

洗浄条件の違いが食物アレルギーの コンタミネーションに及ぼす影響

妻木 陽子, 河本奈緒子*, 川崎 知佳*, 木村 南美*, 森石 悠里*

(2011年10月11日 受理)

Cleaning Procedure Effects Contamination of Food Allergens on Instruments

Yoko TSUMAKI, Naoko KAWAMOTO*, Chika KAWASAKI*,
Minami KIMURA* and Yuri MORIISHI*

Abstract

Food allergy is defined as an immune-mediated adverse reaction to certain foods. To avoid the onset of allergic symptoms, food-allergic patients have to exclude specific offending foods from their diets. In some cases, very small amounts of food allergens can induce anaphylactic reactions, so that food allergic patients strictly have to avoid allergens even from cooking devices. Therefore appropriate cleaning procedures are the most practical approaches for reducing contamination of allergens from instruments.

In this study we washed instruments contaminated with egg white, milk, or wheat by some different conditions, which are commonly used at home and restaurants. Subsequently, we selected sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to check for residual proteins and allergens on instruments. The analysis showed the presence of egg-white proteins, such as egg lysozyme (14.3 kD), ovalbumin (45 kD) and ovomucoid (76.6 kD) after washing the instruments with only water. Several protein bands had apparent molecular masses that matched with those of known milk allergens, such as casein (19–25 kD) and β -lactoglobulin (18.3 kD). Wheat proteins were also detected in those molecular masses ranging from 23 to 136 kD, which are corresponding to glutenin and gliadin. In the case of carefully washing condition using with detergent, a sponge and water, hen egg lysozyme and molecular complex of casein were detected, while wheat protein was undetectable.

From these results, carefully cleaning of instruments by using sponge, detergent and water can aid patients with severe food allergies to avoid allergic reactions.

* 2010年度広島女学院大学生生活科学部管理栄養学科卒業

I 緒 言

食物アレルギーとは、「原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して生体にとって不利な症状が惹起される現象」と定義されている^{1,2)}。また、アレルギーの原因となる食物をアレルゲンといい、食物アレルギーの場合、アレルゲンの多くは食品中のたんぱく質である。食物アレルギーは、人により極微量のアレルゲンによっても発症し、重篤な症状を引き起こすことがある³⁾。従って、加工食品などを生産する際に、原材料としてアレルゲン物質を使用していないにも関わらず、誤ってアレルゲンが混入してしまうコンタミネーションが問題となっている⁴⁾。消費者庁が発行している「アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック2010」によると、実際に、ピーナッツ非含有であるはずの菓子を喫食したところアナフィラキシーショックを起こし、搬送入院となった例がある⁵⁾。この一例では、ピーナッツ非含有の菓子とピーナッツサブレを製造する際に同じミキサーを使用しており、ピーナッツサブレ製造後の洗浄が不十分であったため混入事故が起こったことが判明した。このように、食物アレルギー患者への対応のひとつにコンタミネーションへの配慮が挙げられる。

調理器具や食器からのコンタミネーションを未然に防ぐためには、洗浄によりアレルゲンを取り除くことが重要である。しかし、極微量のアレルゲンを目視で確認することは難しく、洗浄を行っても調理器具や食器にアレルゲンが残存している可能性は高い。そこで本研究では、洗浄方法の違いにより、アレルゲンの残留に違いがみられるかどうか、電気泳動法を用いて確認を行った。なお、実験では家庭内での調理を想定し、卵白、牛乳、小麦を用いた器具について、水洗いのみの洗浄と洗剤を用いた洗浄を行い比較検討した。

II 実 験 方 法

1. 試料の作成

実験材料として、卵白、牛乳、小麦粉を使用した。卵白は卵1個分をビーカーに入れ、攪拌した。牛乳は、100 ml をビーカーに加えた。小麦粉は、10 g をビーカーに加え、20 ml の蒸留水とともに攪拌した。各試料は、洗浄用として水洗い用と洗剤洗い用、およびコントロール用として3種類作成した。

洗浄方法を比較するため、水洗い用は、ビーカーの中身を捨てた後100 ml の蒸留水で3回洗い流したものとし、洗剤洗い用は、中性洗剤を泡立てたスポンジでビーカー全体をよくこすり、蒸留水300 ml で洗い流したものとした(図1)。それぞれの方法で洗浄したビーカーに1

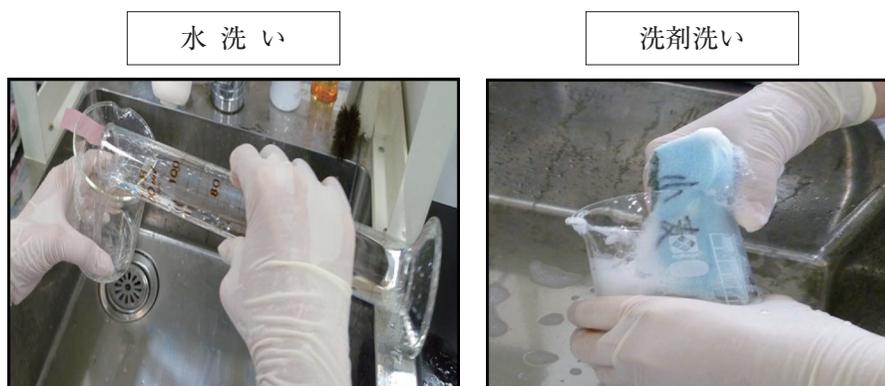


図1 洗浄方法

ml の SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) サンプルバッファーを入れ、各ビーカーから $400 \mu\text{l}$ を採取した。SDS サンプルバッファーは、0.5% ブロモフェノールブルー (終濃度 0.02%)、トリス (終濃度 0.125 M)、ラウリル硫酸ナトリウム (終濃度 0.16 M)、グリセロール (終濃度 2 M) を濃硫酸で pH 6.8 に調整し、尿素 (終濃度 7 M) を加えたものを用いた。採取した試料に $400 \mu\text{l}$ の SDS-PAGE サンプルバッファーと $80 \mu\text{l}$ の 500 mM DTT (SIGMA ALDRICH ; DL-ジチオトレイトール) を加え、 95°C で 5 分間、サーモアルミバスによる加熱処理を行い、実験試料とした。

なお、コントロール用試料として、卵白、牛乳はそれぞれ蒸留水で150倍希釈、20倍希釈したものを用い、小麦は蒸留水で攪拌した試料 0.2 mg を SDS-PAGE サンプルバッファー 1 ml で混合し、20分間の遠心分離の後、得られた上清を用いた。それぞれの試料は、洗浄試料と同様に $400 \mu\text{l}$ 採取し、 $400 \mu\text{l}$ の SDS-PAGE サンプルバッファーと $80 \mu\text{l}$ の 500 mM DTT を加え、 95°C で 5 分間サーモアルミバスによる加熱処理を行い、実験試料とした。

2. 残留タンパク質の検出

洗浄後の器具に残留したタンパク質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に従って、電気泳動を行い確認した。4~20% 5~300 kD SDS-PAGE ゲル (TEFCO 社) は、ウェル内を電気泳動用緩衝液 (トリス、グリシン、SDS の終濃度がそれぞれ 0.25 M, 1.92 M, 1% (w/v) となるよう調整したものを10倍希釈し使用) で洗浄し、200 V, 20 mA で 5 分間プレ泳動した後、マーカーとしてアプロマーカープレステインド Low Range (APRO 社) を $10 \mu\text{l}$ 、各実験試料を $15 \mu\text{l}$ ずつウェルに注入した。泳動は 200 V, 20 mA で70分間行いタンパク質を分離し、CBB ステインワン (ナカライテスク社) にてゲルを染色した。

Ⅲ 実験結果

卵白の主要アレルゲンとして、オボトランスフェリン (76.6 kD), オボアルブミン (45 kD), オボムコイド (28 kD), 鶏卵リゾチーム (14.3 kD) を SDS-PAGE にて検討した結果を図 2 に示す。その結果, 水洗いにおいて, オボトランスフェリン (76.6 kD), オボアルブミン (45 kD), 鶏卵リゾチーム (14.3 kD) のタンパク質に相当するバンドが確認され, また洗剤洗いにおいても鶏卵リゾチーム (14.3 kD) のタンパク質に相当するバンドが確認された。

牛乳の主要アレルゲンとして, カゼインである α -_{s1}カゼイン (23.6 kD), α -_{s2}カゼイン (25.2 kD), β -カゼイン (24 kD), κ -カゼイン (19 kD), γ -カゼイン (12 kD) と, ホエーである α -ラクトアルブミン (14.2 kD), β -ラクトグロブリン (18.3 kD), 血清アルブミン (66.3 kD) を SDS-PAGE にて検討した結果を図 3 に示す。その結果, 水洗いにおいて, β -ラクトグロブリン (18.3 kD), α -_{s1}カゼイン (23.6 kD) もしくは β -カゼイン (24 kD) のタンパク質に相当するバンドが確認された。また, 水洗いと洗剤洗いのいずれにおいても分子量 30 kD 付近にタンパク質のバンドが確認された。

小麦の主要アレルゲンとして, 塩可溶性画分である α -アミラーゼ/トリプシンインヒビターファミリー (15 kD), アシル CoA オキシダーゼ (27 kD), フルクトース-ビスフォスフェイトアルドラーゼ (35 kD) と, 塩不溶画分であるグリアジン α (30 kD), β (30 kD), γ (30 kD), slow- ω (60 kD), fast- ω (60 kD), ϵ -5 (Tri a 19) (48 kD), グルテニン HMW (95~136 kD), LMW (36~44 kD) を SDS-PAGE にて検討した結果を図 4 に示す。その結果, 水洗いにおいて, 塩可溶性画分であるアシル-CoA オキシダーゼ (27 kD), フルクトース-ビスフォスフェイ

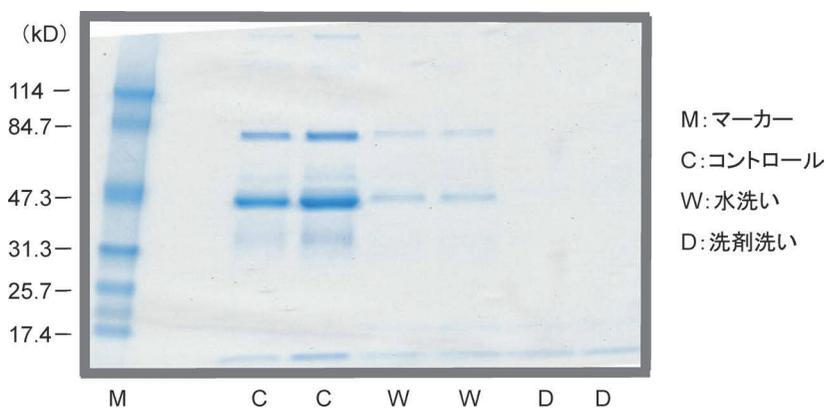


図 2 卵白の SDS-PAGE

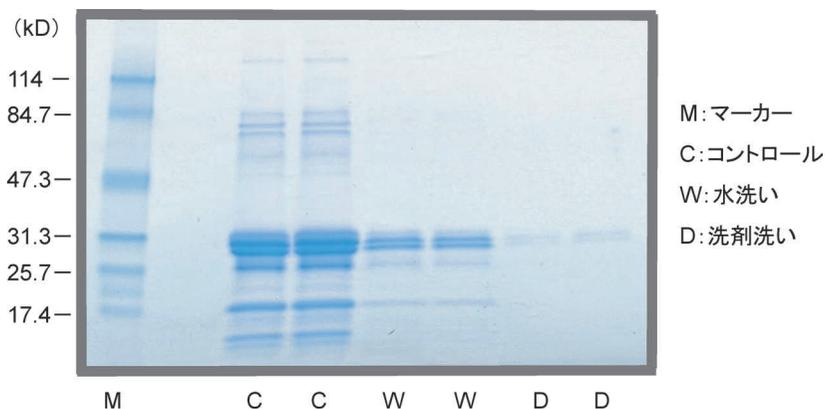


図3 牛乳の SDS-PAGE

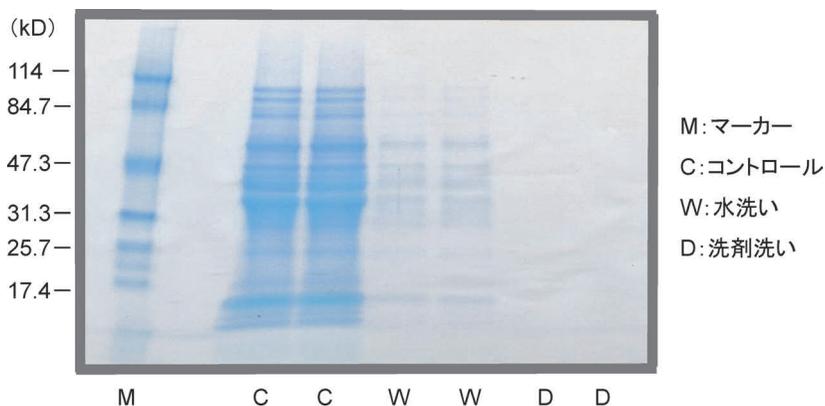


図4 小麦の SDS-PAGE

トアルドラーゼ (35 kD) と、塩不溶性画分であるグリアジン α , β , γ (30 kD), slow- ω , fast- ω (60 kD), ω -5 (Tri a 19) (48 kD), グルテニン HMW (95~136 kD), LMW (36~44 kD) のタンパク質に相当するバンドが確認された。一方、洗剤洗いにおいて、タンパク質のバンドは確認されなかった。

IV 考 察

洗浄条件の違いがアレルギーの残留に及ぼす影響について、電気泳動法を用いて検討を行った。その結果、卵白では水洗いのみを行った場合は主要アレルギーの鶏卵リゾチーム、オボアルブミン、オボトランスフェリンの残留が確認されたが、洗剤洗いでは鶏卵リゾチームのみバ

ンドが確認された。これは卵白のタンパク質には水溶性のものが多くに対し、鶏卵リゾチームは疎水性であるため、他のアレルゲンよりも残留されやすかったのではないかと考えられる⁶⁾。

牛乳では、水洗いにおいて主要アレルゲンのうち、 β -ラクトグロブリン、 α -_{s1}カゼインもしくは β -カゼインのバンドが確認された。 β -ラクトグロブリンと α -_{s1}カゼインはアレルゲン性が最も強く、牛乳アレルギー患者の82%が β -ラクトグロブリン、43%が α -_{s1}カゼインに対して反応することが報告されている⁶⁾。これらのアレルゲンは牛乳中の含有量が多く、 β -ラクトグロブリンはホエー中の50%、 α -_{s1}カゼインはカゼイン中の35%を占めているため、水洗いにおいてはこれらのバンドが発現したと考えられる。一方、水洗いと洗剤洗いのいずれにおいても30 kD付近でバンドが確認された。このバンドに相当するタンパク質は、カゼインの集合体であると考えられる。カゼインの分子量は20~25 kD付近であるが、牛乳中では各カゼイン成分はモノマーの形ではなく、カゼインミセルを形成し存在している。そのため、本実験ではこのカゼインのサブミセルが分離されず、30 kD付近の分子量の形で残存したものであると推察される。したがって、洗剤洗いにおいてもアレルゲンが残存している可能性は否定できない。

小麦では、水洗いにおいてほぼすべての主要アレルゲンのバンドが確認された。この原因のひとつとして、小麦粉に含まれるグリアジンは水を吸水することで、粘着性を生じる性質があるため、他の試料に比べ、ビーカーに付着しやすかったと考えられる⁷⁾。一方、洗剤洗いにおいてバンドは確認されなかった。これは、本実験試料のそれぞれのタンパク質含有量が、卵白3.2 g、牛乳3.3 gであるのに対し、小麦粉は0.8 gであり、小麦粉のタンパク質含有量が他の2つの試料に比べ少なかったことも原因であると考えられる。

本実験では、水洗いにおいて卵白、牛乳、小麦すべての試料でバンドが確認され、洗剤洗いにおいては卵白、牛乳でバンドが確認された。本実験で行ったCBB染色のタンパク質の検出限界は一般的に0.01 μ g程度とされており、食物アレルギーを診断する方法として用いられる食物経口負荷試験では、食物の初回負荷量は数 μ gから行われ、その中に含まれるタンパク質量はより少量である^{8,9)}。これらのことから、本実験においてバンドが確認されたことは、アレルギー症状を引き起こすために十分なアレルゲンが残存していたと考えられる。

以上の結果より、コンタミネーションによるアレルギーの発症を防ぐためには、水洗いだけでは不十分であり、洗剤を使用し徹底した洗浄が重要であることが示唆された。また、消費者庁のアレルギーハンドブックによると「製造業の監視に際しては、使用した機械器具類は、十分に洗浄などを行ない、特定原材料のコンタミネーションが起きないように指導すること」と示されている⁵⁾。このことから、洗浄がコンタミネーションを防ぐ上で重要な工程のひとつであることが分かる。しかし実際は、工場や家庭内で使用される機械器具類や食器でのコンタミネーションが原因でアレルギー症状が引き起こされた事例が報告されている。これらのことか

ら、企業や施設、家庭内においてもコンタミネーションやコンタミネーション防止のための洗浄に関する知識・情報が不足しているのではないかと考えられる。今後は、情報を提供する機会を増やすことで、食物アレルギー保有者も非保有者もアレルギーやコンタミネーションに関する正しい知識を共有し、洗浄の重要性についての理解を広めることが望まれる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なるご助言を賜りました坂井堅太郎先生に感謝を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Sampson HA: Food Allergy. *JAMA* **278**: 1888-1894, 1997.
- 2) 日本小児アレルギー学会 食物アレルギー学会：食物アレルギーの定義と分類，食物アレルギー診療ガイドライン 2005，向山徳子・西間三馨監修，協和企画，東京（2005）6-7.
- 3) 伊藤節子：指導 栄養指導，年代別アレルギー疾患への対応，五十嵐隆編，中山書店，東京（2009）240-243.
- 4) Huggett AC, Hischenhuber C: Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. *Allergy* **53** (Suppl 46): 89-92, 1998.
- 5) 消費者庁：アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック（平成22年3月改訂）
- 6) 穂山 浩：アレルギー誘発物質，抗アレルギー食品開発ハンドブック，小川 正，篠原和毅，新本洋士編，サイエンスフォーラム，東京（2005）19-55.
- 7) 山崎清子，島田キミエ，渋谷祥子，下村道子：穀類の調理，新版 調理と理論，同文書院，東京（2008）44-142.
- 8) 奥村宣明：電気泳動法 ポリアクリルアミドゲル電気泳動，タンパク質実験ノート下 分離同定から一次構造の決定まで，岡田雅人，宮崎 香編，羊土社，東京（1996）15-25.
- 9) 木村彰宏：食物アレルギーの治療 除去食治療の解除，食物アレルギーの治療と管理 改訂第2版，小林陽之助，金子一成編，診断と治療社，東京（2008）60-67.