総 説

低アレルギー米の開発[†]

渡 辺 道 子

東京学芸大学教育学部

Development of Hypoallergenic Rice Grains

Michiko WATANABE

Faculty of Education, Tokyo Gakugei University, Koganei 184

1. 緒 言

卵白、牛乳、大豆は3大アレルギーといわれている。山田らの調査によれば¹⁾、食物アレルギーに起因するアトピー性皮膚炎患者の原因食品のうち、3大アレルギー食品に比べて小麦や米といった穀物アレルギーの人が予想以上に多い。なかでも米は日本人の主食であり、摂取量が多いために、米起因性アレルギー患者が最近日本で顕著に増加してきており²⁾、低アレルギー米の開発はわが国で強く要望されていた。

米アレルギー患者は、アトピー性皮膚炎の症状を呈する。アトピー性皮膚炎は、次の3段階の過程を経て発症するといわれている³⁾。第1に、乳幼児期に牛乳や卵白などのイニシエーターアレルギーが体内に入って食物トランスが成立するが、成長とともに大部分の人ではこの体質は治ってしまう。一部の人はダニや排気ガスなどが体内に入ることによって食物トランスが破綻し、さらに、穀物アレルギーなどのアクセレーターアレルギーが体内に入ると、重症アトピー性皮膚炎となり、かゆみの閾値低下、皮脂分泌障害、異常な血管反応といった生理学的機能異常が現れるという仮説³⁾が提出されている。

米起因アトピー性皮膚炎患者は、皮膚に水疱ができて赤く腫れあがり、かゆみを訴える。この米起因アトピー性皮膚炎患者は米を食事から除去すると正常に戻るが、多くの場合、植物分類学上近縁な麦類（小麦、ライ麦および裸麦）やとうもろこしなどの摂取によってもアトピー性皮膚炎の症状がでるため、粟や稗を主食としているのが現状である。米アレルギーの素因をもつ人々がアレルギーの症状をだすことなく食べられる低アレルギー

米の開発が皮膚科学会、小児科学会はもとより、一般社会からも強く要望されているにもかかわらず、臨床的に満足できる成果をあげられるような米は存在しなかった。

米や小麦のアレルギーは特有のタンパク質性の微量成分である。したがって、アレルギーの性質を明らかにした上で、それを特異的に分解すれば、アレルギー低減化ができるはずであり、社会的ニーズにも応えることができると考えられる。本研究は、アレルギーを極端に低減化した米を工業規模で生産するための基盤を確立することを目的とした。

2. 低アレルギー米の製造工程

1) アレルギー分解過程

米起因アトピー性皮膚炎の原因物質は、16 kD のタンパク質であると報告されている⁴⁾⁵⁾。このタンパク質のエピトープ構造を分解することによって、アレルギー除去米あるいは低アレルギー米ができるはずである。アレルギーとなる特定のタンパク質を除去する方法として、このタンパク質をコードする遺伝子の除去またはその発現の制御が考えられるが、これには、長期的な展望に立った研究が必要なばかりでなく、このタンパク質がイネにとって重要な成分である場合には、種子が稔らないというリスクも考えられる。さしあたっては、このタンパク質の抽出などの物理化学的方法とタンパク質の分解などの酵素工学的な方法とが考えられる。

筆者らは、まず、米のアレルギーがどのような物質であるかを確認した。米は、高温多湿な夏期に古米化し、風味が劣化するだけでなく、加工もしにくくなる。古米化を防ぐためには、夏期に米を冷蔵保管しなければならない。宮崎県は早稲米の産地で、この冷蔵保管の期間を短縮できるという特典をも加味して、宮崎県産コシヒカ

[†] 本総説は平成4年度学会賞の対象となったものである。

リ新米を供試米とした。米を 48 メッシュ以下に粉碎してから水、1 M 食塩、60% エタノール、4% 酢酸の順に抽出し、抽出物と残渣を流水透析後、凍結乾燥した。それぞれの抽出物と残渣の抗原性を患者の血清を用いた RAST (radioallergosorbent test) 法⁶⁾で測定すると、大部分の患者血清は塩溶性画分に反応したが、一部の患者血清は酢酸可溶性画分にも反応した (Table 1)。このことについては、後述する。この結果から、大部分の患者血清が反応する塩溶性タンパク質画分を除こうと考え、この画分をある程度低分子化してから水洗する方法を採用した。低分子化にはタンパク質分解酵素を用いた。酵素使用量は、基質 (タンパク質) 重量の 1/100 とし、反応時間は 24 時間、反応温度は 37°C とした。各種酵素で塩溶性タンパク質画分を処理すると、キモトリプシン、トリプシン、ペプシン、パンクレアチンといった消化管分泌酵素では水解度 (全窒素に対する 10% トリクロ酢酸可溶性窒素の%) が低く、抗原性も残った。RAST 法では、0.34 PRU/ml 以下を抗原性が陰性であるとする。得られた結果は、ヒトの消化管内で抗原性タンパク質が抗原性を失うまでは消化されないで、体内に入っていくという事実を支持している。アクチナーゼとパパインは塩溶性タンパク質をよく水解し、抗原性も低下させた (Table 2)。

Table 1. Allergenicities (PRU/ml) of proteins fractionated from rice.^a

Serum	Protein fraction				
	Water soluble	1 M NaCl soluble	60% ethanol soluble	4% acetic acid soluble	Residue
1	2.5	3.8	1.3	0.9	0.6
2	1.0	0.6	<0.34	<0.34	<0.34
3	<0.34	0.5	0.7	<0.34	<0.34
4	<0.34	0.5	<0.34	<0.34	0.5
5	<0.34	0.6	<0.34	1.1	<0.34
6	1.6	3.6	<0.34	0.7	<0.34
7	<0.34	0.4	<0.34	0.5	<0.34
8	0.4	0.6	<0.34	<0.34	<0.34
9	<0.34	<0.34	<0.34	0.8	<0.34
10	1.4	1.7	1.4	2.4	1.3

^a Each fraction (5 mg on a dry matter basis) was dispersed in 0.1 M carbonate (pH 8.4, 1 ml) and then coupled with the CNBr-activated paper disc (5 mm in diameter, advantec No. 6) at 4°C for 72 h. The protein-coupling disc was submitted to RAST⁶⁾ using sera from outpatients with rice-associated atopic dermatitis at Yokohama City University Hospital. Allergenicity was expressed by Phadebas RAST unit/ml (PRU/ml).

Table 2. Hydrolysis of the salt-soluble fraction by proteases and allergenicities of the resulting hydrolysates.

Enzyme	Reaction pH	Degree of hydrolysis (%)	Allergenicity ^a (PRU/ml)
Actinase AS	9	94.3	<0.34
Papain	9	86.2	1.6
α -chymotrypsin	9	72.4	3.4
Trypsin	9	70.1	3.6
Pepsin	1.5	58.9	4.2
Pancreatin	9	53.5	4.8
None ^b	9	0.0	3.8

^a Serum No. 1 in Table 1 was used for the test.

^b Control.

米粉と米粒にアクチナーゼとパパインを作用させて抗原性を測定したところ、無処理の米で 5.1 であった RAST 値が、米粒ではアクチナーゼ処理によって 1.1 に、パパイ処理によって 3.9 に低下した。米粉ではアクチナーゼ処理によって 0.34 以下に、パパイ処理によって 1.6 に RAST 値が低下した。この結果から、使用酵素にはアクチナーゼを選んだ。アクチナーゼはもともと食肉軟化用に開発された酵素で、食品加工に用いることができる。アクチナーゼ処理米粉の抗原性は陰性であったにもかかわらず、米粒では抗原性が残ってしまった。われわれ日本人は、米を粉末にして調理・加工するのは煎餅類や和菓子くらいで、食習慣から考えて、米粒のまま炊飯して摂取するのが普通である。そこで、米粒そのものからアレルゲンを除去しなければならなかった。

米には気泡が含まれている。米粉と米粒で酵素処理効果に違いがでたのは、この気泡のために酵素が米粒に一樣に浸透しないためと考え、酵素溶液の浸透助成のために、界面活性剤の使用と減圧による脱気を試みた。アレルゲンタンパク質は胚乳部に一樣に存在するといわれている⁵⁾。このアレルゲンタンパク質を分解する場合、四つの条件が必要であった (Table 3)。第一は、新米を使用することであった。古米がブレンドされている標準価格米では、抗原性を消失させることはできなかった。第二に、抗原性タンパク質を可溶化した状態にするために、炭酸緩衝液を用いて pH 9 という弱アルカリ性で酵素反応を行うことであった。第三に、酵素溶液の浸透性を助長する意味で、水の表面張力を著しく低下させる界面活性剤をこの酵素溶液に添加することであった。界面活性剤を使用する場合、pH 9 でも有効に界面活性を示し、酵素を失活させることがなく、脱気操作を考慮して発泡しないことが要求された。食品への使用が認可されている界面活性剤として、Table 4 に示していくつか

Table 3. Effects of enzymatic reaction conditions on allergenicity of the product.

Material	Solvent	Surfactant concentration (ppm)	Degassing	Enzyme/rice ratio	Allergenicity ^a (PRU/ml)
Newly harvested	Water	0	Without	1/100	1.6
	Water	20	Without	1/100	0.8
	Water	0	With	1/100	0.7
	Water	20	With	1/100	0.7
	1 M carbonate ^b	0	Without	1/100	1.1
	1 M carbonate	20	Without	1/100	0.4
	1 M carbonate	0	With	1/100	0.6
	1 M carbonate	10	With	1/100	0.4
	1 M carbonate	20	With	1/100	<0.34
	1 M carbonate	20	With	3/1000	0.7
	1 M carbonate	20	With	1/1000	1.3
	1 M carbonate	10	With	3/1000	0.9
	1 M carbonate	10	With	1/1000	1.3
	1 M carbonate	20	With	0	5.1
Commercially available	1 M carbonate	20	With	1/100	0.9

^a Serum No. 1 in Table 1 was used for the test. ^b pH 9.0.

の界面活性剤製品を詳細に検討した結果、発泡しないという点で、カブロン酸モノグリセリドとオレイン酸モノグリセリドが選ばれた。酵素活性阻害率が低いという点ではカブロン酸モノグリセリドのほうが優れていたが、この界面活性剤は製品に短鎖脂肪酸臭をつけるという欠点があったので、オレイン酸モノグリセリドを最終的に選んだ (Table 4)。第四の条件は、界面活性剤を添加した酵素溶液に浸漬した米粒を減圧下におき、米粒の細孔に包蔵されている気体を放出させ、酵素溶液の浸透を容易にすることであった。この四つの条件下で 37°C で 1 日静置することによって酵素処理した米粒は、患者血清を用いた RAST 値が 8 例中 6 例で 0.34 以下となり、低アレルギー化していることがわかった (Table 5)。

2) 品質改良過程

アルカリ性の条件にさらされた米は褐色を呈する。これは、米に含まれている色素の性質によるためで、酸処理を施せば白度を回復することができる。ところが、酵素反応の溶媒に炭酸緩衝液を用いているので、そのまま酸処理したのでは発生する二酸化炭素のために米が割れてしまう。炭酸緩衝液を除くために、酵素処理した米を網袋に入れ、流水中に浸すことによって水洗した。この水洗工程をここでは 1 次水洗と呼ぶ。水洗過程で米粒中のナトリウム濃度を測定したところ、2 時間の水洗でもともと米粒に含まれているナトリウム濃度と同程度になった。このことから、2 時間の水洗で炭酸塩が抜けていると判定し、塩酸処理を行った。塩酸濃度は 0.1 N、

処理時間は 10 分程度で十分であった。

酸処理を施すと、米が白くなるが、酸味が残る。酸味を除くためには水洗をしなければならない。この水洗工程をここでは 2 次水洗と呼ぶ。2 次水洗過程は酸だけでなく酵素反応生成物や反応時に使った成分を除いて米の食味を高めるという重要な過程なので、1 晩から 1 日とした。2 次水洗の方法は 1 次水洗と同様である。

処理後の米粒をそのまま乾燥すると、碎米化しやすい。処理米の表面には、デンプン粒が存在していたので (Fig. 1), 蒸煮によって表面に存在するデンプンの糊化を行い、乾燥米の脆弱化を防止した。蒸煮は大気圧下で、水蒸気が上がってきてから約 2 分程度、米の表面が透明化するまで行った。蒸煮された米は、米粒どうしが付着しないように揉みほぐしながら、熱風をあてて乾燥した。

このようにして得た製品を炊飯して消費者パネルによる官能検査をしたところ、Table 6 に示す結果が得られた。低アレルギー米は、とくに外観および粘りが優れており、この 2 項目では原料として用いたコシヒカリよりも有意に高い評価が得られた。外観で評価が高かったのは、低アレルギー米の飯が白くてつやがあるためであった。さらに、粘りがあるということは、アクチナーゼ処理で米粒からデンプンの遊離が促進されると同時に、デンプン表面を覆っている疎水性の 60 kD の タンパク質が分解・除去されて、糊化度の高いデンプン糊が米粒表面を覆ったため⁸⁾⁹⁾と推察される。総合評価でも、低アレルギー米飯は原料のコシヒカリの米飯に劣らないと評

Table 4. Properties of surfactants.

Surfactant	Foam formation ^a	Surface tension ^b (dyn/cm)	Actinase inhibition ^c (%)
Sugar ester			
Stearic acid	+	57	49
Palmitic acid	+	56	52
Oleic acid	+	58	52
Myristic acid	+	57	54
Lauric acid	+	57	59
Monoglyceride			
Stearic acid	+	66	38
Oleic acid	—	52	39
Capric acid	—	54	15
Sorbitan monoester			
Stearic acid	+	67	36
Palmitic acid	+	65	35
Oleic acid	+	52	20
Lauric acid	+	51	12

^a Surfactants were used at 10 ppm each. +, stable foam formed and —, no stable foam formed during degassing at 20 mmHg. ^b Surfactants were used at 100 ppm. Surface tension was measured at 20°C. ^c The saltsoluble fraction (1 g on a dry matter basis) was dispersed in 1 M carbonate (pH 9.0, 1 ml) in the presence or absence of each of the surfactants at 100 ppm and used as a substrate solution. The substrate solution was hydrolyzed with actinase at an enzyme/substrate ratio of 1/100 at 37°C for 24 h. The reaction was stopped by adding trichloroacetic acid (TCA, 10% in final concentration) and then the TCA-soluble nitrogen was determined. Actinase inhibition was expressed by $(1 - N/N_c) \times 100$, where N is TCA-soluble nitrogen amount in the presence of the surfactant and N_c is that in the absence of the surfactant.

Fig. 1. A scanning electron micrograph showing the surface of the hypoallergenic rice. The bar represents 10 μ m.

Table 5. Allergenicities of the final product as hypoallergenic rice and those of newly harvested rice as the material.

Serum	Allergenicity (PRU/ml)	
	Hypoallergenic rice	Material
1	<0.34	5.1
11	<0.34	7.1
12	<0.34	3.1
13	<0.34	1.0
14	<0.35	0.7
15	<0.34	0.4
16	0.5	0.4
17	9.9	6.2

Table 6. Sensory scores of hypoallergenic rice and the commercially available rice after cooking.

Parameter	Sensory score ^a	
	Hypoallergenic rice	Commercially available rice ^b
Overall ^c	1.2 $\pm$ 1.0*	-3.3 $\pm$ 0.7#
Appearance ^d	1.3 $\pm$ 1.2*	-1.4 $\pm$ 0.8#
Stickiness ^e	2.9 $\pm$ 0.3*	-2.5 $\pm$ 0.6#
Odor ^f	-0.3 $\pm$ 0.3	-0.3 $\pm$ 0.5
Taste ^g	-0.1 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.5

^a Material grains were cooked and then used as the reference for sensory test.⁷⁾ The reference scores at 0. A trained consumer panel of 24 members was used. * and # mean significant superiority and significant inferiority to the reference at 1% level. ^b Control. ^c 5, very favorable; -5, very unfavorable. ^d 5, very bright; -5, not bright. ^e 5, very sticky; -5, not sticky. ^f 5, very good; -5, very bad. ^g 5, very good; -5, very bad.

価された。患者の大部分もこの低アレルギー米の飯を普通の米飯と同じかそれよりもよく、主食としている粟や稗よりもよいと答え、低アレルギー米を受け入れた。すなわち、通常の米と同じような嗜好性を示す低アレルギー米を作製する新しいプロセス^{10)~12)}が確立されたことになる。

低アレルギー米の作製プロセスは Fig. 2 のように要約される。工程はアレルギー分解過程と品質改良過程の二つの過程からなる。新米に米の 1/100 重量のアクチナーゼ AS と 20 ppm のオレイン酸モノグリセリドを溶かした 1 M 炭酸緩衝液を加え、よく脱気して、37°C で 1 日静置して、アレルギーを分解する。これが、アレ

Fig. 2. The proposed process for producing the hypoallergenic rice.

ルゲン分解過程である。できた酵素処理米は、2時間の1次水洗の後、0.1N 塩酸に10分間浸して1晩から24時間の2次水洗を行う。2次水洗後、脱水機にかけてから、大気圧で蒸煮し、揉みほぐしながら熱風乾燥する。これが、品質改良過程である。

3. 低アレルギー米の抗原性評価

このプロセスを確立するには、多くの実験が行われたが、その成否は、作製した米粒からアレルギーが分解・除去されているかどうかを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)¹³⁾ によって、またその米粒が米起因のアトピー性皮膚炎患者の血清と反応しないことを RAST⁶⁾ によって測定することで判定した。確立したプロセスによって作製した低アレルギー米とその原料についての SDS-PAGE のパターンを比較すると、酵素反応によって塩溶性タンパク質画分、とくに 16 k アレルギーはよく分解されている反面、米粒中のタンパク質の大部分を占めるグリテリン画分はそれほど分解されていないことがわかった (Fig. 3)。このことは、タンパク質栄養価に大きな影響を与えることなく、アレルギーを低減化させることができたことを意味している。

上述のように、米起因アトピー性皮膚炎の素因をもつ患者8名から供与された血液を用いて RAST を行った結果、原料米に対してはかなりの個人差があるものの、8例とも陽性あるいは擬陽性を示したが、低アレルギー米に対しては2例を除いて陰性 (0.34 以下) となり、免疫学的にも前記のプロセスが有効であることを確認できた (Table 5)。ついで、低アレルギー米を炊飯し、患者7名に試食してもらった。そのうち1名は皮膚炎が発症したので即時投与を中止したが、残りの6名は1週間から2週間摂取し続けても皮膚炎が発症せず、臨床的に有

Fig. 3. SDS-PAGE of proteins fractionated from the hypoallergenic rice and its material.

A, salt-soluble fraction from material rice (0.83 mg); B, salt-soluble fraction from the hypoallergenic rice (83 mg); C, alkali-soluble (glutelin) fraction from the material rice (0.83 mg); D, alkali-soluble fraction (glutelin) from the hypoallergenic rice (0.83 mg); and M, marker proteins.

効であると判定された (Table 7)。Table 5 および 7 で有効でないと判定された患者は、おそらく 4% 酢酸可溶性・タンパク質画分に反応する (Table 1) のものと考えられ、医師の診断のもとに低アレルギー米が供給されなければならないことを示唆している。低アレルギー米が有効と判定された患者に 10~15 週間にわたって食べてもらい、その間のアレルギー症状の変化をみると、大部分の患者で症状が改善されていた¹⁴⁾。このことは、低アレルギー米を食べ続けることによって、米アレルギーを治療できる可能性があることを示唆している。

Table 7. Performance of feeding the hypoallergenic rice to seven patients with atopic dermatitis.

Patient	Age	Sex	Feeding period	Symptom
A ^a	14	Female	2 weeks	Negative
B	4	Male	1 week	Negative
C	5	Male	1 week	Negative
D	16	Female	2 weeks	Negative
E	18	Male	1 day	Positive
F	19	Male	2 weeks	Negative
G	34	Female	2 weeks	Negative

^a Presenting her serum (No. 1 in Table 1).

4. おわりに

筆者らが開発した米アレルギー除去法は、新しい技術思想に基づくものであり、作製された低アレルギー米は必然的に新しい機能性食品として位置づけることができる。現在、この低アレルギー米は、工業規模で製造され、医師の診断書と引換えに通信販売によって多くの患者に供給されている。

本研究は、東京大学農学部荒井総一教授の指揮下で行われたものであり、研究を遂行するにあたって、開発研究を東京大学農学部農芸化学科食糧化学研究室（荒井総一、渡辺道子、吉澤貴史）、資生堂基礎科学研究所（柳澤哲也、平尾哲二）および佐竹製作所（安部紀代子）が担当し、臨床研究を横浜市立大学医学部皮膚科（池澤善郎）、横浜市民病院皮膚科（宮川淳子）および SRL 社（鈴木康弘）が担当したことを付記する。

文 献

- 1) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣 真: 小児科臨床, **38**, 2545 (1985)
- 2) 宮川加奈太, 平井義雄, 宮川淳子, 杉山朝美, 小松 平, 菅 千束, 池澤善郎, 中嶋 弘: アレルギー, **37**, 1101 (1988)
- 3) 池澤善郎, 菅 千束, 宮川淳子, 宮川加奈太: 第 6 回免疫薬物療法研究記録会, **99** (1989), メディカルトリビューン (東京)
- 4) 中村 良: 化学と生物, **25**, 739 (1987)
- 5) 竹内俊治, 松田 幹, 中村 良, 田中國介: 日本農芸化学会 1991 年度大会講演要旨集, 547 (1991)
- 6) Ceska, M., Eriksson, R. and Varga, J.M.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **49**, 1 (1972)
- 7) 農林水産省食糧研究所: 食糧, **4**, 29 (1961)
- 8) 新井映子, 青山かえで, 渡辺道子: 日本農芸化学会 1992 年度大会講演要旨集, 268 (1992)
- 9) 青山かえで, 新井映子, 渡辺道子: 日本農芸化学会 1992 年度大会講演要旨集, 269 (1992)
- 10) Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirao, T., Yoshizawa, T. and Arai, S.: *J. Food Sci.*, **55**, 781 (1990)
- 11) Watanabe, M., Yoshizawa, T., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Ake, K., Yanagisawa, T. and Arai, S.: *J. Food Sci.*, **55**, 1105 (1990)
- 12) 渡辺道子, 吉澤貴史, 柳沢哲也, 荒井総一: 栄養誌, **44**, 51 (1991)
- 13) Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 14) 池澤善郎, 池部敏市, 小倉英郎, 小田嶋博, 黒板文武, 佐瀬くらら, 杉内政巳, 杉山朝美, 勝呂宏, 鈴木慎一郎, 藤沢重樹, 北条 徹, 松井猛彦, 松田三千雄, 山本 淳, 四本秀昭: アレルギー, **40**, 633 (1991)

(1992 年 8 月 31 日受理)