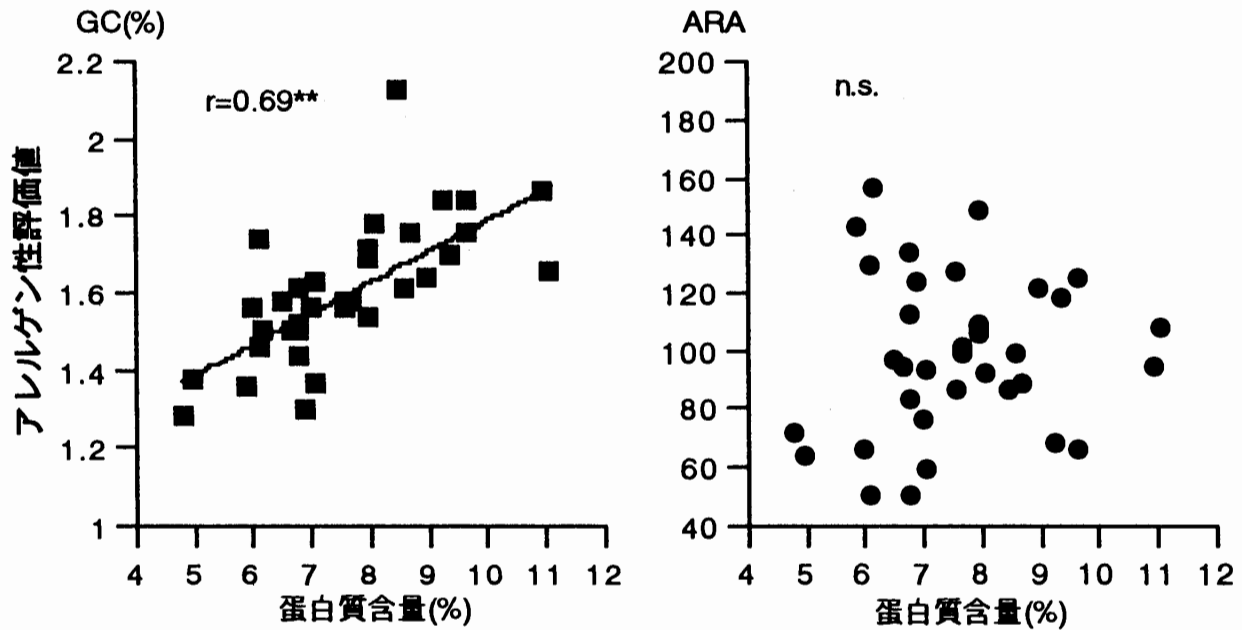


図8 蛋白質含量とアレルゲン性評価値の関係

き、それに基づき米アレルゲン性評価値を提案した。しかし、米アレルギー発症の機序については未知の部分も多く、本報告で得られた評価値のみで米のアレルゲン性を全て表現することは不可能である。今後は、これらの測定と臨床試験を組み合わせた解析が必要であり、塩可溶画分以外のタンパク質や、タンパク質以外の成分を考慮に入れた総合的な評価法の整理が必要である。

謝辞 本研究を進めるにあたり、長谷川クリニック院長長谷川浩博士にはアレルギー患者血清の提供および食物アレルギー全般に関するご教示をいただいた。また、北海道赤十字血液センター宮崎孔氏にはEIA作成に関して有益なご助言をいただいた。

本稿の執筆にあたり中央農業試験場農産化学部能代昌雄部長、同環境化学部長沢口正利博士および同農産化学部穀物利用科長中津智史博士には懇切なご校閲をいただいた。以上の各位に心から謝意を表す。

引用文献

- 1) 池澤善郎. “皮膚科からみたアトピー性皮膚炎と食物アレルギー、とくに重症型における米アレルギーの関与とその対策の試み”. メディカルレビュー. 第6回免疫薬物療法研究会記録集. 99-115 (1989).
- 2) 池澤善郎, 椿和文, 大砂博之, 嶋田禎祐, 茂木和之, 杉山宏, 勝俣和子, 安西弘行, 天野三郎. “アレルゲン低減化米 (AFT-R 1) の有用性と塩不溶性米アレルゲン分子の解析”. アレルギー. 48, 40-49 (1999).
- 3) 稲津脩. “北海道産米の食味向上による品質改善に関する研究”. 北海道立農業試験場報告. 66, 89 (1988).
- 4) 厚生省. “平成3年度保健福祉動向調査”. (1995).
- 5) T. Matsuda, R. Nomura, M. Sugiyama, and R. Nkamura. “Immunochemical Studies on Rice Allergenic Protein”. Agric. Biol. Chem. 55 (2), 509-513 (1991).
- 6) 宮川加奈太, 平井義雄, 宮川淳子, 杉山朝美, 小松平, 菅千束, 池沢善郎, 中嶋弘. “アトピー性皮膚炎患者における診断基準科目, 年齢分布, 重症度, IgE-RAST, 血清IgE値の統計的解析-重傷アトピー性皮膚炎患者における米アレルギーの果たす役割”. アレルギー. 37, 1101-1110 (1988).
- 7) 笹川秋彦. “低アレルゲン化無菌化包装米飯について”. 第25回研究会記録集, 新潟アレルギー研究会誌. 11, 11-14 (1994).
- 8) M. Shibasaki, S. Suzuki, H. Nemoto and T. Kuroume, J. Allergy Clin. Immunol. 64, 259-265 (1979).
- 9) 梶山実, 松田幹, 中村良. 昭和62年度日本農芸化学会大会講演要旨集. 270 (1987).
- 10) M. Watanabe, J. Miyakawa, Z. Ikezawa, Y. Suzuki, T. Hirao, T. Yoshizawa, and S. Arai. “Production of Hypoallergenic Rice by Enzymatic Decomposition of Constituent Protein”. J. of Food Science. 55-3, 781-783 (1990).

Quantitative Study of The Antigenicity of Rice by Enzyme Immunoassay

Tetsuji YANAGIHARA*

Summary

The experimental condition was examined for quantitative measurement of the antigenicity of rice. Consequently, the best condition of EIA is as follows: 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration antigen, serum dilution is 1:10, and second antibody dilution is 1:10000. In this condition, 2,000 samples can be measured using 10ml of patient serum and 20 μl of second antibody. Precision and reproducibility can be increased by introducing the analytical curve of the standard protein in every plate. A difference in the reactivity of the serum used here was comparatively small. Globulin concentrations (GC), specific activity (ARA) and the product of GC and ARA (AI) were proposed for the indication of antigenicity.

* Hokkaido Central Agricultural Experiment station, Naganuma-cho, Yubari-gun, Hokkaido 069-1395