

2022

ISSN 2758-0237

柴田学園研究紀要

Vol.2 No.1

目 次

渡邊 真衣 : 魚肉のパルプアルブミン含有量に対する調理法の効果.....	1
---------------------------------------	---

報文

魚肉のパルブアルブミン含有量に対する調理法の効果

渡邊 真衣

柴田学園大学 生活創生学部 健康栄養学科

Effect of cooking methods on parvalbumin content in fish fillet

Mai Watanabe

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Design, Sibata Gakuen University

Key words : パルブアルブミン Parvalbumin
調理方法 Cooking methods
魚類アレルギー Fish allergy

要 旨

【背景】

近年、世界的にアレルギー疾患の患者数が増加している。アレルギー疾患の中でも、食物アレルギーは死亡に至る例があり、注意を要する疾患の1つである。このため、食べられる範囲を超えたアレルゲンの摂取を防ぐことに加えて、調理法によるアレルゲンの不活化など、より安全性を高めるための手法が求められている。

【目的】

成人における食物アレルギー原因食物のうち、魚類に含まれる主要なアレルゲンはパルブアルブミン（PA）である。PAは熱処理することで免疫グロブリンEとの反応性が低下することが知られている。そこで本研究では、種々の調理法により抗原として機能するPAがどの程度減少するかを確認し、安全性を高める調理法について検討した。

【方法】

タラ、サケ、サバ、イワシ、サンマ、マグロの可食部を採取し、「煮る」・「焼く」・「蒸す」の調理法を実施した。さらに、高温で調理した試料として市販の缶詰も利用した。各試料に含まれるPAの相対量は抗PA抗体を用いたウエスタンブロット法により明らかにした。

【結果・結論】

水溶性タンパク質であるPAはサケ、サバ、サンマ、では「煮る」ことでその含有量を減少できる可能性があること、ただしイワシは「煮る」ことでは減少しない可能性が明らかとなった。これらの結果は、PAの抗原性低下を目的とした場合、最適な調理法は魚種により異なることを示唆している。

1. 緒言

近年、世界的にアレルギー疾患の患者数が増加しており、我が国でも全人口の約半数は何らかのアレルギー疾患に罹患していることが報告されている¹⁾。数あるアレルギー疾患の中でも、食物アレルギーは死亡に至る例があり、注意を要する疾患の1つである。食物アレルギー患者では、原因物質（アレルゲン）の摂取により、主に皮膚や呼吸器に症状が現れ、さらに深刻な場合には、ショック症状が誘導される。したがって、食物アレルギーでは、医師による「正しい判断」、「食べられる範囲の判断」、「必要最小限の食物除去の指導」が不可欠である。保育所給食においては、保育所におけるアレルギー疾患生活管理指導表を、幼稚園・学校給食においては、学校生活管理指導表をもとにした対応がなされている²⁾。しかし、給食では誤食事故が発生しやすいため、偶発的な死亡事故も起きている。したがって、食べられる範囲を超えたアレルゲンの摂取を防ぐことに加えて、調理法によるアレルゲンの不活化など、より安全性を高めるための手法が求められている。

成人における食物アレルギーの原因食物は甲殻類、小麦、魚類などである(表1)。その割合はどれも大差ないが、我が国では海産物を食する機会が多いことから、魚類は注意を要する食材である。特に青森県は三方が海に囲まれており、我が国の中でも生鮮魚類の生産量が多い地域である³⁾。実際に青森市は全国の県庁所在地の中で最も魚類の消費量が多いことが報告されており⁴⁾、食物アレルギーに起因する死亡者数は1999年以降0~6名で推移している。したがって、食物アレルギーに起因する死亡を、簡易的に予防する方法として、調理法がアレルゲンであるタンパク質に及ぼす影響を調査・研究することは重要である。⁵⁾

表1 新規発症の原因食物

n=2764					
	0歳 (1356)	1,2歳 (676)	3-6歳 (369)	7-17歳 (246)	≥18歳 (117)
1	鶏卵 55.6%	鶏卵 34.5%	木の実類 32.5%	果物類 21.5%	甲殻類 17.1%
2	牛乳 27.3%	魚卵類 14.5%	魚卵類 14.9%	甲殻類 15.9%	小麦 16.2%
3	小麦 12.2%	木の実類 13.8%	落花生 12.7%	木の実類 14.6%	魚類 14.5%
4		牛乳 8.7%	果物類 9.8%	小麦 8.9%	果物類 12.8%
5		果物類 6.7%	鶏卵 6.0%	鶏卵 5.3%	大豆 9.4%

「食物アレルギー診療の手引き2020」より引用

魚類アレルギーの主要なアレルゲンは、魚類の筋肉に存在するパルブアルブミン（Parvalbumin : PA）である。PAは12 kDaのCa²⁺結合性タンパク質であり、魚類の他に両生類でも存在が確認されている。先行研究から通常の料理の加熱負荷ではアレルゲン性は消失しなかったが、100℃で320分間、120℃で60分間、または140℃で10分間加熱を実施することで、魚肉中のPAに対する免疫グロブリンE (IgE) 反

応性を消失できることが明らかになっている⁶⁾。しかし、実際の調理現場において、食味を重視しつつ上記の加熱条件も合わせて遵守することは容易でない。

本研究では、家庭での活用を念頭に、種々の調理法の違いにより抗原として機能する PA をどの程度減少できるかを確認することにした。測定には PA に対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法を利用し、PA タンパク質の相対的な量を評価した。これらの測定結果をもとに、種々の魚類において安全性を高める可能性のある調理法を検討した。

2. 方法

2-1. 材料および評価用魚肉抽出液の調製

タラ、サケ、サバ、イワシ、サンマ、マグロの普通肉（血合い肉を含まず）を厚さ 10 mm になるように 5 g ずつ採取し、種々の調理（煮る・焼く・蒸す）を実施した。「煮る」は小鍋 1 L の沸騰水中で 3 分間煮た後、水気を拭き取った。「焼く」はクッキングシートに乗せた試料を予備加熱した魚焼き器（Rinnai グリル付ガス クックトップ）で、強にして 3 分間焼いた。「蒸す」はクッキングシートに乗せた試料を予備加熱した蒸し器で、3 分間蒸した。「煮る」、「蒸す」の調理時のガスの火加減は中火とした。さらに、高温で加熱したものとしてサケ（水煮）、サバ（水煮）、マグロ（水煮）の缶詰を用意した。対照は生の試料とした。以後、個々の分析試料名は表 2 に記した①～⑳のナンバーを付記した。

調理後の試料は 4 倍量の 10 mmol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）を加えて 1 分間ホモジナイズした。試料を遠心分離（1500×g、4℃、60 分間）し、上清と沈殿物に分離した。得られた上清は 5 μm 径のシリジフィルター（Sartorius）を用いてろ過した。得られた試料のタンパク質濃度は Bradford protein assay Kits（Bio-Rad）を用いて測定した。

表2 実験試料

	煮	焼	蒸	生	缶詰
A.タラ	①	⑦	⑬	⑲	×
B.サケ	②	⑧	⑭	⑳	㉕
C.サバ	③	⑨	⑮	㉑	㉖
D.イワシ	④	⑩	⑯	㉒	×
E.サンマ	⑤	⑪	⑰	㉓	×
F.マグロ	⑥	⑫	⑱	㉔	㉗

2-2.SDS-PAGE

LAEMMLI⁷⁾の方法に準じ、14%分離用ゲルおよび濃縮用ゲルを作製した。ろ過後に試料のタンパク質濃度を調整した溶液をウェルに 20 μL（タンパク質量 5μg）加

え、マーカー色素が分離用ゲルに入るまでは 40 mA の定電流で泳動し、それ以降は 60 mA で泳動を行った。泳動後のゲルはウエスタンブロット法および Coomassie Brilliant Blue (CBB, Sigma) によるタンパク質染色を行った。

2-3. ウエスタンブロット法

電気泳動後、ゲル内のタンパク質はミニバッファートランスファー装置 (BIO CRAFT) を用いて PVDF 膜 (Immobilon-P, 0.45 μ m; Millipore-Merk) に転写した。通電条件は、100 mA で 30 分、その後引き続き 300 mA で 30 分とした。転写後メンブレンを取り出し、メンブレン全体を Ponceau S (P7170, Sigma-Aldrich) 染色液に 3 分間浸漬した。その後、バンドが見えるまで 1 % 酢酸で軽く洗浄し、タンパク質がメンブレンに転写したことを確認した (データ省略)。抗体と反応させるために、メンブレンを 0.1M NaOH 溶液で 20 秒間振盪し、蒸留水で 2 分間洗浄し、色素を除去した。

ブロッキング液は、0.05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) を含んだリン酸緩衝生理食塩水 (PBST) に 1 % のウシ血清アルブミン (019-15101, Wako) を加えて調製した。ブロッキングは、脱色したメンブレンをブロッキング液中で 1 時間振盪することで実施した。PA を認識する一次抗体にはモノクローナル抗パルブアルブミン抗体 (P3088, Sigma-Aldrich) を用いた。本抗体はカエル筋肉の PA を抗原として作製されたものであるが、他の様々な脊椎動物の PA とも反応性を有することが知られている。この一次抗体をブロッキング液で 2000 倍に希釈し、室温にて一晩反応させた。洗浄は、PBST を用いて 10 分間、3 回実施した。二次抗体にはアルカリホスファターゼ標識した抗マウス IgG 抗体 (115-055-062, Jackson Immuno Research) を用いた。二次抗体をブロッキング液で 2000 倍に希釈し、2 時間反応を行った。洗浄は、PBST を用いて 10 分間、3 回実施した。

発色には BCIP-NBT 溶液キット (03937-60, NACALAI TESQUE) を用いた。調製した発色液でメンブレンを浸漬し、バンドが検出されるまで振盪した。バンドを確認後、発色液を捨て、蒸留水で洗浄した。メンブレンが乾燥した後、スキャナーにより画像を取り込んだ。

2-4. タンパク質の染色

比較対象としてゲルをそのまま CBB 染色したものを作製した。

3. 結果および考察

「煮る、焼く、蒸す」調理をした各魚種および缶詰から抽出したタンパク質を電気泳動し、ウエスタンブロット法 (一次抗体および二次抗体を用いた間接法) で検出したものを図 1~3 に示し、PA に相当するバンド (12kDa 付近) を矢印で示した。図 4~5 に電気泳動後、CBB 染色したものを示した。また、調理法の違いによる PA 量の変化を表 3 に示した。

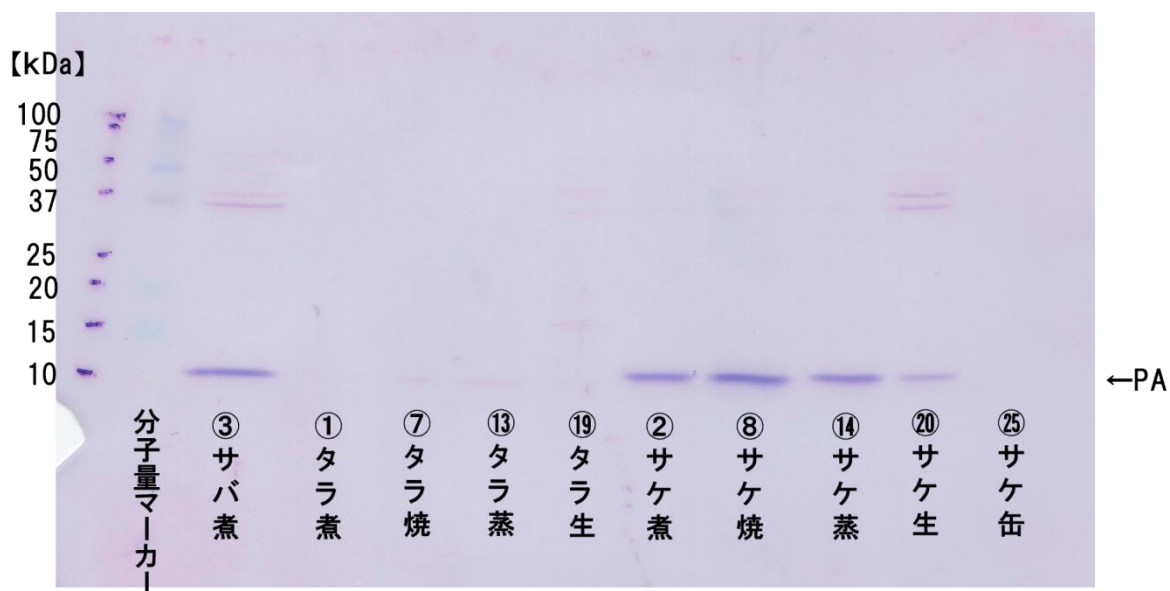


図 1. 「生,煮る,蒸す,焼く」調理をしたタラ,サケ肉タンパク質の二重抗体法で検出したウエスタンブロット解析

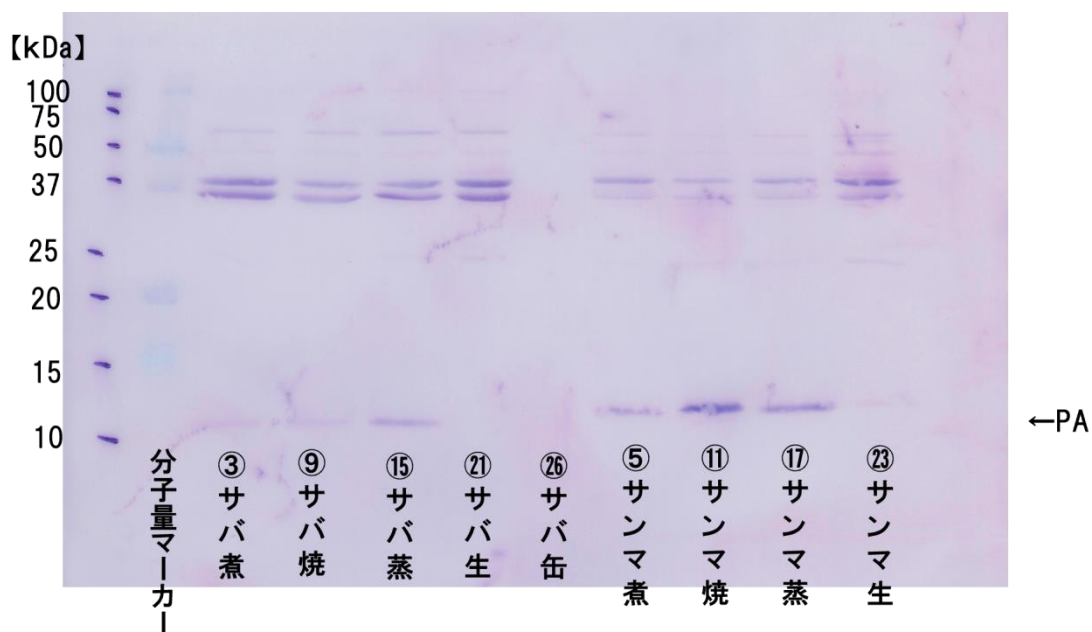


図 2. 「生,煮る,蒸す,焼く」調理をしたサバ,サンマ肉タンパク質の二重抗体法で検出したウエスタンブロット解析

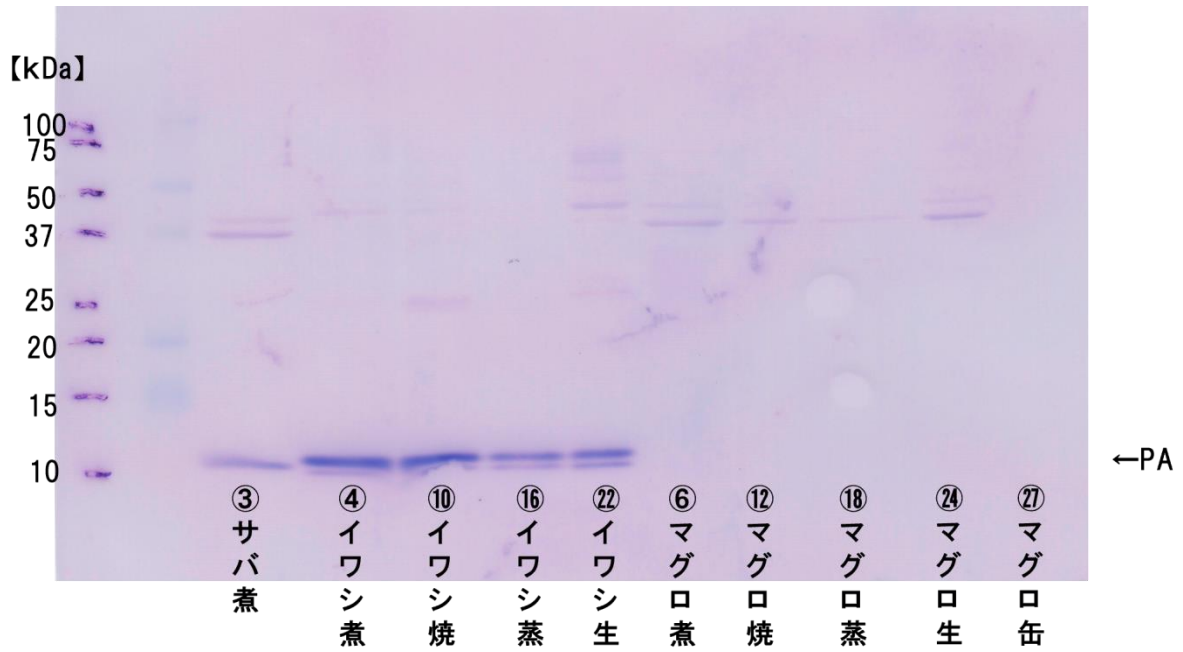


図 3. 「生, 煮る, 蒸す, 焼く」調理をしたイワシ, マグロ肉タンパク質の二重抗体法で検出したウエスタンブロット解析

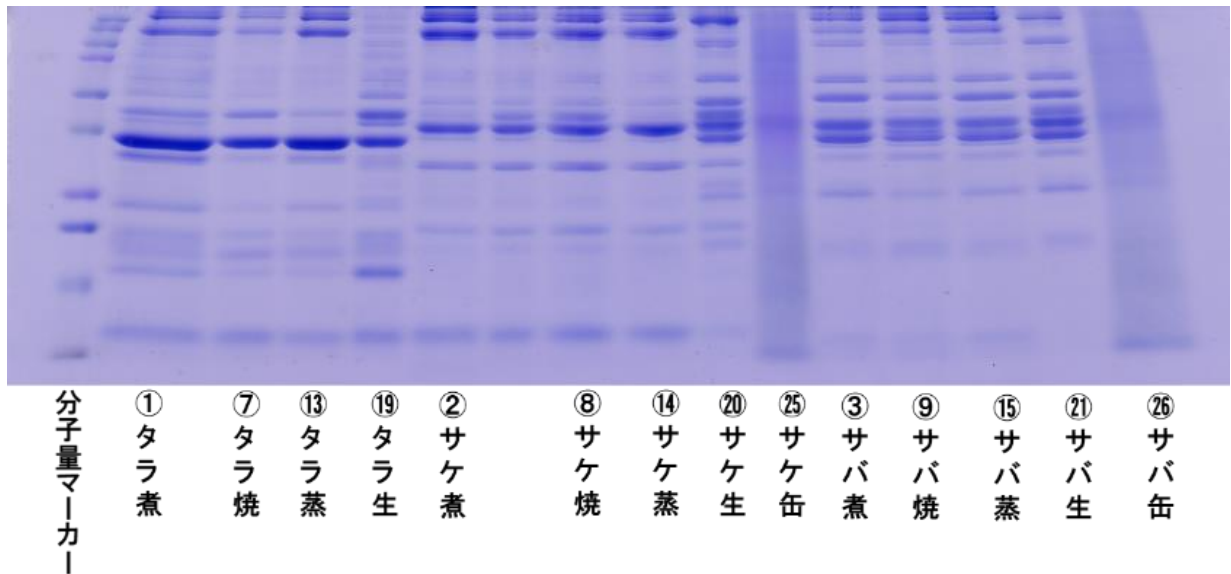


図 4. 「生, 煮る, 蒸す, 焼く」調理をしたタラ, サケ, サバ肉タンパク質の SDS-PAGE

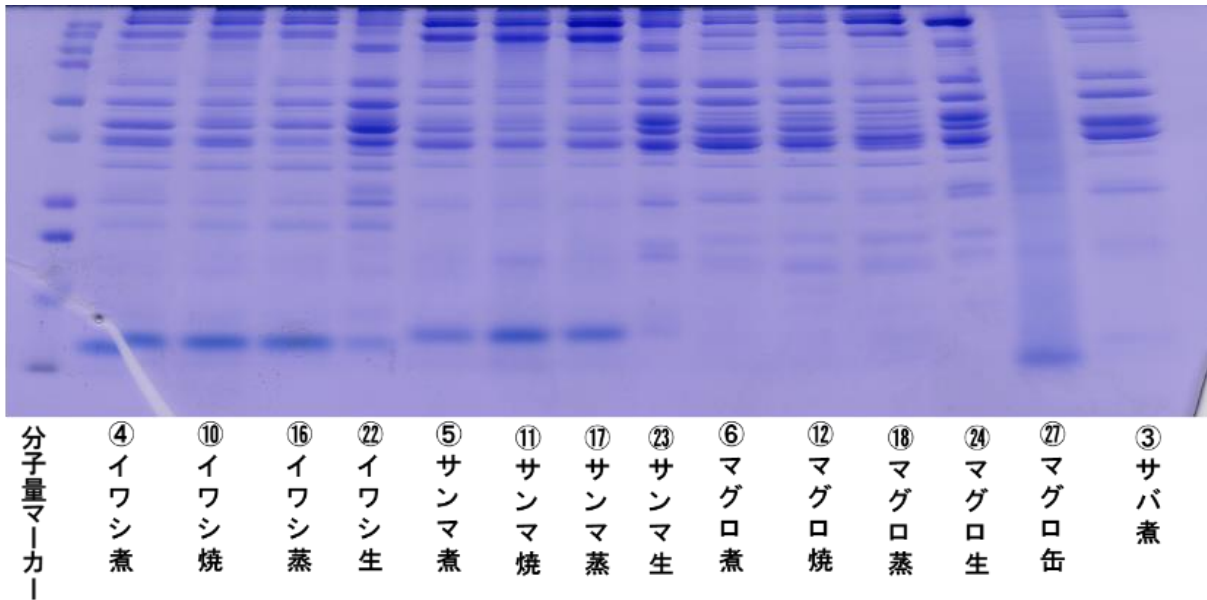


図 5. 「生, 煮る, 蒸す, 焼く」調理をしたイワシ, マグロ, サンマ肉タンパク質の SDS-PAGE

表3 調理法の違いによるPA量の変化

魚種	PAバンドシグナルの強さ	備考
タラ		煮る(-)焼く(-)蒸す(-)生(-)
サケ	「焼く」 > 「煮る」 「蒸す」 > 「生」	
サバ	「蒸す」 > 「煮る」 「焼く」	生(-)
イワシ	「煮る」 > 「焼く」 > 「蒸す」 「生」	
サンマ	「焼く」 > 「蒸す」 > 「煮る」 > 「生」	
マグロ		煮る(-)焼く(-)蒸す(-)生(-)

(-)は未検出

タラ類は PA が多く含まれていると予想していたが、すべての調理法で検出されなかった。サケでは、「焼く」と比較して、「煮る」「蒸す」において相対的に弱いバンドシグナルが観察された(図 1)。サバは、他の魚種に比べてすべての調理法でバンドシグナルが弱めであったが、それらの中では「蒸す」におけるバンドシグナルが比較的強かった。サンマでは、「焼く」「蒸す」と比較して、「煮る」において相対的に弱いバンドシグナルが観察された(図 2)。一方、イワシは、他の魚種とは異なり、「煮る」においてバンドシグナルが最も強い結果となった。マグロはすべての調理法で検出されなかった(図 3)。

図 4～5 の結果より、マグロ以外で PA と思われるバンドが検出された。また、高分子領域に抗体と反応しない多くのタンパク質が検出された。

先行研究で測定された魚類普通肉の PA 含量 (mg/筋肉 100 g、コイパルブアルブミン等量) の結果をみると、イワシやサンマ、サバよりもタラで多いことが報告されている (表 4)⁸⁾。

表4 魚類普通肉のパルブアルブミン含量 (コイパルブアルブミンで検出)

魚種	PA(mg/筋肉100g)	魚種	PA(mg/筋肉100g)
コイ	600	マサバ	110
マダラ	460	マイワシ	79
メバル	310	ブリ	69
マガレイ	310	マアジ	59
キス	200	マカジキ	60
サンマ	110	クロマグロ	11

「魚介類筋肉におけるカルシウム結合タンパク質に関する研究」より一部抜粋して引用

しかし、本研究で用いた抗体はタラの PA とほとんど反応しなかった。この原因として、ゲルの CBB 染色においてはバンドが確認できていることから、本研究で用いた抗体がタラの PA を認識しにくかった可能性が考えられた。

また、マグロにおいても明瞭な反応がみられなかった。ゲルの CBB 染色においても明確なバンドは確認されておらず、PA の発現量が少ないものと考えられた。先行研究において、大型の回遊魚はパルブアルブミンの含有量が少ないことが報告されているが⁹⁾、今回の研究でも同様の結果となった。

なお、PA 含有量は「生」よりも加熱調理した試料で多く検出される傾向がみられた。このことは PA が比較的熱に安定であり、他の多くのタンパク質が熱凝固により抽出の過程で除去され、相対的に PA の比率が高くなったためと考えられた。これに対し生の試料は、除去されないタンパク質が多く、相対的に PA の存在比率が低くなり、より低値 (または未検出) となったと思われた。

サケ缶詰、サバ缶詰、マグロ缶詰では、ゲルの CBB 染色において、タンパク質のバンドパターンが調理したものと大きく異なっていた。この相違は缶詰を作る工程での高温処理によりタンパク質が高度に凝固凝集したと考えられた。ウエスタンブロット法でもバンドは確認されず、缶詰では PA の抗原性が低下すると考えられた。以前より魚類アレルギー患者の一部は魚肉缶詰を摂取できることが報告されており¹⁰⁾、魚類の缶詰を食事に取り入れることで、魚類摂取を促すことが可能になると考えられる。

本研究から魚種により低アレルギー化される調理法が異なることが示唆された。

PAは「焼く」や「蒸す」と比べると「煮る」ことで、その含有量を減少させる可能性が示された。しかしイワシのように例外的に「煮る」ことでは含有量が減らないものもあり、魚種により違いがあることが明らかとなった。この理由は、今のところ不明であり、魚種によりPAの一次構造がわずかに異なっていることから、水への溶解性が異なっているのかもしれない¹¹⁾。

PAは水溶性タンパク質なので、煮汁にPAを移行させることで魚肉からPAを減少させる可能性がある。今後は「煮る」調理法に着目し、経時変化を詳細に検討していきたい。また、今回使用した抗カエルPAモノクローナル抗体だけではなく、抗コイPA抗体などを用いることで、PAの検出に変化がみられるかについて検討し、検出精度を高めたい。

謝辞

この研究は、令和3年度青森県学術文化振興財団の助成金交付により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。また、実験方法のご助言をいただいた柴田学園大学生生活創生学部健康栄養学科飯泉恭一准教授に感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

文献：

1) 厚生労働省. リウマチ・アレルギー対策委員会報告書.

<https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000001nes4-att/2r9852000001newa.pdf>

(2022年5月6日)

2) 食物アレルギー研究会. 食物アレルギーの栄養食事指導の手引き 2017.

<https://www.foodallergy.jp/tebiki/>

(2022年5月9日)

3) 青森県農林水産部. 図説 農林水産業の動向.

https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/nourin/nosui/files/00_H30_zusetsu_all.pdf

(2022年5月6日)

4) 総務省統計局. 品目別都道府県庁所在市及び政令指定都市ランキング.

<https://www.stat.go.jp/data/kakei/5.html>

(2022年3月20日)

5) 厚生労働省 健康局 がん・疾病対策課. アレルギー疾患の現状等.

[https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10905100-Kenkoukyoku-](https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10905100-Kenkoukyoku-Ganshippeitaisakuka/0000111693.pdf)

[Ganshippeitaisakuka/0000111693.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10905100-Kenkoukyoku-Ganshippeitaisakuka/0000111693.pdf)

(2022年5月6日)

6) 小林征洋. 魚類主要アレルゲン(パルブアルブミン)のアレルギー反応性の低減化に関する研究(2018).

<https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-25750023/25750023seika/>

(2022年3月20日)

- 7) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685,1970
- 8) 讃岐齊. 魚介類筋肉におけるカルシウム結合タンパク質に関する研究
<http://hdl.handle.net/10097/16414>
(2022年3月20日)
- 9) 倉田香織, 深井むつみ, 土橋朗, 他. 魚肉中の部位によるパルブアルブミン含有量の検討 https://doi.org/10.15036/arerugi.57.1472_1
(2022年3月20日)
- 10) Bernhisel-Broadbent J, Strause D, Sampson HA. Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J Allergy Clin Immunol* 90:622-629,1992
- 11) Asano Y, Dadashipour M, Yamazaki M, et al. Functional expression of a plant hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli* by directed evolution: creation and characterization of highly in vivo soluble mutants. *Protein Eng Des Sel* 24:607-616,2011

柴田学園研究紀要 第2巻 第1号

令和4年9月30日 発行

編集者

柴田学園大学 紀要編集委員会

発行者

学校法人 柴田学園

代表者

加藤 陽治(学校法人 柴田学園 理事長)

〒036 - 8530 青森県弘前市清原 1-1-16

電話 0172 - 32 - 6200

2022

ISSN 2758-0237

ANNUAL REPORT OF SHIBATA GAKUEN

Vol.2 No.1

CONTENTS

Mai Watanabe: Effect of cooking methods on parvalbumin content in fish fillet..... 1