

食物繊維の摂取によるビタミンおよびカルシウムの吸収に関する実験学的
および文献学的研究

分担研究者 渡邊敏明 姫路工業大学環境人間学部教授

食物繊維としてフラクトオリゴ糖を用いて、ヒト試験を実施しミネラルおよびビタミン吸収への影響を尿中へのカルシウムおよび葉酸排泄量を指標として基礎的な検討をした。これまでの結果では、健常成人男性において、フラクトオリゴ糖によって、カルシウムの吸収を促進することが確認された。しかしながら、水溶性ビタミンである葉酸の吸収については、尿中の葉酸排泄量に変化は認められなかった。

A. 研究目的

特定保健用食品に含まれる食物繊維には、水溶性食物繊維と非水溶性食物繊維がある。これらの食物繊維は、消化管内で水分の吸着、微生物の栄養素源や消化・吸収機能への影響など特有の生理機能を有している。しかしながら、これらの生体機能については、科学的評価が十分に行われていない。そこで、ビタミンやミネラルの吸収が、特定保健用食品に含まれる食物繊維によって、どのような影響を受けるかを明らかにすることが本研究の目的である。

水溶性ビタミンの一つである葉酸は、さまざまな化合物として生体内に存在している。食品では、レバー、ホウレンソウ、大豆、えび、まめなどに多く含まれている。葉酸の生理機能としては、正常な造血機能を保つために重要であるばかりでなく、妊娠の維持にも欠かせないビタミンである。最近、葉酸摂取によって、胎児における神経管閉鎖障害の発症リスクの低減が認められている。また葉酸の不足によって、ホモシステインの上昇が見られるが、ホモシ

テインが動脈硬化症の危険因子として注目されている。

カルシウムを、多く含む食品としては、魚介類、種実類、乳類、藻類などが挙げられる。いわし、えび、チーズ、えんどうなど多くの食品がある。わが国においては、カルシウムの摂取量は、食物繊維と同様に、栄養所要量に満たない栄養素の一つである。血液中のカルシウム濃度は厳密に調節されているので、長期間に亘りカルシウムの摂取量や吸収が不足すると、骨量が低下してくることが知られている。骨量は、加齢によっても減少してくる。とくに閉経後の女性や高齢者においては著しい骨量の減少が起こり、骨粗鬆症の原因の一つとなっている。カルシウムの十分な摂取や運動などの生活習慣の改善によって、骨粗鬆症は予防可能である。このように、カルシウムは、骨の健康を維持するために重要な栄養素である。

近年、食物繊維の機能性に対する期待が高まりつつある。食物繊維は、整腸作用、血糖の調節作用、血清コレステロールの低下作用などの生理作用が報告されている。

非消化性糖質とは、食物繊維、軟消化性糖質やレジスタントスターチが含まれ、消化も吸収もされない食品成分で、最近その重要性が認識されている。このうち、難消化性糖質であるフラクトオリゴ糖には、動物実験やヒト試験において、カルシウムやマグネシウムなどのミネラルの吸収を促進することが報告されている。

近年、わが国の食生活は欧米化が進み、栄養素のアンバランスや過剰摂取が問題となりつつある。しかしながら、食物繊維やカルシウムの摂取量は、栄養所要量を満たしていない。たとえば、第六次改定日本人の栄養所要量において、食物繊維は、目標摂取量が1日20-25gとされているが、実際の1日平均摂取量は16gであるとされている。また、国民栄養調査において、カルシウムの摂取についても、平均摂取量が所要量に満たず、いまだに十分とはいえないのが現状である。

そこで、本年度においては、健常男性成人を対象にして、フラクトオリゴ糖のカルシウムおよびビタミンの吸収に及ぼす影響について検討した。尿中におけるカルシウムやビタミンの排泄量等を分析することで、フラクトオリゴ糖によってこれらの栄養素の吸収率の増進の効果が得られるかを検討する。つまり、フラクトオリゴ糖を摂取し、尿中におけるカルシウムおよび葉酸の排泄量等を分析することで、フラクトオリゴ糖によって、これらの吸収促進がみられるか否かについて検討する。

B. 研究方法

フラクトオリゴ糖によるカルシウム吸収

試験の被験者は、22歳から55歳までの男性で、これまでの定期健康診断で疾患の認められなかった健常者のボランティア22人を対象者とした。また、これらの被験者について、試験日に血液生化学的検査、骨密度および体脂肪測定を実施して、骨代謝について異常が見られない20人の被験者を最終的に対象者とした。10人の平均年齢は 37.1 ± 9.7 歳(22-55歳)である。

本試験は、平成14年10月から11月の間に実施した。試験の実施にあたっては、あらかじめ試験の目的・内容を説明した文書で協力を依頼し、文書で同意を得られた人を対象者とした。また試験期間中、とくに試験日に腹痛、腹部不快感、腹部膨満感、腹鳴などの何らかの不調を感じたときには、すぐに申し出るように指示をした。

なお、本試験は、昭和女子大学の倫理委員会で承認を得たものであり、ヘルシンキ宣言の主旨にしたがって行った。

本試験の全体のスケジュールは図1に示したとおりである。試験は、1週間以上の間隔を設けて、被験者に試験日にカルシウムと一緒に試験食品(フラクトオリゴ糖)あるいは対照食品(プラセボ)を摂取する。試験日に、採血、採尿と同時に骨密度や体重等の身体測定などを実施する。被験者の割り付けはランダムに行い、フラクトオリゴ糖あるいはプラセボの摂取は、二重盲検交叉法で行った。

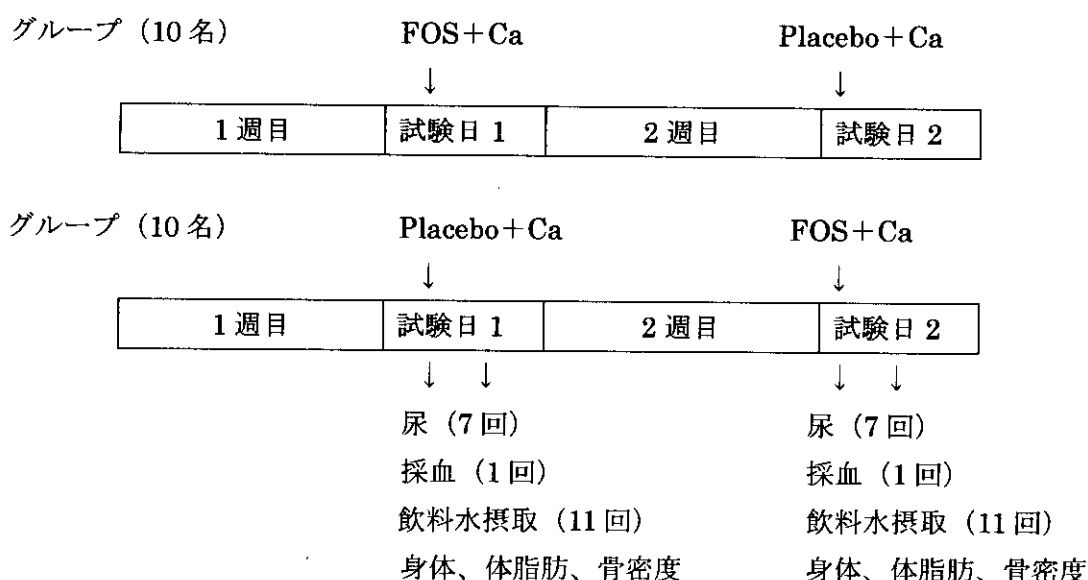


図 1 カルシウム試験の基本的な生活スケジュール

試験日のスケジュールについては、まず試験前日および試験日の食事については、下記のメニューで、実施した。試験前日の夕食は、19時に素うどん（2杯）で、つゆはできるだけ飲まないようにさせ、具は食べないようにさせた。試験日の朝食は、午前9時に採血および身体測定が終了した後に、おにぎり（2個）で、海苔は食べないようにさせた。また、試験日の昼食は、13時にスパゲティ（ミートソース）を食べた。

試験前日の22時以降の飲食は禁止した。また試験日の朝食および昼食は30分以内にさせた。また試験日の夕食は、普通の食事（ミックス弁当）を摂取させた。なお、試験中の食事および飲料水（蒸留水）は、こちらで準備するものを指定の時刻に飲食し、それ以外の飲食は一切禁止した。

フラクトオリゴ糖投与試験の当日は、被験者は7時までに起床し、完全に排尿

し、7時から採尿を開始した。排尿はすべてボトルに行い、17時までは2時間ごと（第1回目～第5回目）、17時以降は23時（第6回目）および翌日7時（第7回目）に回収し、尿量を測定した。また7時から1時間ごとに17時まで飲料水として、蒸留水200mlを摂取させた。17時以降は自由に飲料水（蒸留水）を摂取させた。なお、9時の朝食後にフラクトオリゴ糖（4g、8g）あるいはプラセボであるショ糖（4g、8g）をカルシウム300mgと一緒に摂取させた。なお、フラクトオリゴ糖4gおよび8g摂取群を、それぞれ低濃度摂取群および高濃度摂取群とした。

尿は、フラクトオリゴ糖低濃度摂取群では排尿のすべてを採取し、2時間毎の尿量を正確に計量したが、高濃度摂取群では2時間毎の排尿時に中間尿のみを集め、カルシウム、葉酸およびクレアチニンの分析に供した。

試験食品は、粉末のフラクトオリゴ糖

であり、フラクトオリゴ糖をショ糖に変えたものを対照食品とした。また、カルシウム源としては、粉末のカルシウム 300mg を用いた。カルシウムの量は、第六次改定日本人の栄養所要量で策定されたカルシウムの成人での所要量 600mg の半分の量である。これらの食品およびカルシウムを十分に混合し、あらかじめ 1 回分ごとに分包したものを準備し、試験実施者に送付した。試験日に被験者に配布した。なお、今回の試験では、葉酸は摂取しなかった。

検査項目として、尿中カルシウムおよびクレアチニンは、2 時間ごとにすべてあるいは一部を回収した尿について分析をした。カルシウムの定量には、比色法の一つである o-CPC (クレゾールフタレインコンプレクソン) 法を用いた。また尿中のクレアチニン (Cre) はヤッフ法にて測定した。尿中カルシウム量は、クレアチニン補正 (mg/Cre)、時間補正して単位時間当たりの排泄量 (mg/min)、および総排泄量 (mg) で算出した。さらにカルシウム総排泄量 (mg) については累積を求めた。

尿中の葉酸の測定には、イムライズ (ダイアマトロン社) を利用して、化学発光免疫測定法で分析をした。

C. 研究結果

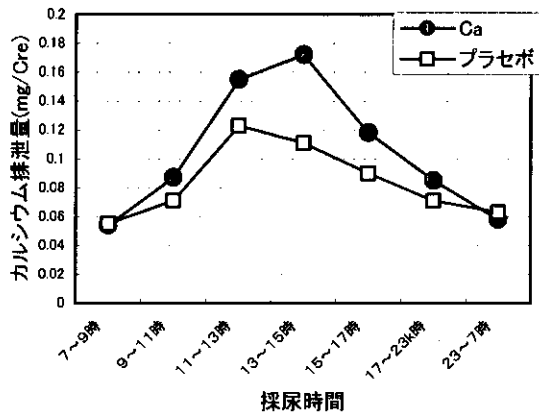
フラクトオリゴ糖によるカルシウム吸収を尿中カルシウム排泄量から観察した。フラクトオリゴ糖低濃度摂取群における

尿中カルシウム排泄量を 2 時間毎にみたものが図 2 である。試験日の尿中カルシウム量 (mg/Cre) は、フラクトオリゴ糖を摂取した午前 9 時から 23 時までの間、フラクトオリゴ糖 4g 摂取群 (8 名) では、プラセボ群と比較して有意に高い値を示した。この差異は、10 名でみた場合にも、午前 11 時から 17 時までの間観察された。

さらに、試験日の 2 時間毎の尿中カルシウム総排泄量 (mg) をみると、フラクトオリゴ糖の摂取群で 13 時から 23 時までの間、プラセボ群と比較して、増加がみられた。このことは、総排泄量の累積をみた場合にも、13 時からフラクトオリゴ糖摂取群で高い値であった。図 3 は、単位時間当たりのカルシウムの排泄量をみたもので、フラクトオリゴ糖摂取群では、午前 11 時から 15 時までの間、それぞれ 0.092mg/min および 0.063mg/min と、プラセボ群の約 1.5 倍に上昇していた。しかしながら、午前 11 時から 13 時の間は、個人間のばらつきが大きいため有意な差異は認められなかった。しかしながら、フラクトオリゴ糖高濃度摂取群での単位時間当たりの排泄量は 0.15mg/min であり、フラクトオリゴ糖低濃度摂取群の 0.09mg/min と比べて有意に高い値であった。

葉酸の尿中排泄量については、日中にかけて高い傾向が見られたが、フラクトオリゴ糖およびプラセボ群とに差異は認められなかった (図 4)。

図2 フラクトオリゴ糖（4g）摂取による尿中カルシウム量の経時的変化



($p < 0.05$: 9-11時、11-13時、13-15時、15-17時、17-23時)

図3 フラクトオリゴ糖摂取による尿中カルシウムの単位時間排泄量の経時的変化
上段：4g、下段 8g

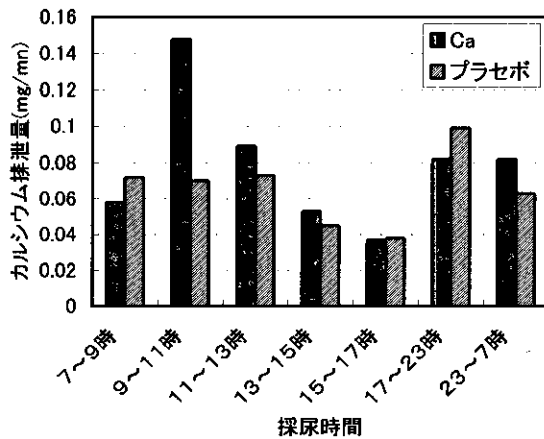
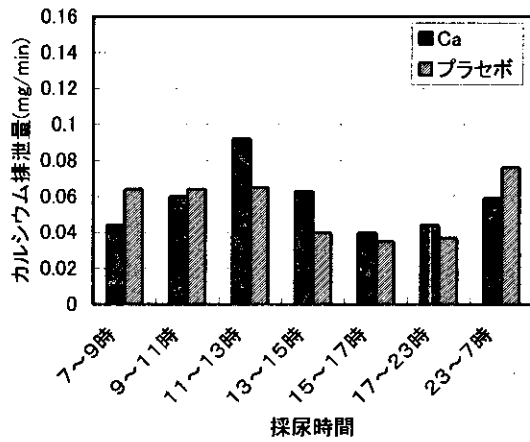
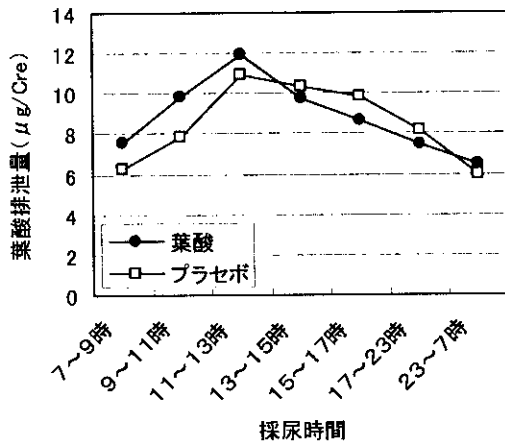


図4 フラクトオリゴ糖 (4g) 摂取による尿中葉酸量の経時的変化



D. 考察

今回のヒト試験では、カルシウムの尿中排泄量が、フラクトオリゴ糖低濃度摂取群では、フラクトオリゴ糖によって有意な上昇が見られた。しかしながら、フラクトオリゴ糖高濃度摂取群では、カルシウムの尿中排泄量がプラセボ群と比較して上昇が見られなかった。これは、本試験では、フラクトオリゴ糖高濃度摂取群では、2時間ごとに全尿を採取せずに、簡便的に一部分、いわゆる中間尿を採取して測定した。とくに中間尿の採取方法が、説明を十分にしたにもかかわらず、被験者によって違いがあったものと考えられる。このためにカルシウム排泄量の正確な評価ができなかったものと考えられる。今後中間尿の利用については、十分な検討が必要と思われる。

カルシウムの排泄量は、フラクトオリゴ糖低濃度摂取群では、摂取2時間後から4時間の間にピークが認められた。一方、フラクトオリゴ糖高濃度摂取群では、摂取後から2時間の間ですでに高い値を示し、単位時間当たりの排泄量は、フラクトオリゴ糖低濃度摂取群の2倍以上であった。これ

らの知見は、フラクトオリゴ糖 4g 摂取によって、カルシウムの吸収量が促進されることを示唆している。また、フラクトオリゴ糖の摂取量が多くなると、カルシウムの吸収がより早い時間に行われているのかもしれない。

フラクトオリゴ糖は、天然にはアスパラガス、ニンニク、ゴボウ、ダイズ、タマネギ、ネギなどに少量ふくまれている。現在は、工業的にも生産されている。フラクトオリゴ糖の化学構造は、ショ糖に1~3個の果糖(フラクトース)が結びついたもので、大腸内のビフィズス菌の増殖を促進し、便秘・高脂血症の改善、老化防止などの効果が認められている。また、肥満や動脈硬化の予防や虫歯の心配のない甘味料として利用価値が高い。本報告では、フラクトオリゴ糖の新たな生理機能として、カルシウムの吸収促進効果が観察された。このような生理作用については、これまでにも、太田ら(1999)がカルシウム補給食品にフラクトオリゴ糖を配合することにより、その食品のカルシウム吸収が高まり、カルシウム補給効果が向上することを示している。

また、上西ら(2002)もフラクトオリゴ糖を配合することにより、麦芽飲料のカルシウム吸収が高まることを報告している。

フラクトオリゴ糖によるカルシウム吸収促進メカニズムは十分に明らかにされていない。最近、Suzukiら(1998)は、イヌリンから微生物発酵によって得られた非消化性糖質である DFA(*d*-D-fructose anhydride)が、フラクトオリゴ糖よりも強いカルシウム吸収促進作用を有していることを報告した。DFAのカルシウム吸収促進作用としては、DFAが小腸での上皮細胞のタイトジャンクションに直接的に作用することや DFAが大腸発酵をうけ産生される短鎖脂肪酸が上皮細胞のタイトジャンクションに間接的に作用することが考えられている。フラクトオリゴ糖の場合にも同じような吸収メカニズムがあるのかも知れない。動物実験ではあるが、非消化性糖質によるマグネシウムなどの吸収促進は、大腸における糖質発酵によって生じた短鎖脂肪酸の刺激作用によることが示唆されている。このような作用が働いているのなら、ミネラルのみでなくビタミンについても吸収が促進されるもと考えられる。この点については、今後、動物実験などにおいてさらに検討が必要である。

以上のように、フラクトオリゴ糖を食品に配合することによってミネラルやビタミンの吸収を促進させることは、これらの栄養素の吸収や生物学的有効性を評価するために重要な意義があると考えられる。

E. 結論

食物繊維の生理作用として、整腸作用をはじめ、血糖の調節作用や血清コレステロ

ールの低下作用などが報告されている。最近、難消化性糖質であるフラクトオリゴ糖には、カルシウムなどのミネラルの吸収作用が示唆されている。そこで、本年度は、健常な男性成人を対象にして、フラクトオリゴ糖のカルシウムおよび葉酸の吸収促進作用について検討した。フラクトオリゴ糖 4g を含む試験食品をカルシウムと一緒に摂取すると、摂取 2 時間後から 12 時間後まで、尿中へのカルシウム排泄量が対照食品に比べ有意に上昇した。このような結果から、フラクトオリゴ糖を含む食品は、カルシウムの吸収を高める作用のあることが示唆された。しかしながら、ビタミンの吸収についてはさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe, T., Ohkawa, K., Kasai, S., Ebara, S., Nakano, Y., and Watanabe, Y.: The effects of dietary vitamin B12 deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. *Cong. Anom.*, 43 : 57-64, 2003.

2) 大川恵子、葛西重信、渡邊敏明、野田博昭： δ -トコフェロールによる THP-1 細胞のアポトーシス誘導。生物ラジカル研究所平成 14 年度報告書、43-47、2003。

3) 葛西重信、大川恵子、渡邊敏明、野田博行：白血球細胞におけるサイトカイン及び活性酸素産生評価。48-53、生物ラジカル研究所平成 14 年度報告書、2003。

2. 学会発表

- 1) 谷口歩美、渡邊敏明：電子スピン共鳴装置を利用したビオチン測定法の開発. 日本栄養・食糧学会代 41 回近畿支部大会、28、2002.
- 2) 渡邊敏明、福井徹：健常成人におけるビオチンの必要量に関する検討. 第 56 回日本栄養・食糧学会講演要旨集. 201、2002.
- 3) 渡邊敏明、若林一郎、榎原修平、中野長久：ビタミンB12 欠乏状態のラット精子形成に及ぼす影響. 日本ビタミン学会第 52 回大会、226、2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

特定保健用食品素材のアレルギー発現と安全性評価に関する研究

分担研究者 廣田晃一 独立行政法人 国立健康・栄養研究所健康・栄養情報研究室長
研究協力者 橋田誠一 宮崎医科大学助教授

大豆のアレルゲンであるトリブシンインヒビター及びその特異抗体の免疫複合体転移酵素免疫測定法を開発した。特定保健用食品素材であるグアーガム中にトリブシンインヒビター様物質の存在することが本測定法及びウェスタンブロット法により検出された。ティモシー等アレルギーを惹起しやすいいくつかの花粉からも検出されたが、大豆以外のその他の特定保健用食品素材からは検出されなかった。また、特異抗体はアレルギーを有する小児および健常人血清から検出された。疾患特異性は明らかではなかった。

A. 研究目的

特定保健用食品素材がアレルギーを惹起する危険がないかその安全性について明らかにすることを目的とした。既に多くの特定保健用食品が開発されているが、その幾つかは過去にアレルギー症例の報告された素材を用いている。したがってそのような素材を用いた特定保健用食品にはアレルギーを惹起する危険性がないとはいえないが、素材を精製、加工して用いている場合には、アレルゲン性も変化あるいは全く消失している可能性も考えられる。食品素材と一口にいても、その種類は多様であり、その加工法も千差万別である。安全性評価は最終的には食品素材中のアレルゲンの特定保健用食品中での残存（アレルゲン性を保持した状態において）が問題になると思われることから、アレルゲンの免疫複合体転移酵素免疫測定法による高感度測定法及びウェスタンブロット法を開発し、種々の素材について検討を行なった。同時に、アレルゲンに対する抗アレルゲン抗体のアレルギー患者及び健常人における存在について検

討するために、抗アレルゲン抗体の免疫複合体転移酵素免疫測定法を開発し、IgG 及びIgE クラスの特異抗アレルゲン抗体の測定を試みた。アレルゲンとして大豆トリブシンインヒビター蛋白(TI)を使用した。

B. 研究方法

1：TI の高感度酵素免疫測定法（ICTEIA）の開発

添付の図を参照。

[材料] 精製 TI は Biogenesis 社より購入した。抗 TI IgG は Rockland 社より購入した。兔抗 2,4-ジニトロフェニル-牛血清アルブミン血清はシバヤギ社より購入した。

[標識抗体調製] SATA を用いて調製した Triacetyl-protected sulphhydryl 非特異兔 IgG を CNBr 活性化法を用いてセファロース 4B に固定化した。続いてこの Triacetyl-protected sulphhydryl 非特異兔 IgG の SH 基を活性化し、EMCS を用いてマレイミド基を導入した TI と結合させ、最終的に TI 固定化セファロース 4B を得た。この TI 固定化セファロース 4B を用いて

TI F(ab')₂ をアフィニティ精製した。抗体の溶出は pH を 2.5 にすることで行った。

アフィニティ精製抗 TI F(ab')₂ を還元後、βガラクトシダーゼによって酵素標識したものと、2,4-ジニトロフェニル牛血清アルブミンで捕捉用標識した 2 種類のコンジュゲートを調製した。

[ICTEIA] TI を酵素標識抗体及び捕捉用標識抗体と 16 時間インキュベーションした後、アフィニティ精製した抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG を固相化した直径 6.4mm のポリスチレンビーズを加え 0.5 時間反応させた。ビーズを洗浄後、2mM ジニトロフェニル-L-リジンと 0.5 時間反応させた後ビーズを除去した。溶出液にストレプトアビジンを固相化したポリスチレンビーズを加え 0.5 時間反応させた。ビーズとの反応は全て室温で 180rpm の振とう下に行った。再びビーズを洗浄後、ビーズ上の βガラクトシダーゼ活性を蛍光基質を用いて測定した。

2: 特異抗 TI 抗体の高感度酵素免疫測定法 (ICTEIA) の開発

[標識抗原調製] SATA 及び EMCS を用いて DNP 標識 TI 抗原及び βガラクトシダーゼ酵素標識 TI 抗原を調製した。

[ICTEIA] ヒト血清を TI の存在下又は非存在下において酵素標識 TI 抗原及び DNP 標識 TI 抗原と 16 時間インキュベーションした後、アフィニティ精製した抗 2,4-ジニトロフェニル基 IgG を固相化した直径 6.4mm のポリスチレンビーズを加え 0.5 時間反応させた。ビーズを洗浄後、2mM ジニトロフェニル-L-リジンと 0.5 時間反応させた後ビーズを除去した。溶出液にマウス

モノクローナル抗ヒト IgE(ε)抗体 (IgG1) あるいはウサギポリクローナル抗ヒト IgG(γ)抗体を固相化したポリスチレンビーズを加え 0.5 時間反応させた。ビーズとの反応は全て 25°C で 210rpm の振とう下に行った。再びビーズを洗浄後、ビーズ上の βガラクトシダーゼ活性を蛍光基質を用いて励起波長 360nm、吸収波長 450nm で測定した。

C. 研究結果

1: ICTEIA を用いた特定保健用食品素材中の TI 様物質の検出

大豆には 15 種以上のアレルゲンが報告されている。表 1 にその主なものを挙げた。ICTEIA による TI 抗原の検出限界は 20 fg(1 amol)/assay であった。

特定保健食品及び食品素材として、大豆(調整豆乳、豆乳ヨーグルト)、グアーガム(ファイバープラス、あおさ粥)、アルギン酸ナトリウム(海のせんいのコーンスープ、コレカットポタージュ)、サイリウム(ヘルシーガム、サイリウムプレーン、イサゴール、コロバランス)、その他 TI との共通抗原を有する可能性のある植物として、ライグラス花粉、ティモシー花粉、オリーブ花粉の各々について ICTEIA による TI 様物質の検出を試みたところ、表 2 に示したような結果が得られた。大豆製品については、いずれの製品においても TI が検出されたが、多糖類を主成分とするグアーガムを素材とする製品においても明らかに TI(様物質)が検出された。他の物質については明らかではなかった。

2: ウェスタンブロットを用いた特定保健

用食品素材中の TI 様物質の検出

次に、表 2 に示した素材について、ウェスタンブロットを用いて TI の免疫染色を試みた。図 1 上段に示すように、TI は 5-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE で分子量二万付近に泳動されるタンパク質である。ICATEIA の結果から予想されるように、豆乳、ライグラス花粉、ティモシー花粉、オリーブ花粉、そしてグアーガム製品のいずれも銀染色で染色される多数のバンドが観察され、図 1 下段に示すように、ウェスタンブロットにおいて、いずれも各々異なる免疫染色像が得られた。

図 2 に示すように、ここで使用したウサギ抗 TI 抗体は、牛乳抗原 (β -ラクトグロブリン)、 α -アミラーゼインヒビター、チキントリプシンインヒビター、卵白抗原、ローヤルゼリーには反応しなかった。

図 3 に示すように、これらの現象は抗 TI 抗体に特異的であり、ウサギ抗 β -ラクトグロブリン抗体を用いた場合には一切観察されなかった。図 4 上段に示すように、ヒト健常人血清においても全く検出されなかった。ヒトアレルギー血清についてはウェスタンブロットをするに足る血清が入手できなかったので行なわなかった。

3: ICTEIA によるアレルギー患者血清中の特異抗 TI 抗体の検出

また特異抗 TI 抗体を含有する血清を、抗体を含まない血清で連続希釈した場合の蛍光強度の変化曲線を図 5 に示した。血清を過剰量の TI とプレインキュベーションすることにより蛍光強度はブランクと同じレベルまで阻害されたことから、特異抗体を測定していることが示唆された。

表 3 に、本 ICTEIA 法を用いて測定した血清の蛍光強度をまとめた。特異的 IgE の測定値の絶対値は IgG に比して低かったが、IgE の中だけで見れば、今回のアレルギー児 75 例は未確認例も含めてほとんど大豆アレルギーの陰性児であったにもかかわらず、健常者 14 例とは異なる分布を示した。しかし健常者の中にも一例高値を示した血清があり、また健常者と患者血清の蛍光強度にはかなりの重なりが見られた。IgG の測定値はほぼ IgE の測定値に比例していたが、かならずしも一致しているわけではなかった。

D. 考察

特定保健用食品素材には食品アレルギーを惹起することが良く知られているものがある。しかし、昨年度の文献調査の結果からも明らかなように、その大半は、職業的に連続的な接触が避けられない場合にまれに観察される症例である。ただ、これは特定食品素材が従来食品としては用いられてこなかったということを意味するだけかも知れず、安全性に問題がないと結論するのは早計であるように思われる。例えば、サイリウムのように医薬品として大量に用いられていたために医療関係者が感作されたり、また一般的なシリアル素材として用いられるようになって、急速にアレルギー被害を拡大した例も知られているからである。

結果より明らかなように、免疫的に TI に類似した物質が検出されたグアーガムは、インド産の植物 *Cyamopsis tetragonolobus* から取られ、職業病の一種として、鼻炎と喘息が下記の 5 報に報告されている。

Kanerva, L. et al.; Occupational allergic rhinitis from guar gum. *Clin. Allergy*, 18: 245-252 (1988).

Lagier, F. et al.; Occupational asthma caused by guar gum. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 85: 785-790 (1990).

Malo, J.-L. et al.; Prevalence of occupational asthma and immunologic sensitization to guar gum among employees at a carpet-manufacturing plant. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86: 562-569 (1990).

Cloutier, Y. et al.; Validation of an exposure system to particles for the diagnosis of occupational asthma. *Chest*, 102:402-407 (1992).

Lemiere, C. et al.; Persistent specific bronchial reactivity to occupational agents in workers with normal nonspecific bronchial reactivity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162: 976-980 (2000).

アルギン酸ナトリウムが実質的にはアレルギーの症例報告が存在しないのに較べれば、これは決して少ない数ではない。

しかし、その原因となるアレルゲンについては全くわかっていない。

ICTEIA 法は免疫学的な特異性の高い検出法の中でも最も検出感度の高い方法の一つであり、抗体との反応によって検出するのでアレルゲンの検索には適していると思われる。しかし、用いる抗体の種差(ウサギとヒトのように)や抗体のクラス (IgG と IgE) などによって免疫反応は異なってお

り、あくまでも可能性に留まる。

グアーガムの中に、今回用いた抗 TI 抗体と反応する物質が存在し、それがグアーガムを素材とした特定保健用食品にも残存しているらしいことは、ICTEIA 及びウェスタンブロットでともに検出されたことから明らかであるが、ウェスタンブロットの結果では、明瞭な蛋白バンドとしては検出されず、アーチファクトである可能性も否定できなかった。

ライグラス、ティモシー花粉については分子量は異なるものの、明瞭な蛋白バンドとして観察された。しかし、ライグラス等は ICTEIA においては極めて低値である。これはつまり翻ってみれば、もしグアーガムで明瞭なバンドが得られれば、ライグラス等とは比較にならないくらい明瞭なバンドが得られるということの意味する。

とはいうものの、新しく開発された TI に対する特異抗体の ICTEIA の結果では、健常人においても IgE 高値血清が存在する場合があります、アレルゲンとしての特異性にも若干の疑問が残る結果となった。

したがって、グアーガム中に大豆アレルゲン様の物質が存在する可能性は否定できないとしても、それが存在した場合にアレルギーを惹起し得るかどうかは不明であるといわざるを得ない。

今後さらにこのアレルゲン様物質の同定を進めることにより、実体を明らかにすることで、より精密な議論が可能になるであろう。グアーガムが喘息の原因となることは上記の文献から明白である。原因物質を明らかにすることで、食品素材としての安全性をより向上させることにつながると思われる。

E. 結論

特定保健用食品素材であるグアーガム中にトリプシンインヒビター様物質の存在する可能性が示唆された。大豆以外のその他の特定保健食品素材からは検出されなかった。しかし、この抗原に対する特異抗体はアレルギーを有する小児および健常人血清双方から検出され、疾患特異性は明らかではなかった。

F. 健康危険情報

グアーガム中に大豆アレルギー様物質の存在する可能性が示唆されたが、それがただちにアレルギーを惹起する危険性には結びつかないと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Hirota, T. Kamashima, S. Hashida, M. Totani: Immune complex transfer enzyme immunoassay for anti-ovalbumin IgA in serum. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 482-486.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表1 大豆に含まれるアレルゲンの一覧*

Allergen	M.W. kD	Reference	Nature
Gly m 3	14	1	Profilin
20-kD protein	20	2	G2 glycinin (basic chain) (11S)
21-kD protein	21	2	trypsin inhibitor
Gly m Bd 28K	28	3	-
Gly m Bd 30K	30-34	4	thiol protease
	40	1	G1 glycinin (acid chain) (11S)
	45	2	20-kD aggregate
Gly m Bd 60K	68-70	1	α -subunit of β -conglycinin (7S)
	7,12,20,39,57	5	protein bands identified in soy lecithin

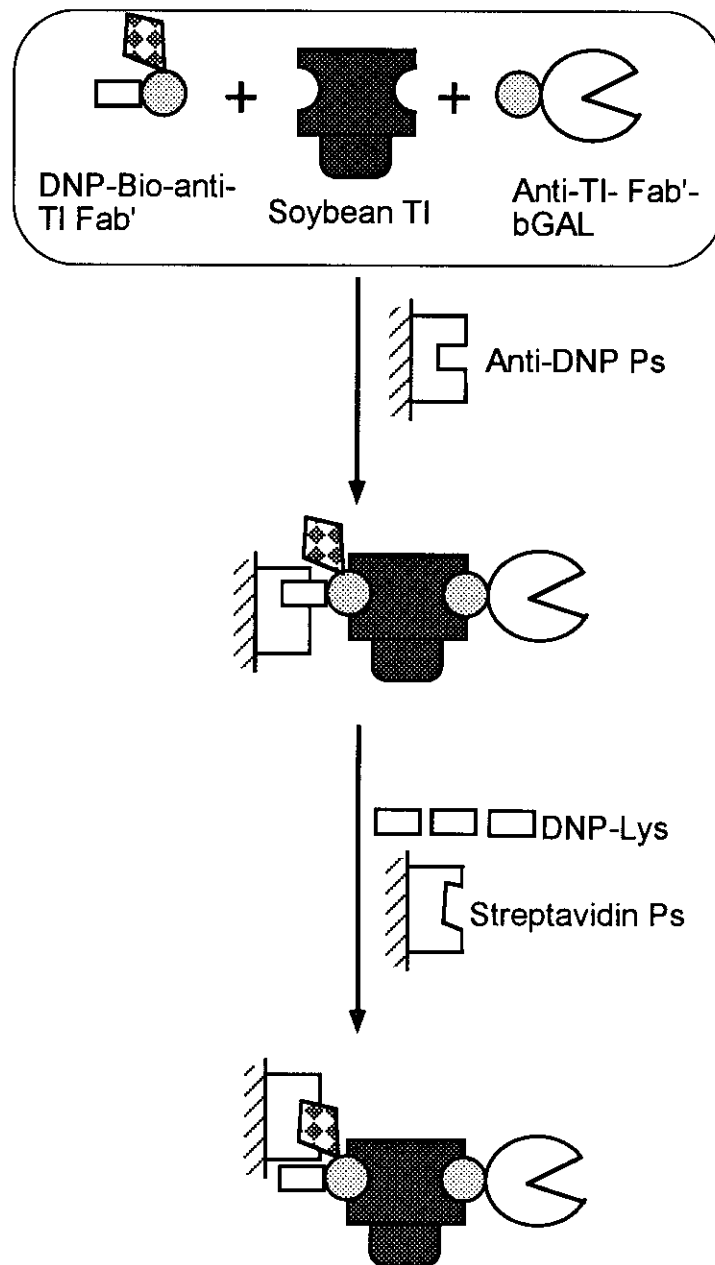
References

1. Beardslee TA, Zeece MG, Sarath G, Markwell JP : Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:299-307
2. Helm RM, Cockrell G, Connaughton C, Sampson HA, Bannon GA, Beilinson V, Livingstone D, Neilson NC, Burks AW : A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:205-212
3. Bando N, Tsuji H, Hiemori M, Yoshizumi K, Yamanishi R, Kimoto M, Ogawa T : Quantitative analysis of Gly m Bd 28K in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Nutl Sci Vitaminol* 1998; 44:655-664
4. Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K, Sasoka K : Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with sera of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutl Sci Vitaminol (Tokyo)* 1991;37:555-565
5. Gu X, Beardslee T, Zeece M, Sarath G : Identification of IgE-binding proteins in lecithin. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126:218-225

* P.Frank et.al. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:212-219より

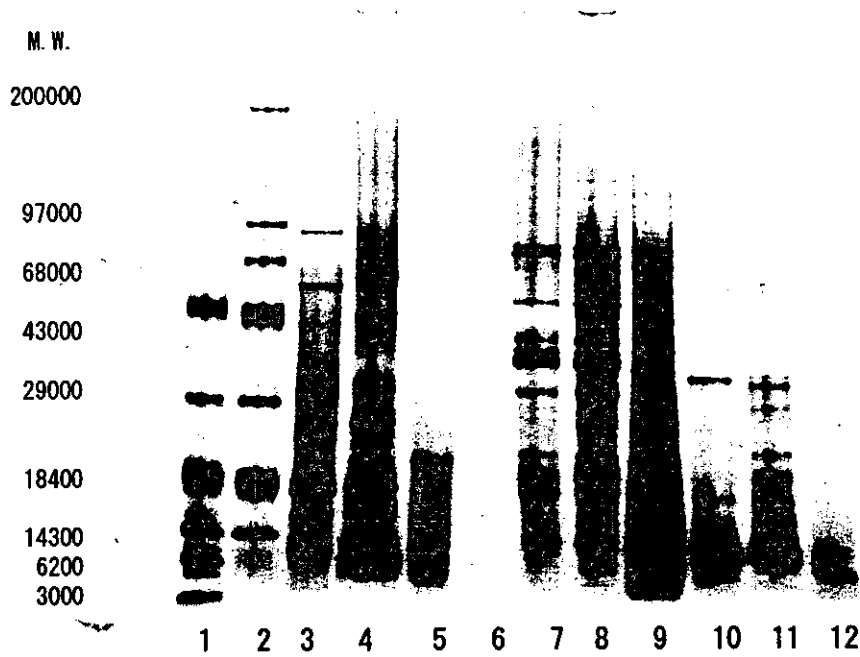
表2 大豆トリプシンインヒビター類似物の含量を測定した特定保健用食品その他

素材	商品	トリプシンインヒビター測定値 (fmol/mg by ICT EIA)
大豆	調整豆乳	96
	醗酵豆乳食品(豆乳ヨーグルト、トーラク株式会社)	127.6
グアーガム	GUM GUAR (Sigma, Lot120K0017)	357.9
	粉末清涼飲料(ファイバープラス、オルビス株式会社)	187.3
	米飯類(あおさ粥、一番食品株式会社)	3.57
アルギン酸ナトリウム	Sodium Alginate(和光、Lot DWK5932)	1.62
	ポタージュスープ(海のせんいのコーンスープ、ノエビアNKI)	6.8
	ポタージュスープ(コレカットポタージュ、カイゲンO)	4.7
サイリウム	サイリウムシードガム(ヘルシーガム、大日本製薬株式会社)	2.5
	食物繊維加工食品(サイリウムプレーン、日清食品NDA)	3.3
	粉末清涼飲料(イサゴール、フィプロ製薬株式会社)	3
	粉末清涼飲料(コロバランス、日清ファルマ株式会社)	6.5
各種アレルゲン	Ryegrass (grass mix, GREER Lab. Inc.)	0.2
	Timothy Grass (grass mix, GREER Lab. Inc.)	0.31
	Olive (pollen, GREER Lab. Inc.)	0.16

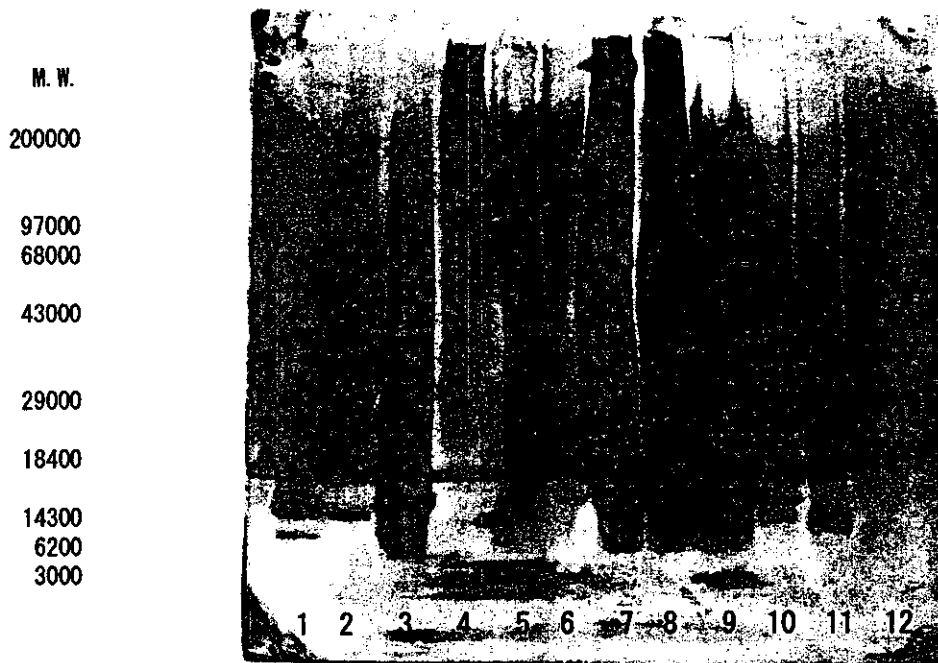


大豆トリプシンインヒビターの免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICTEIA)の模式図

1) 銀染色



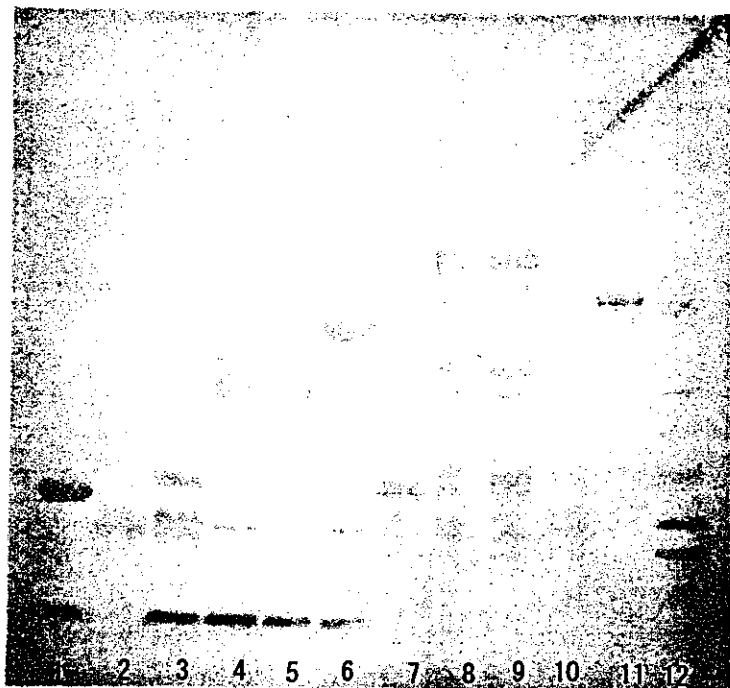
2) ウェスタンブロット



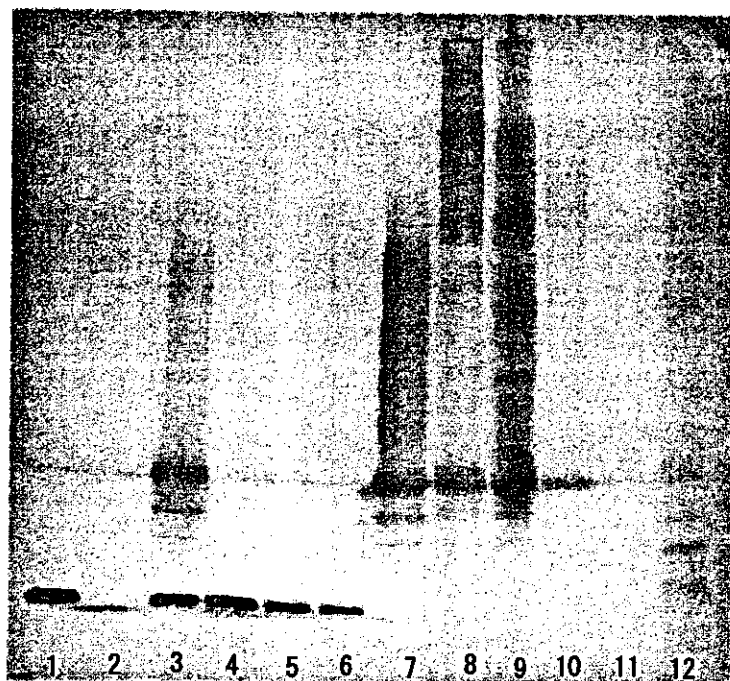
- | | | |
|---------------|-------------------|------------------|
| 1. 低分子量マーカー | 2. 高分子量マーカー | 3. 大豆トリプシンインヒビター |
| 4. グアーガム | 5. あおさがゆ | 6. ファイバープラス |
| 7. きなこの入った豆乳 | 8. 調整豆乳 | 9. 豆乳ヨーグルト |
| 10. Rye Grass | 11. Timothy Grass | 12. Olive Pollen |

図1 抗大豆トリプシンインヒビター抗体と反応する食品・素材の銀染色及びウェスタンブロット

1) CBB染色



2) ウェスタンブロット



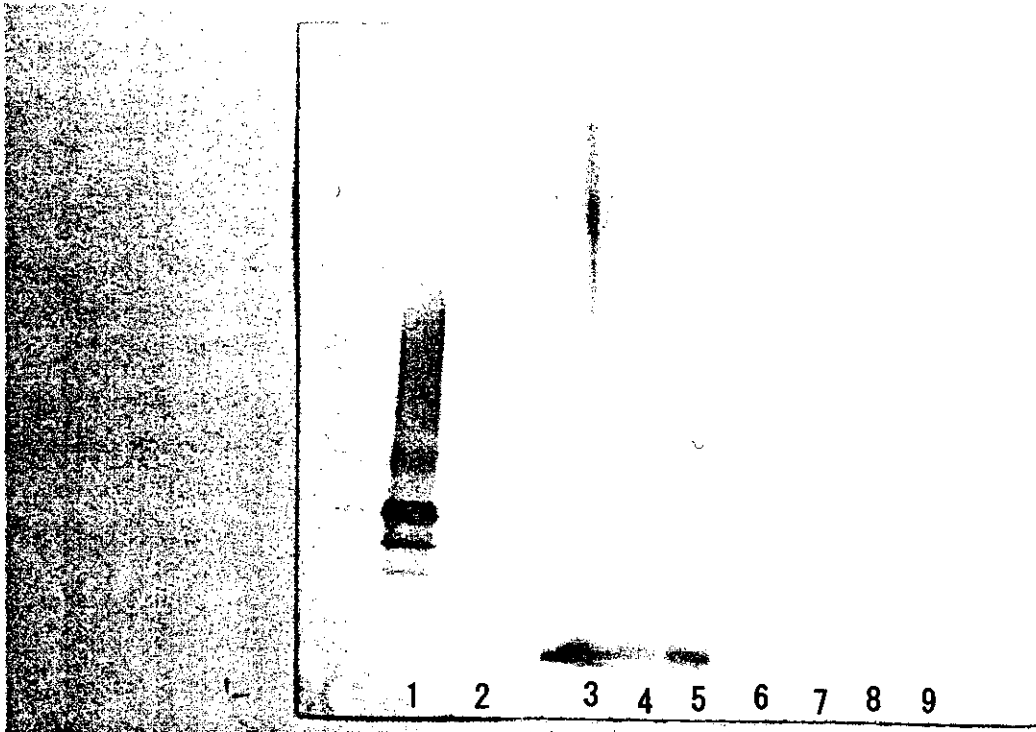
- | | | |
|-------------------------------|------------------------|------------------|
| 1. β Lactoglobulin | 5. 卵白 (ゆで) | 9. 調整豆乳 |
| 2. α Amylase Inhibitor | 6. 卵白 (生) | 10. 豆乳ヨーグルト (特保) |
| 3. 大豆Trypsin Inhibitor | 7. 大豆Trypsin Inhibitor | 11. Royal Jelly |
| 4. チキンTrypsin Inhibitor | 8. きなこ豆乳 (特保) | 12. MW マーカー |

図2 抗大豆トリプシンインヒビター抗体と反応する食品・素材のCBB染色とウェスタンブロット

1) 抗 β LG抗体

1 2 3 4 5 6 7 8 9

2) 抗TI抗体



1. Trypsin Inhibitor

2. β Lactoglobulin

3. グアーガム

4. ファイバープラス

5, 6. あおさがゆ

7. Rye Grass

8. Timothy Grass

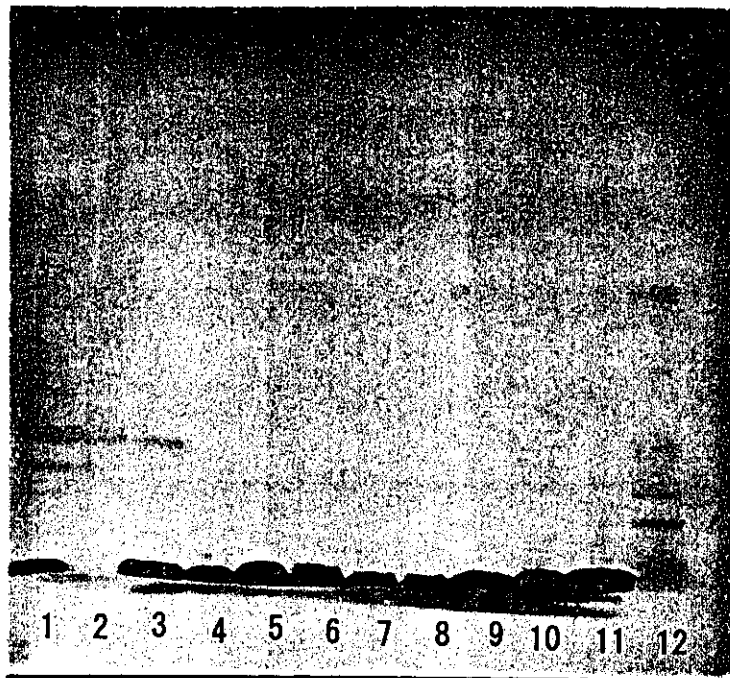
9. Olive

図3 抗 β ラクトグロブリン抗体と抗トリプシンインヒビター抗体とを一次抗体としたときの比較

1). ヒト血清

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

2). ウサギ抗trypsin Inhibitor血清



- | | | |
|----------------------|----------------|--------------|
| 1. Trypsin Inhibitor | 5. あおさがゆ | 9. サイリウムプレーン |
| 2. 調整豆乳 | 6. ファイバープラス | 10. イサゴール |
| 3. 豆乳ヨーグルト | 7. 海のせんいのコンスープ | 11. コロバランス |
| 4. グアーガム | 8. コレカットポタージュ | 12. MWマーカ- |

図4 ウサギ抗トリプシンインヒビター(TI)抗体とヒト血清とのTIに対する反応性の比較

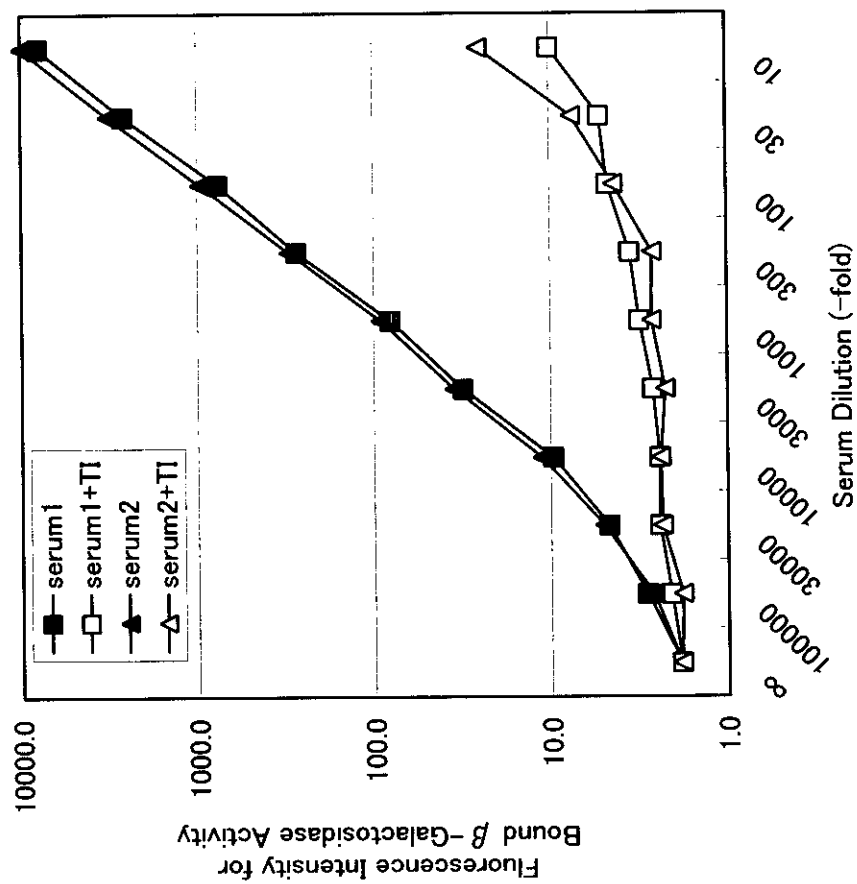


図5a 抗トリプシンヒビター-IgG抗体含有血清の希釈曲線

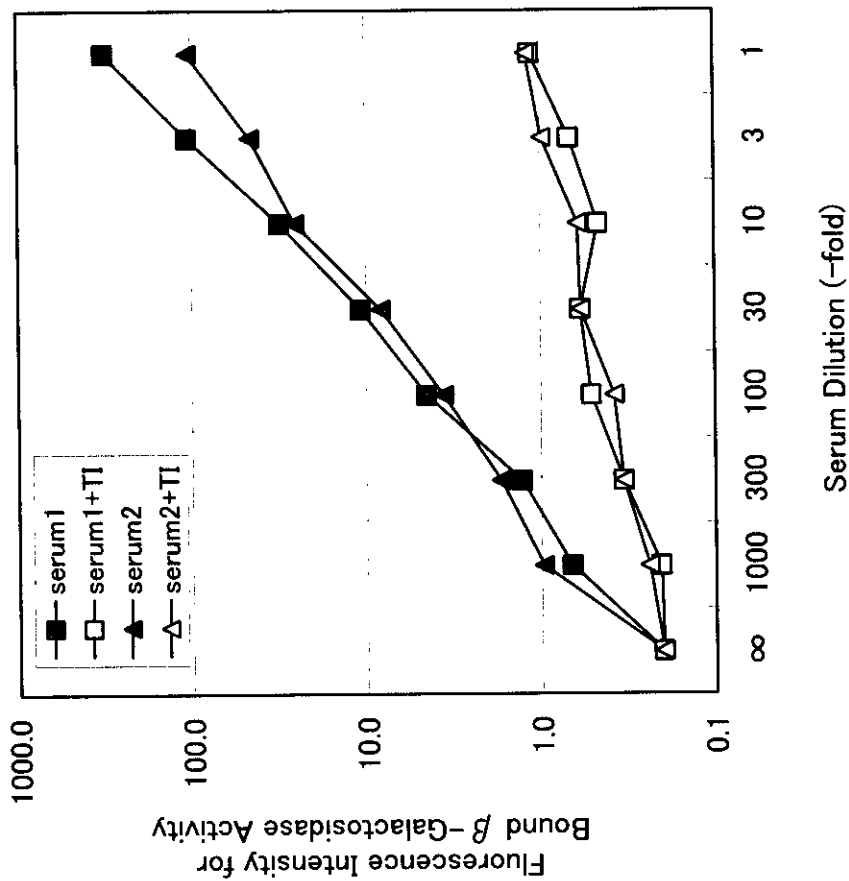


図5b 抗トリプシンヒビター-IgE抗体含有血清の希釈曲線