

# エミュー卵のアレルゲン性および免疫療法への応用に関する 基礎的検討

財団法人神奈川科学技術アカデミー・研究リーダー 板垣 康治

## ■ 緒 言

現在、日本人の3人に1人は何らかのアレルギー症状を有すると報告されており、アレルギーは国民病の様相を呈している。アレルギーのなかでも食物アレルギーは、われわれが日常的に摂取している食物を突然食べることができなくなる疾患で、特に乳幼児や学童においては、正常な発育に対する影響も懸念され重大な問題となっている。食物アレルギーの原因となる食品は実に多彩であり、食べるものすべてがアレルゲン(アレルギーの原因物質)になるといっても過言ではない。乳幼児期では卵、牛乳によるアレルギー患者が原因食品の5割以上を占めており主要なアレルゲンとなっている。アレルゲンとなるのは通常、原因食品中に含まれる特定のタンパク質である場合が多く、鶏卵のアレルゲンとしては、オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチームなどが知られている。なかでもオボムコイド、オボアルブミンは鶏卵アレルギーの重要な指標とされている<sup>1,2)</sup>。鶏卵によるアレルギーは、小学校に入学するころには患児の7、8割は食べても症状が出なくなる(耐性を獲得する)ことが多いといわれている。一方で、小学校に入学後も耐性を獲得できずに卵を食べることができない児童も見られる。卵は栄養価も高く、古くから離乳食としても利用され、また加工食品の素材として広く使われているため、卵アレルギーになると、著しく患者のQOLを低下させる。

このような状況を踏まえて、我々は鶏卵アレルギーであっても安全に食べることができる鳥卵を見出し、鶏卵の代替として応用することを目的として、ニワトリ(2種)、ウズラ、ウコッケイ、ホロホロ鳥、アヒル、ダチョウ、エミューの8種の卵について、アレルゲン性を調べた。その結果、走鳥類であるダチョウ、エミューでは、他種と比べて、いずれのアレルゲン(オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチーム)についても電気泳動(SDS-PAGE)でのパターンが異なり、また、鶏卵アレルギー患者血清を用いたイムノブロッティングの結果より、アレルゲン性も低い可能性が示唆された。特にエミュー卵では、患者血清に対する反応性が低かった(図1)。

そこで、本研究では、エミュー卵について、生化学、栄養学、食品化学、免疫学、臨床医学的な観点から鶏卵と比較して違いを詳細に検討し、エミュー卵の鶏卵アレルギー患者に対する代替食品、さらに、免疫寛容の誘導を目的とした治療への応用の可能性について検討することを目的とする。

## ■ 方 法

### 加工特性

#### ・卵黄、卵白重量および pH

割卵、卵黄と卵白を分画後、天秤にて重量を測定し、その後、各画分をよく混合し、pHを測定した。

#### ・卵白の粘性

割卵、卵黄と卵白を分画後、卵白部分を利用し、振動式粘度計に供した。なお、測定法は機器のマニュアルに従った。

#### ・熱凝固性

全卵混合液を試料とし Rapid Visco Analyzer(RVA)にて分析を行った。また、卵白、卵黄を示差走査熱量計(DSC)にて試験を行った。なお、方法は機器添付のマニュアルに従った。

#### ・卵白の気泡性

分離した卵白を自動泡立て器にて混合して気泡を形成させ、その後、経時的に体積変化を測定した。

#### ・卵黄の乳化性

大豆油に同量の1%卵黄水溶液を混合、遠心分離したものを試料とし、顕微鏡観察を行った。

### 構成タンパク質

#### ・卵白の電気泳動

分画した卵白タンパク質を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った。

#### ・各タンパク質の同定

電気泳動後の各タンパク質をプロテインシークエンサーにて N 末端アミノ酸配列を決定した。その

結果をもとに相同性検索を行った。鶏卵白およびエミュー卵白の凍結粉末を生食で希釈し、各 10mg/ml の抗原液を作製した。

#### 皮膚試験

作製した抗原液(鶏卵およびエミュー卵の抗原液)と、陽性コントロールとしてヒスタミン二リン酸塩 10mg/ml、陰性コントロールとして生食を、プリックランセット針を用い、患者の前腕屈側にプリック試験を行い、15 分後の膨疹の大きさを測定した。

#### 好塩基球活性化

患者から採血した好塩基球と 4 段階の各抗原濃度(0.1mg/ml ~ 0.0001mg/ml)のエミューと鶏の卵白抗原を、抗 IgE 抗体(陽性コントロール)、PBS(陰性コントロール)に 37°C 15 分間反応させたあと Flow Cytometry Analysis (FACS) を用いて CD203c と CD63 を測定し、好塩基球の活性化を比較した。

#### リンパ球刺激試験

患者のリンパ球をエミュー卵白、鶏卵白抗原と 1 週間培養し、増殖した CD4 陽性細胞質内サイトカイン (IFN, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-5) の測定を行った。

#### 対象患者

90°C 100 分加熱した鶏卵の凍結粉末を卵 1/500 個相当分を摂取しただけでアレルギー反応をきたす重症鶏卵アレルギー患者に対し、本研究の内容、方法を十分に説明し十分な理解(インフォームドコンセント)を得て、自由意思に基づく同意が得られた者のみを今回の研究対象とした。

### ■ 結果

#### 加工特性

##### ・卵黄、卵白重量および pH(表 1)

重量ではエミュー卵は鶏卵に比べ約 10 倍の値を示した。また、鶏卵と異なり、卵白より卵黄の構成比率が高く、約 2 倍の値であった。また、pH は卵白、卵黄で同様の値(pH)を示し、こちらも鶏卵の卵白が酸性、卵黄がアルカリ性と異なっていた。

##### ・卵白の粘性

スパーテルでエミュー卵白を引き上げると、大量の卵白が引き上げられた。鶏卵とは異なる状況であった(図 2)。また、卵白の粘度測定の結果、鶏卵に比べて約 3 倍の高い粘性を示していた(図 3)。

##### ・卵の熱凝固性

RVA の結果、75°C 付近で熱凝固性を示す鶏卵と異なり、70°C 付近で凝固が始まった(図 4)。また、75°C では完全に凝固していることが確認された。DSC の結果、卵白では約 42°C よりピークが検出され、その後、温度上昇とともに複数のピークが確認された(図 5)。また、出現したピークの中には鶏卵と異なるものも存在した。卵黄では、明確なピークが観察されなかった。

##### ・卵白の気泡性

気泡容積は経時的に低下し、7 分後では 30 秒後の半分以下まで下がった。30 秒後の容積が鶏卵より高い一方、7 分後は低い値となった(図 6)。

##### ・卵黄の乳化性

鶏卵が気泡の大きさや形が不定であるのに対し、エミュー卵は大きさ、形ともに比較的安定であった(図 7)。

#### 構成タンパク質

##### ・卵白の電気泳動

電気泳動の結果、エミュー卵白タンパク質は鶏卵とは異なるタンパク質バンドパターンを示した(図 8)。また、鶏卵のリゾチームと同位置にバンドは確認されなかった。

#### ・各タンパク質の同定

電気泳動にてメジャーなタンパク質バンドのN末解析の結果、主要タンパクは高分子側から、オボアルブミン、オボトランスフェリン、テンブ、オボムコイドと考えられた(表2)。

#### 皮膚試験

エミュー卵白抗原、鶏卵白抗原ともに陽性で両抗原間の膨疹の大きさに差はみられなかった(表3)。

#### 好塩基球活性化試験

いずれの濃度においてもエミュー卵白において好塩基球活性化の低下がみられた(図9)。

#### リンパ球刺激試験<sup>3,4)</sup>

いずれの抗原刺激にもT細胞増殖がみられ、増殖したサイトカインのパターンに違いは見られなかった(図10、11)。

### ■ 考 察

全卵重および卵黄・卵白比ともに鶏卵とは異なっていたが、これは成体の体重、体型、生息地が異なり、さらに、生物系統的にも異なることに起因すると考える。また、pHの相違は、可溶物の相違を意味し、以後の各種性質の変化に結びつくものと考え。卵白の粘性や卵の凝集性、卵白の気泡性の結果は後の電気泳動の結果より、含まれるタンパク質が異なったため、これらの性質がエミュー卵と鶏卵で異なったものと思われる。さらに、卵黄の乳化性はエミューの方が高かったため、加工食品への利用に期待が持たれる。タンパク質の電気泳動の結果、エミュー卵白にはリゾチームが含まれないことが明らかとなった。リゾチームはグラム陽性細菌の細胞壁分解酵素であるため、含まれることにより細菌による腐敗を防ぐことができる。これが含まれないのは、強固な外殻により必要性が低下し、進化の過程で欠失したか、別な抗菌物質が含まれ、やはり必要ないのか分からないが、さらなる研究が必要と考える。

今回、鶏卵アレルギー患児でも、エミューの卵は鶏卵の代替として安全に食べることができることを検討するため、重症卵アレルギー患者に対して、皮膚試験、好塩基球活性化試験、リンパ球刺激試験を行った。皮膚試験とリンパ球刺激試験の結果はエミュー卵白抗原と鶏卵白抗原に違いはみられなかった。また、リンパ球刺激試験ですべての抗原に対して反応がみられた理由としては、この患者が重症の卵アレルギーだけでなく牛乳アナフィラキシーの既往もあり、そのためカゼイン刺激にも反応したと思われた。一方、好塩基球の反応性で鶏卵白刺激に比べエミュー卵白で活性化の低下がみられた。皮膚試験と好塩基球活性化試験の結果が違った理由に関して、今回のデータからは推測することはできなかった。しかし、好塩基球活性がエミュー卵白で低下していたことは、エミュー卵白が重症鶏卵アレルギー患者においても安全に食べられる可能性を示唆していると思われる。この点を明らかにするために今後、経口負荷試験で安全性を確認することが必要である。また、今回の結果から患者数を増やして同様に検討する価値があると考えられた。またリンパ球刺激試験で違いが見られなかったことから免疫療法に活用できる可能性も示唆された。

### ■ 要 約

鶏卵アレルギー患者血清を用いたイムノブロットリングの結果により、エミュー卵は、アレルギー性が低い可能性が示唆されている。

そこで、本研究では、エミュー卵に関して、鶏卵の代替として鶏卵アレルギー患者に対する代替食、さらに、免疫寛容の誘導を目的とした治療食としての可能性について検討することを目的として、生化学、栄養学、食品化学、免疫学、臨床医学的な観点から鶏卵と比較し違いを詳細に検討した。

生化学、栄養学、食品化学的な検討では、全卵重および卵黄・卵白比ともに鶏卵とは異なっていたが、これは成体の体重、体型、生息地が異なり、さらに、生物系統的にも異なることに起因すると考えられた。卵白の粘性や卵の凝集性、卵白の気泡性の結果は後の電気泳動の結果より、含まれるタンパク質が異なったため、これらの性質がエミュー卵と鶏卵で異なったものと思われる。さらに、卵黄の乳化性はエミューの方が高かったため、加工食品への利用に期待が持たれる。タンパク質の電気泳動の結果、エミュー卵白にはリゾチームが含まれないことが明らかとなった。

皮膚試験とリンパ球刺激試験の結果はエミュー卵白抗原と鶏卵白抗原に違いはみられなかったが、好塩基球の反応性で鶏卵白刺激に比べエミュー卵白で活性化の低下がみられた。皮膚試験と好塩基球

活性化試験の結果が違った理由に関して、今回のデータからは推測することはできなかったが、好塩基球活性がエミュー卵白で低下していたことは、エミュー卵白が重症鶏卵アレルギー患者においても安全に食べられる可能性を示唆していると思われる。またリンパ球刺激試験で違いが見られなかったことから免疫療法に活用できる可能性も示唆された。

これらの点を明らかにするために今後、経口負荷試験で安全性を確認することが必要である。また、今回の結果から患者数を増やして同様に検討することにより、さらに客観的に有用性を評価する必要があると考えられた。

## ■ 文献

1. Ando H, Movérare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres M, Urisu A, (2008) Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 122, 583-588.
2. Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada J, (2005) Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32.
3. Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kato M, Kurahashi H, Urisu A, Asano Y, (2008) Up-regulated cytokine inducible SH2-containing protein expression in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy*, 1493-1506.
4. Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A, (2007) Allergen-specific T-cell Response in Patients with Phenytoin Hypersensitivity; Simultaneous Analysis of Proliferation and Cytokine Production by Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Dilution Assay. *Allergy International.*, 56:149-155.

表 1 卵黄および卵白の重量と pH

		エミュー	ニワトリ
重量 (g)	全卵	612	63
	卵白	178	34
	卵黄	297	16
pH	卵白	7.5	6.2
	卵黄	7.5	8.3

表 2 各バンドの N 末端アミノ酸配列を決定し、相同性検索した結果

Band	Identified as	MW (kDa)	Approximate proportion (%)
A	ovalbumin	102	15
B	ovotransferrin	78	33
C	tenp	52	16
D, E, F	ovomucoid	39, 34, 30	7
others	-	-	29
			Total 100

表3 各抗原による皮膚試験

	膨疹(短径×長径)
エミュー卵白	5×3
鶏卵白	5×6
ヒスタミンニリン酸塩	5×3
生食	0×0

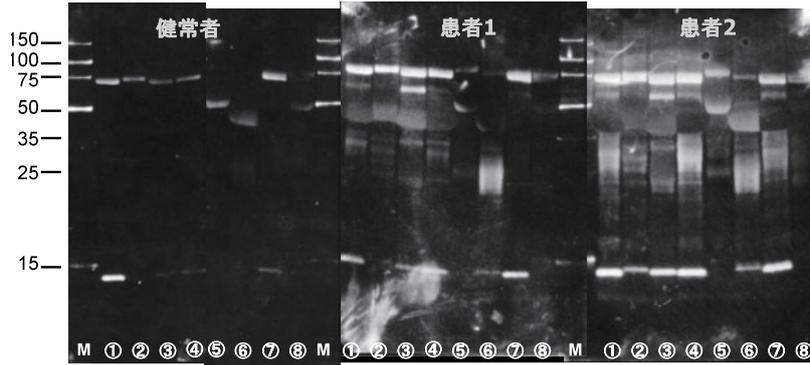


図1 8種の鳥卵卵白に対する鶏卵アレルギー患者血清の反応性(イムノブロッティング)

M; マーカー、①ニワトリ、②ホロホロ鳥、③ウズラ、④ウコッケイ、⑤ダチョウ、⑥アヒル、⑦アローカナ(ニワトリ)、⑧エミュー

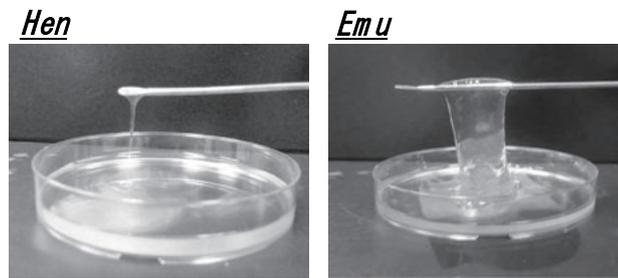


図2 卵白をスパテールで引き上げた様子

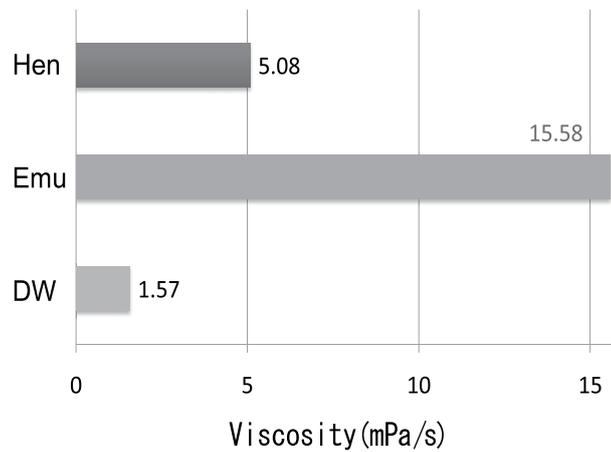


図3 卵白粘度の結果

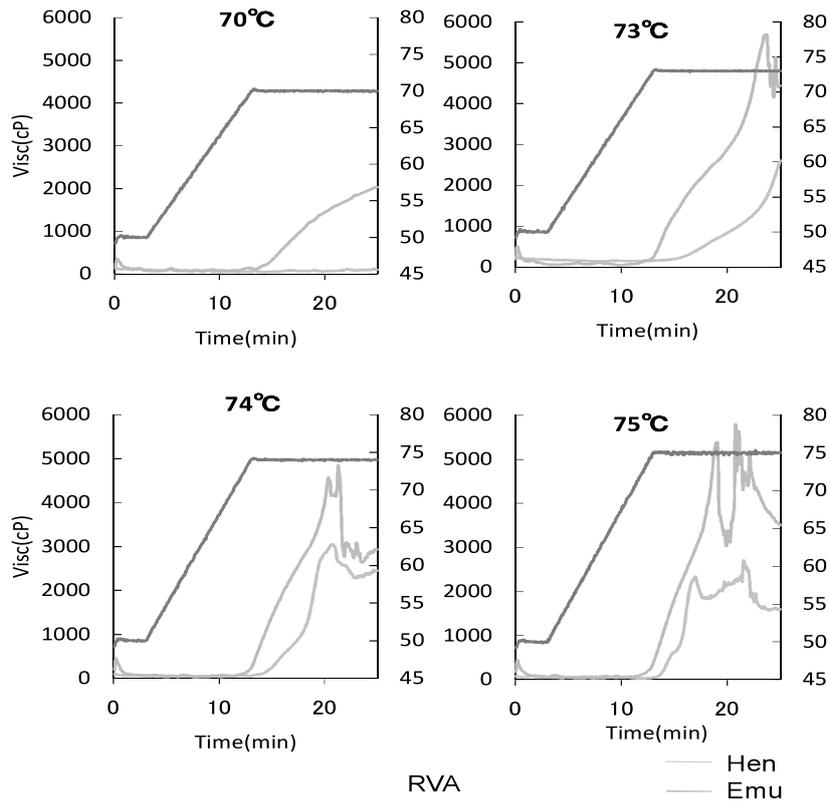
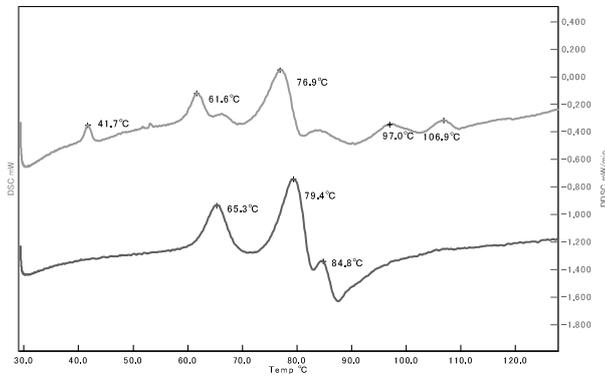
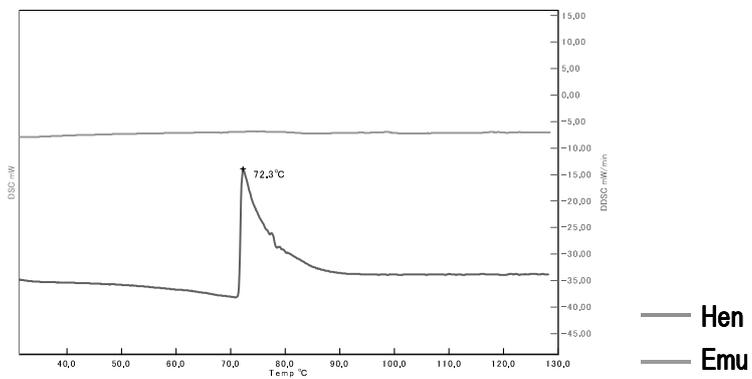


図4 各温度における物性変化の様子 (RVA)

Albumen



Yolk



DSC

図5 温度変化による熱量ピークの検出 (DSC)

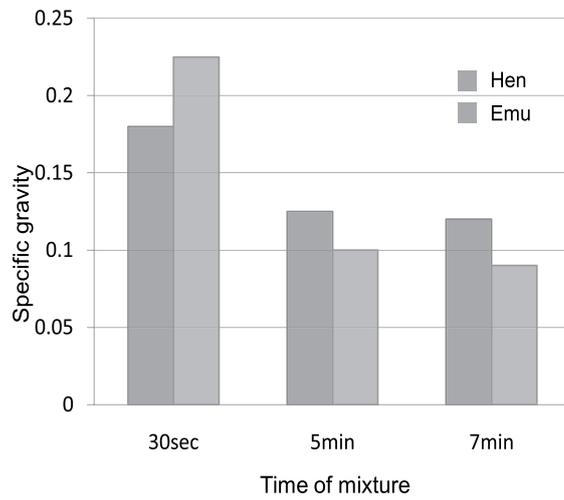


図6 卵白気泡容積の経時的変化

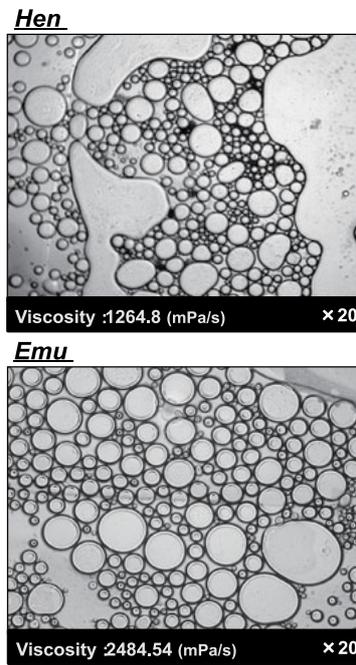


図7 顕微鏡による乳化状況の観察  
上図；ニワトリ、下図；エミュー

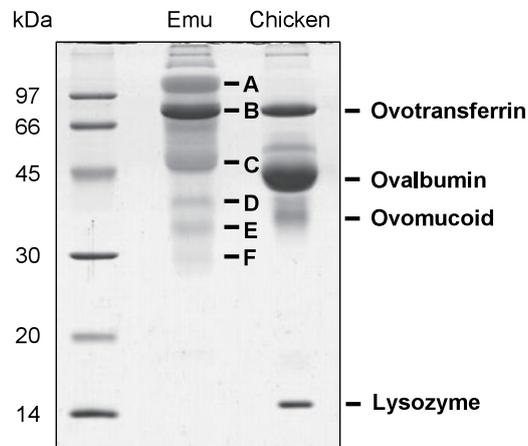


図8 電気泳動の結果

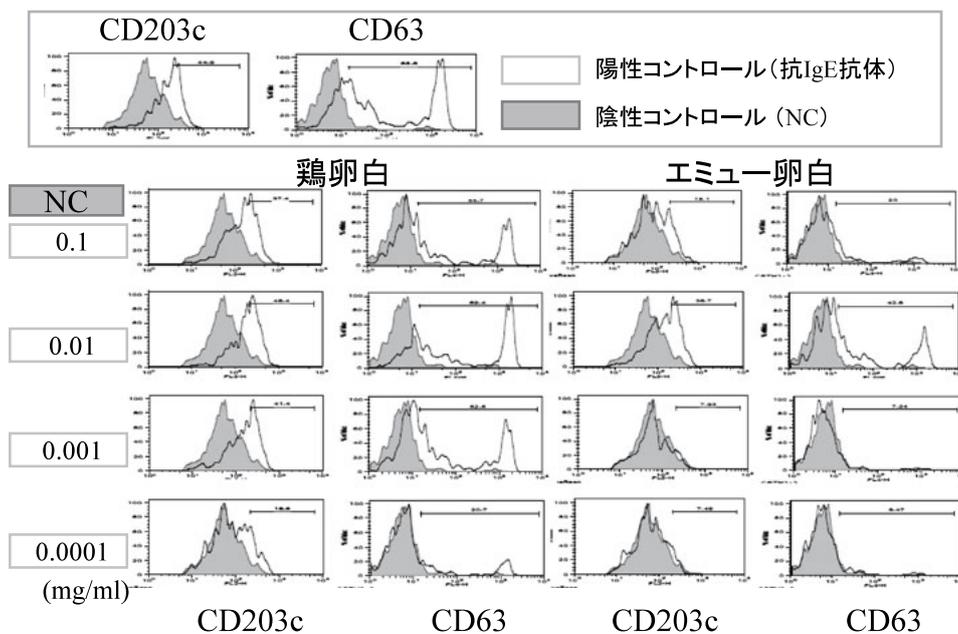


図9 鶏卵白とエミュー卵白の各抗原濃度に対する患者好塩基球活性化

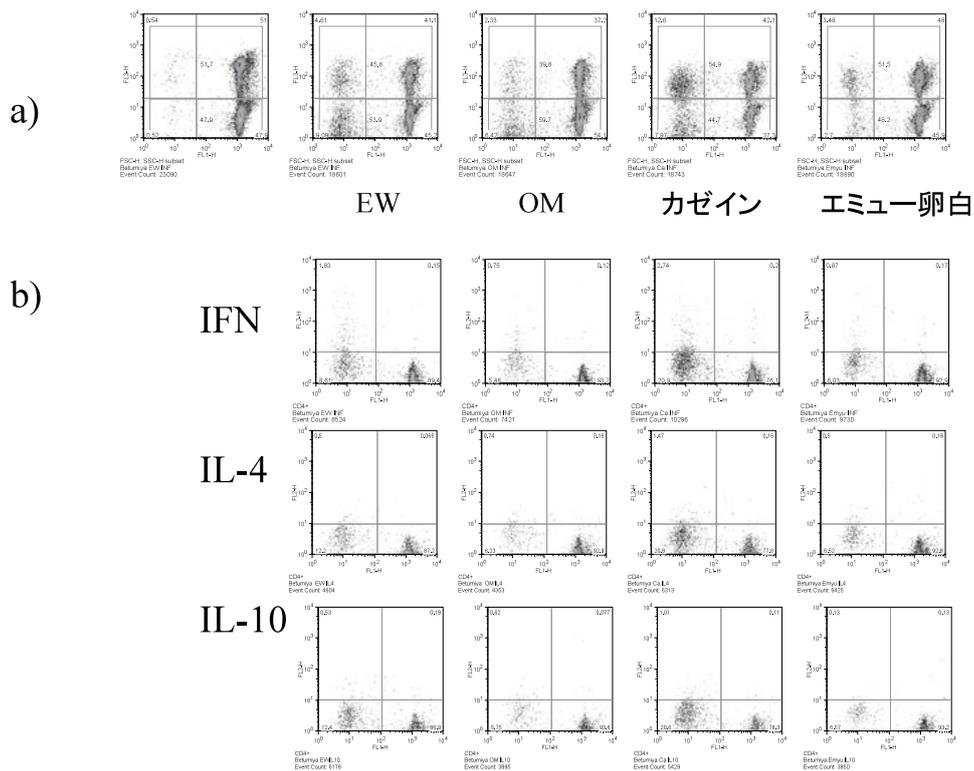


図10 a) 鶏卵白 (EW)、オボムコイド (OM)、牛乳カゼイン、エミュー卵白の各抗原刺激に対する患者T細胞の増殖変化と b) 増殖したCD4陽性細胞内の各サイトカインの測定

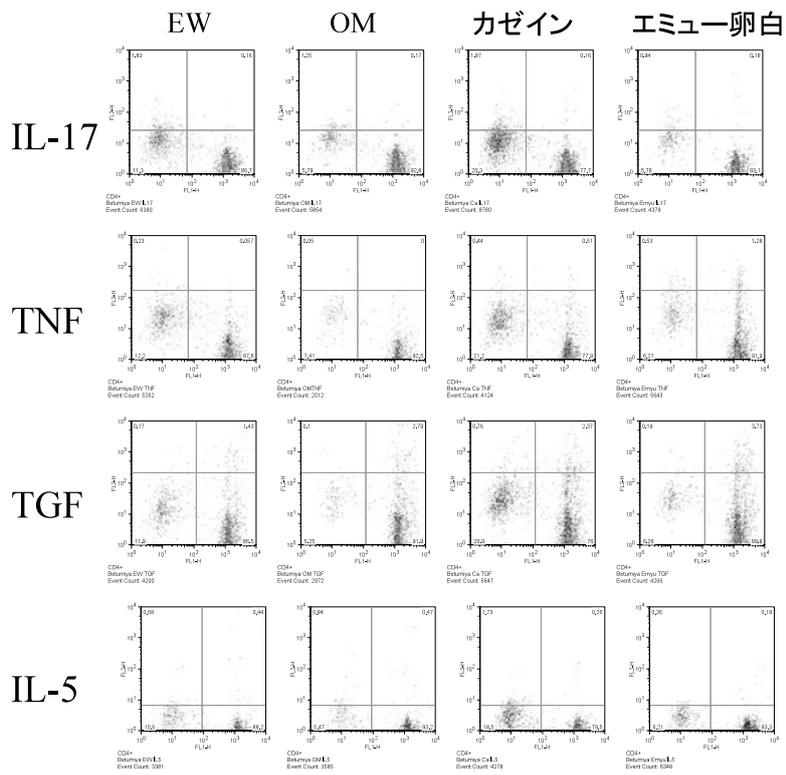


図 11 鶏卵白 (EW)、オボムコイド (OM)、牛乳カゼイン、エミュー卵白の各抗原刺激に対して増殖した患者 CD4 陽性細胞内の各サイトカインの測定