

氏名（本籍）	くりす くらた かおり 栗栖（倉田） 香織（広島県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 363 号
学位授与の日付	令和元年 7 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	魚類アレルギーにおける主要アレルゲンのアレルゲン性および低アレルゲン化手法の有効性に関する検討
論文審査委員	（主査）教授 土橋 朗 教授 早川 磨紀男 教授 田野中 浩一 教授 高木 教夫

論文内容の要旨

緒論

食物アレルギー（FA）とは「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」をいう。魚や甲殻類の摂取により生じる魚介アレルギーの発症頻度は日本や東南アジア、北ヨーロッパ、スペインなど、食餌における魚介類の摂取量が多い地域ほど高い。日本では魚介類は主菜の一つであり、中でも魚肉は、n-3系多価不飽和脂肪酸やビタミンD、米に不足するリジンやヒスチジンを補うことができる重要な栄養源である。広範な魚類の摂食制限は、患者の栄養状態の悪化が懸念される。かつてのFAの診療は、アレルギーを誘発する疑いのある食品を画一的に避けることを中心とした。しかし、卵や牛乳、小麦に関する一連のアレルゲン研究の進展により、FAの診療は、アレルゲンを特定し必要最小限の除去を目指す、「食べることを指導する」ものに変化してきている。日本では、2002年に加工品に対するアレルギー物質を含む食品表示制度が世界に先駆けて開始された。2016年には、アレルギー疾患を有する患者がその予防と症状軽減のための知識を得て、等しくアレルギー疾患医療を受けられるよう、アレルギー疾患対策基本法が施行された。

魚類アレルギーの主要アレルゲンは、筋形質タンパク質であるパルブアルブミン（PA）および筋原繊維タンパク質であるコラーゲンである。食用とされている魚類が非常に多く、PAは魚種間で交差抗原性が認められることから、魚類アレルギーでは、摂取可能な魚を見極めることが難しい。アレルゲンタンパク質に存在するエピトープにおける変性や消化は、IgE抗体の結合能を低下させる。しかし、魚類アレルギー患者のための、低アレルゲン化あるいは最小限にアレルゲンタンパク質を除去した水産加工品の開発には至っていない。

原因食品（アレルゲン）の正確な診断は、安全性の確保、必要最小限の原因食品の除去、患者と家族のQOLの維持を目的とする栄養指導の最も重要な前提である。魚類アレルギー患者の支援のためには、アレルギーを起こしにくい魚種の情報を蓄積し、低アレルゲン化食品を開発する

だけでは不十分である。患者や周囲の人の不正確な知識は、正確な診断と的確な栄養指導の妨げになる。正確な診断に大きな役割を担う問診を有意義なものにするために、FA の症状やアレルゲンに対する知識に関する特徴を明らかにすることが必要である。このような背景から、本研究は、魚類アレルギー患者への対策・支援のために、多様な魚種のアレルゲンに関する情報のデータベース化と低アレルゲン化手法の確立のための基礎的な検討に加え、FA に関わる適切な情報提供のあり方の検討を目的とする。

第1章 魚種による魚肉中に含まれる PA の IgG 反応性の違いに関する検討

魚類アレルギー患者が安全に食することができる魚種を探索する際に有用なアレルゲン性に関する情報を集積することを目的として、日本全国で食用とされている 128 魚種の魚肉中に含まれる PA の含有量、および、IgG 反応性の魚種による違いを市販抗体を用いる ELISA 法により評価した。

サケ科 12 魚種の比較検討により、イトウの IgG 反応性が最も高く、シロザケが最も低いことを明らかにした。サケ科の魚は、海へ出ることなく一生を川で過ごす陸封型の生活史を有するものと、川で生まれて海で生活する降海型の生活史を有するものに大別される。本研究では 3 対の降海型と陸封型のペア、すなわち、ヒメマスとベニザケ、ヤマメとサクラマス、ニジマスとサーモントラウトについて検討した結果、いずれも陸封型の魚種において、IgG 反応性が高いことを明らかにした。サケもマスもサケ科の魚種であり、マスはサケよりも IgG 反応性が高い傾向にあるにもかかわらず、現在のアレルギー表示制度ではマスは表示義務も推奨もされていない。こうした表示制度は魚類アレルギー患者に危険を及ぼす可能性がある。

さらに、大型の 7 魚種を用いて、部位依存性を検討した結果、外洋に生息するクロマグロやマスノスケは、頭部の IgG 反応性が高く、尾部の IgG 反応性が低かった。一方、底生魚であり、全躯運動をするハモやナマズにはそうした部位依存性は見られなかった。

124 魚種を対象として行なったスクリーニングの結果、キハダ、カマスサワラ、シロサバフグ、マンボウ、シラウオ、マカジカは PA 含有量が極めて少なかった。また、ヨシキリザメ、マカスベ、カワヤツメも PA の IgG 反応性が低かった。精製した PA で検量線を作成し、魚肉に含まれる PA の含有量を測定した結果、シログチは 17.6 mg/g ($R^2=0.97$)、シロザケは 6.1mg/g ($R^2=0.96$)、トキシラズは 4.9mg/g ($R^2=0.97$)、シシャモは 5.9 mg/g ($R^2=0.99$)であった。

これらの結果から、PA が少ない魚種あるいはアレルゲン性が非常に弱い PA を有する魚種を予測し、これらの魚種を用いることにより、食物経口負荷試験の実施における症状誘発のリスクを低下させる可能性を示した。

第2章 カタクチイワシ魚肉に含まれる PA およびコラーゲンの酵素処理による IgE 反応性の低減化に関する検討

プロテアーゼを用いた低アレルゲン化の有効性を明らかにすることを目的として、カタクチイワシの魚肉を食品製造加工用の 7 種の酵素で処理し、得られた魚肉エキス中の PA およびコラーゲンの IgG 反応性および IgE 反応性を ELISA 法および阻害 ELISA 法により評価した。

酵素 1 (ウマミザイム G), 酵素 2 (プロテアーゼ M アミノ G), 酵素 7 (フレーバーザイム) はエンドペプチダーゼ活性とエキソペプチダーゼ活性を有しているが, 得られたペプチドは低アレルギー化されていなかった。一方, エキソペプチダーゼ活性がない酵素 4 (アルカラーゼ), 酵素 5 (プロタメックス), 酵素 6 (ニュートラーゼ) は, 酵素 7 とあわせて用いることでコラーゲンのアレルギー性を低下させた。酵素 4 (アルカラーゼ) と酵素 7 (フレーバーザイム) を組み合わせることで, PA とコラーゲンの両アレルギー性を低下させることができた。アレルギー性の低減化効果の大きさは, 酵素消化により得られた分解産物であるペプチドの分子量には依存せず, アレルギータンパク質の抗体認識部位, すなわちエピトープ部位を消化する酵素の基質特異性に依存することが示唆された。分子量分布が 1 kDa 以下のペプチドを主成分とする低アレルギー化エキスを, 苦味やヒスタミン含有量の増加を招くことなく, 工業的に調製できることを示した。

これらの結果から, 食品製造加工用酵素を用いて工業的工程に基づき得られた魚肉エキスは, 低アレルギー化食品としてより多くの患者に提供できることを示した。

第 3 章 水晒し・肉挽き・KCl 水溶液による魚肉中の PA およびコラーゲンの除去効果を活用した低アレルギー化かまぼこの調製

水晒し, 肉挽き, KCl 水溶液によるアレルギータンパク質の除去の有用性を明らかにすることを目的として, 魚肉を原料とする水産加工品の IgE 反応性の評価と, 家庭などで実践可能なスケトウダラすり身からの低アレルギー化かまぼこの調製法の検討を行なった。

市販されている 8 種類の練り製品のうち, 蒸しかまぼこ製品は PA 反応性およびコラーゲン反応性の患者血清の反応がいずれも弱かった。また, イワシを原料とした製品は, いずれの患者血清にも反応を示した。カタクチイワシあるいはイワシのアレルギー性は, シログチやスケトウダラと比較すると, 加熱調理での除去が難しいと考えられた。そこで, 本研究における低アレルギー化かまぼこの素材には, かまぼこ製品の原料としても一般的であるスケトウダラを選定した。

魚肉中の PA 量は水晒しの前後で, 5.4 mg/g から 2.1 mg/g に減少したことから, 20 倍量の水を用いた 1 回の水晒しによる PA の低減化効果は 61.1% 減少であった。さらに, 繰り返しの水晒しにより, 0.7, 0.3, 0.2 mg/g と順次減少し, 5 回目の水晒し後は 50 μ g/g となった。PA は水への溶解度が高く, 水晒しを繰り返すことで魚肉中の PA 含有量を検出限界以下に低下させることができることを示した。肉挽き機を用いた方法では, コラーゲンの IgG 反応性を大きく低下させることができず, PA 除去のための水晒し工程と比較すると低アレルギー化の有効な手法であるとは言い難かった。KCl 水溶液に溶解性が高いアクトミオシン (AM) を抽出し, CaCl_2 により塩析して得られた AM 画分の利用は, 高いコラーゲンの除去効果が期待されたが, 同時にコラーゲンの変性によるアレルギー性の増加が見られた。そこで, 洋上で処理されている SA 等級の洋上すり身を用いて AM 画分を調製した結果, PA に対する IgG 反応性がほぼ消失し, コラーゲンの IgG 反応性も大きく低下した。洋上すり身からの AM 画分を用いて調製したかまぼこのゲル強度は 245 g/cm² であり, デンプンの添加により弾力性を改善することで, より食感を楽しめると考えられた。

これらの結果から, 水晒し, 肉挽き, そして KCl 水溶液による AM 画分の抽出法は, 魚肉から

アレルギータンパク質を効果的に除去する方法として有用であり、これらの処理を組み合わせることで、制限食による制約を軽減することができる低アレルギー化食品を、目的に応じて魚種や手法を選んだ上で、調理・加工により調製できることを示した。

第4章 食物アレルギー歴の聞き取りで想定される患者発話に関する意識・実態調査

非医療関係者の FA の症状やアレルギーに対する知識に関する特徴を明らかにし、正確な診断のために不可欠な正しい情報を普及することを目的として、Web アンケートを実施した。その結果を解析するとともに、質問投稿サイトの投稿文を自然言語処理技術に基づくテキストマイニング手法により解析した。

表示義務がある食品のアレルギーとしての認知率は非常に高いのに対し、魚類の認知率は約 7 割であった。今回検討した 3 魚種（サケ、サバ、マグロ）の中で、サケの認知率は最も低く、第 1 章で指摘したサケ科魚類の表記についてはより積極的な情報提供が必要である。

FA の「症状」の認知率は、「原因食品」と比較すると高くなかった。回答のばらつきは少なく、皮膚症状、消化器症状、アナフィラキシーのいずれかの回答に集約された。「調理加工」による低アレルギー化について全く知らない人が全体の 45.3% 存在した。こうした理解不足は、症状を経験した食品を徹底的に除去する行動に向かわせやすいと考えられた。また、自身の子供の経験した FA の経験を説明する際には、言語量が増え、情報充足率も向上していた。

「診断」に関する情報に対するニーズが 48.8% と最も高かった。「啓発活動」に対するニーズは FA では 31.9% であり、他のアレルギー疾患と比較してそのニーズが大きかった。

これらの結果から、時代とともに変わる FA 情報を、世代を超えて正しく伝えていくことが、正しい診断と適切な栄養指導を必要としている FA 患者への大きな支援となることを示した。

結論

魚類アレルギー患者が安全に食することができる魚種を探索する際に有用な IgG 反応性に関する情報として、日本全国で食されている 128 魚種を相対的に比較することができる情報を得ることができた。IgG 反応性は生物学的な近縁種であっても異なること、生育環境や生活史により異なること、同一個体においても部位依存的な違いがあることを明らかにした。食品製造加工用のプロテアーゼを用いた低アレルギー化魚肉エキスの調製と、水晒し、肉挽き、KCl 水溶液による抽出を組み合わせた方法を用いた低アレルギー化かまぼこの調製を行うことで、低アレルギー化に寄与するアレルギータンパク質の低分子化あるいは除去のための手法を確立することができた。正確な診断に不可欠な正しい情報を普及するための情報として、FA の症状やアレルギーに対する知識の普及の状況と FA の情報におけるニーズを明らかにした。

【研究結果の掲載誌】

1. Kurata *et al.*, *J. Cookery Sci. Japan*, **52**, 147-158 (2019)
2. Kurata *et al.*, *J. Cookery Sci. Japan*, **51**, 205-216 (2018)
3. Kurata *et al.*, *J. Cookery Sci. Japan*, **50**, 141-150 (2017)

論文審査の結果の要旨

食物アレルギーの診療の方針は、対象食品を一切口にしない完全除去から、アレルゲンを特定し、必要最小限の除去を目指すものへと変化している。魚類アレルギーの主要アレルゲンはパルブアルブミンとコラーゲンである。しかし、パルブアルブミンは魚種間で交差抗原性があること、特異的 IgE 抗体価検査が一部の魚種の粗抽出液でしか行えないことから、現状では、魚類アレルギー患者に適応となる最小限にアレルゲンを除去した食品の開発には至っていない。魚類アレルギー小児が一切の魚を口にしないことは、成長に必須で、魚類に豊富な n-3 系脂肪酸の欠乏に繋がるため、低アレルゲン化魚肉製品の開発は重要な意義を持つ。さらに、魚類アレルギー患者の中でも、その原因が魚肉タンパク質であるかどうかの十分な検討は行われておらず、非医療者・医療者を含めて魚類アレルギーの理解は十分ではない。そこで、本研究では魚類アレルギー患者の食生活を支援するため、128 魚種のアレルゲンに関する情報を収集し、さらに調理加工による低アレルゲン化の手法を検討した。また、広く食物アレルギーに関して、患者やその家族に対する適切な情報提供のあり方を検討した。

第 1 章では、魚類アレルギー患者が安全に食せる魚種を探索するため、日本全国で食される 128 魚種の魚肉中に含まれるパルブアルブミン量、パルブアルブミンの IgG 反応性と IgE 反応性を ELISA 法により評価した。その結果、魚肉中のパルブアルブミンの IgG 反応性は生物学的な近縁種であっても異なること、魚類の生育環境や生活史により異なること、同一個体においても部位により異なることを明らかにした。また、キハダなどの魚類はパルブアルブミン含有量が極めて少なく、ヨシキリザメなどの魚種ではパルブアルブミンの反応性が低いことを明らかにした。これらの魚種を用いることにより、食物経口負荷試験の実施における症状誘発のリスクを軽減できる可能性を示した。

第 2 章では、カタクチイワシの魚肉を各種の食品製造加工用のプロテアーゼで処理し、魚肉中のパルブアルブミンとコラーゲンの IgE 反応性が低下することを阻害 ELISA 法により評価した。この評価に基づき、エンドペプチダーゼ活性とエキソペプチダーゼ活性を有する酵素を組み合わせることにより、魚肉の低アレルゲン化を達成した。本法は、低アレルゲン化魚肉の工業的な製法になりえると考えられる。

第 3 章では、魚肉の水晒しによるパルブアルブミンの除去効果、肉挽きによるコラーゲンの除去効果、および塩化カリウム水溶液処理による両アレルゲンの除去効果を検討した。その結果、スケトウダラすり身からアクトミオシン画分を抽出することで、通常の製品と類似の弾力性のある低アレルゲン化したかまぼこが作成できることを明らかにした。家庭での小規模な低アレルゲン化かまぼこの製法として有用であると考えられる。また、得られた低アレルゲン化かまぼこにより、アレルゲンに対する食物経口負荷試験の実施を可能とした。

第4章では、食物アレルギーの症状とアレルゲンに対する非医療者の認知の状況と食物アレルギーの情報に対するニーズを明らかにするため、Web アンケートを実施し、解析した。さらに、食物アレルギーに対する質問投稿サイトの投稿文を自然言語処理技術に基づくテキストマイニング手法で解析した。その結果、魚類アレルギーに対する認知率は7割ほどであり、本調査で検討したサケ、サバ、マグロの中で、サケのアレルゲン性は高いにも関わらず、その認知率は低く、魚類アレルギーの発症に関わる積極的な情報提供が必要であることを明らかにした。また、食物アレルギーは「調理加工」によって低アレルゲン化できることを知らない人が全体の半数程度おり、こうした理解不足が症状を経験した食物を徹底除去する行動に走らせる可能性を示した。

以上、本論文は、魚類アレルギー患者の魚類摂取を支援することを目的として、多様な魚種のアレルゲンに関する情報を収集・統合し、低アレルゲン化手法を確立し、さらに食物アレルギーに関わる適切な情報提供のあり方を明らかにしたもので、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。