コメ貯蔵時の害虫防除処理および 貯穀害虫の摂食がアレルゲン タンパク質に及ぼす影響

大羽美香, 宮ノ下明大, 森山達哉*,
川本伸一, 橘田和美[§]

独立行政法人農業・食品産業技術研究機構食品総合研究所
* 近畿大学農学部応用生命化学科

Effects of Insect Control Treatments and
Damage Caused by Stored-product Insects
on Rice Allergenic Proteins

Mika Ohba, Akihiro Miyano-shita, Tatsuya Moriyama*,
Shinichi Kawamoto and Kazumi Kitta[§]

National Food Research Institute (NFRI), National
Agriculture and Food Research Organization (NARO),
2-1-12 Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

* School of Agriculture, Kinki University,
3327-204 Naka-machi, Nara 631-8505

The number of food allergy sufferers has been increasing and foods containing allergenic proteins have caused concern for many of the people especially in developed countries. Although rice, a staple food for Japanese people, rarely induces severe allergic symptoms such as anaphylactic shock, it has long been known to be a potential cause of atopic dermatitis. We investigated the effects of high-pressure carbon dioxide treatment, an alternative to methyl bromide fumigation for insect pest control, as well as both methyl bromide and phosphine fumigation, on rice allergenic proteins. In addition, brown rice samples were treated with the larvae of the stored-product insect *Plodia interpunctella* to determine the effects of insect damage on these proteins. We found that neither these insect control treatments nor damage caused by stored-product insect have any effect on allergenic proteins.

(Received Nov. 21, 2008 ; Accepted Jan. 8, 2009)

Keywords : rice allergenic protein, high-pressure carbon dioxide treatment, fumigation, stored-product insect, *Plodia interpunctella*

キーワード : コメアレルゲン, 高圧二酸化炭素処理, くん蒸処理, 貯穀害虫, ノシメダラメイガ

近年, 生活環境の改善に伴い, 食生活の多様化が進み, 種々の食物に対するアレルギー患者数は増加傾向にあり¹⁾, 社会的に大きな問題となっている. 日本人の主食であるコメに対するアレルギーも報告されている²⁾. コムギやソバ

にみられるようなアナフィラキシーショック等の重篤な症状を示すことは非常にまれであるが, アトピー性皮膚炎の原因食物の一つとして考えられている³⁾. このようななかコメの主要アレルゲンの単離・精製・同定等の研究⁴⁾や高圧処理, 酵素処理およびアルカリ処理等による低アレルゲンコメの開発等も行われている⁵⁾. しかし, コメアレルギーの発症メカニズムは未解明な部分が多く, アレルゲンタンパク質における構造的な規則性といったものは明確にされていない. また, 農作物の貯蔵時に施される殺虫処理が, これらアレルゲンタンパク質の構造や含有量にどのような影響を与えるかは明らかとなっていない. また, 玄米貯蔵中に発生する貯穀害虫ノシメダラメイガ (*Plodia interpunctella*) によって摂食された玄米のコメアレルゲンタンパク質への影響も不明である.

貯蔵食品の害虫防除は主に殺虫力の強さから臭化メチルくん蒸が行われてきたが, オゾン層破壊をもたらす可能性が指摘され, 日本では現在, 生産中止となり例外的な使用が一部認められているのみである⁶⁾. 代替技術の一つとして化学的防除法のリン化水素 (PH₃) くん蒸が使用されているが, 害虫のリン化水素に対する抵抗性の獲得が問題⁷⁾⁸⁾となっている. 物理的防除法として開発された高圧二酸化炭素殺虫法⁹⁾は, 殺虫効果のある二酸化炭素を高圧力で昆虫の体液中に溶解し殺虫する方法で, 高圧二酸化炭素処理後, 急激に減圧することにより害虫体内に溶解していた二酸化炭素を一気に気化させ, 害虫を体内から破壊する効果がある. この手法は, 短時間で処理ができる, くん蒸と比較して安全性が高い, および環境への負荷が少ない等の特徴を有する害虫防除法である. 加えて, 2007年7月に, クリの害虫であるクリシギゾウムシ殺虫を目的としたくん蒸剤として農薬登録もなされている¹⁰⁾.

高圧二酸化炭素処理については, 玄米の発芽率および食味に及ぼす影響についての報告がなされている¹¹⁾. しかしながら, これらくん蒸処理の穀物自体の総合的なアレルゲン性や内在するアレルゲンタンパク質への影響評価に関する報告はない.

そこで本研究において, コメの主要アレルゲンとして報告されている α -アミラーゼ/トリプシンインヒビターファミリーに属する RAG2¹²⁾ に対する抗体によって認識される 14-16kDa タンパク質¹³⁾, および 33kDa (Glyoxalase I)¹⁴⁾ タンパク質を指標として, 貯穀害虫防除処理, および貯穀害虫の摂食がコメアレルゲンタンパク質に及ぼす影響について検討した. 害虫防除処理については, 臭化メチルくん蒸の代替法として開発された高圧二酸化炭素処理, 臭化メチル, およびリン化水素によるくん蒸処理を行った.

1. 実験方法

(1) 実験材料およびタンパク質の抽出

タンパク質の抽出の材料は平成 18 年茨城県産コシヒカリ (玄米) を供試とした. 無処理, または各処理を施した

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

* 〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

[§] 連絡先 (Corresponding author), kaz@affrc.go.jp

玄米をそれぞれ分析粉碎器 R-8 (NRK 社) にて粉碎した。タンパク質の抽出は塩可溶性タンパク質を標的とした。塩可溶性タンパク質は粉碎した玄米の 100 mg に抽出バッファー (0.5 mmol/L NaCl, 33 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 10 ml 当りにプロテアーゼインヒビター, コンプリートミニ (ROCHE 社) を 1 粒添加) を加え, Lysing Matrix D (Q-BIO 社) を使用し, FastPrep Instrument (Q-BIO 社) にて抽出した。抽出液のタンパク質定量は, プロテインアッセイ (Bio-Rad 社) を用いて行った。

(2) 各種害虫防除処理

高圧処理は, 玄米 400 g を食品総合研究所で試作した高圧二酸化炭素処理装置 (日東高圧製) にて圧力 30 kg/cm² に 30 分間置いた後, 瞬時に減圧した。処理後玄米の一部は, 直ちに粉碎し, タンパク質の抽出を行った。残りは 50 g ずつ茶封筒に小分けして 16°C (湿度制御せず), 常温 (湿度制御せず) および中型高温高湿器 PR-2KP (エスベック社) にて 45°C 80% RH で 4 週間貯蔵した後, 粉碎し, タンパク質の抽出を行った。

くん蒸処理は, 植物防疫法¹⁵⁾ に基づく輸入検疫措置として輸入穀類等検疫要綱¹⁶⁾ で定められた消毒基準で行った。臭化メチルのくん蒸は, 内容積 29.5 L のアクリル製くん蒸箱に玄米を収容し, 薬量 12 mg/L, 収容比 0.1 kg/L, くん蒸温度 15°C, くん蒸時間 48 hr 時間の条件にて実施した。またリン化水素については, 臭化メチルと同様のくん蒸箱を用い, 薬量 0.5 mg/L, 収容比 0.1 kg/L, くん蒸温度 15°C, くん蒸日数 6 日間の条件にて実施した。臭化メチルおよびリン化水素でくん蒸処理した玄米の一部は常温 (湿度制御せず) で 4 週間貯蔵した後粉碎し, コメタンパク質の抽出を行った。また, 対照の無処理試料も同じ貯蔵試験を行った。

(3) 玄米への貯蔵害虫投入実験

食品への異物混入問題およびコメ貯蔵害虫として頻度が高く, 玄米の胚芽部と糠層を好む¹⁷⁾ ノシメダラメイガの幼虫を選定した。10 g の玄米に対して 5 頭のノシメダラメイガの中齢幼虫を投入し, 30°C で 2 週間加害させた後, 虫を除去した玄米, 虫を除去しなかった玄米, および虫のみを粉碎し, 前述の方法でタンパク質の抽出を行った。

(4) SDS-PAGE およびウェスタン解析

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は, 2.8 mg のタンパク質を供し, Laemmli の方法¹⁸⁾ に従って実施した。15% ゲル (Bio-Rad 社) を用いて 20 mA の定電流で 80 分間泳動した。泳動後のタンパク質染色には, Coomassie G-250 stain (CBB) (Bio-Rad 社) を用いた。ウェスタン解析は, 転写膜に Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 膜を用い, ミニゲル (6 cm×8.5 cm) 1 枚あたり 50 mA の定電流で 60 分間行った。5% スキムミルクを含むリン酸緩衝液 (PBS, 0.1% Tween-20) (T-PBS) を用いてブロッキングした後, 1 次抗体として, ウサギポリクローナル抗体である抗 RAG2 抗体および抗 Glyoxalase I 抗

体¹⁹⁾ を用いて反応を行った。また, 患者血清としてコメに対し RAST 陽性の市販血清を用いた。2 次抗体には, Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Bio-Rad 社), および抗ヒト IgE 抗体 (KPL 社) を用いた。検出は, ECL Plus (GE ヘルスケア社) を用いた化学蛍光法により行い, Typhoon 9400 (GE ヘルスケア社) を用いて解析した。デンスitomーターは, Quantity One (Bio-Rad 社) を用いた。なお, SDS-PAGE およびウェスタン解析は複数回反復試験を行い, 典型的な例を示す。

2. 実験結果および考察

(1) 高圧二酸化炭素処理がコメアレルゲンタンパク質に及ぼす影響の検討

高圧二酸化炭素処理直後の試料, および 16°C で 4 週間, 常温で 4 週間または 45°C 80% RH で 4 週間貯蔵した試料について, 無処理の対照試料とともに SDS-PAGE を行い, CBB 染色, および抗 Glyoxalase I 抗体, 抗 RAG2 抗体, および患者血清を用いたウェスタン解析の結果を図 1 に示す。

何れの結果においても, 無処理, および高圧二酸化処理間に差異は見られなかった。しかし, 4 週間貯蔵後については, 異なる条件 (温度および湿度) の間において多少の変化が認められた。SDS-PAGE 後の CBB 染色では, 45°C, 湿度 80% RH において, 他の貯蔵条件と比較すると 55kDa 付近のタンパク質バンドが無処理, 処理ともに減少した。また, 図 1 および図 2 に示したとおり, 抗 Glyoxalase I 抗体を用いたウェスタン解析においても, 45°C, 湿度 80% RH において, 他の貯蔵条件と比較すると 33kDa のターゲットタンパク質の反応シグナルが弱くなった。この原因については今後検討する必要がある。

(2) 各害虫防除処理がコメアレルゲンタンパク質に及ぼす影響

無処理の試料を常温で 4 週間貯蔵, 高圧二酸化炭素処理を行った試料, 臭化メチルおよびリン化水素によるくん蒸の処理を行った試料を SDS-PAGE に供し, CBB 染色, および抗 Glyoxalase I 抗体, 抗 RAG2 抗体, および患者血清を用いたウェスタン解析の結果を図 3 に示す。

各処理の結果において, 無処理試料との間に差異は見られず, 少なくとも今回実施した処理条件では, 高圧二酸化炭素処理, 臭化メチル, およびリン化水素くん蒸がアレルゲンタンパク質に影響を及ぼすことは無いものと考えられる。

(3) 貯蔵害虫の摂食がコメアレルゲンタンパク質に及ぼす影響

玄米へノシメダラメイガの幼虫を投入し摂食させた試料, および無処理の試料について SDS-PAGE を行い, CBB 染色した結果, および抗 Glyoxalase I 抗体, 抗 RAG2 抗体, および患者血清を用いたウェスタン解析の結果を図 4 に示す。

図 1 高圧二酸化炭素処理がアレルゲンタンパク質に及ぼす影響

A ; 全タンパク質染色, B ; ウェスタン解析

① CBB 染色, ② 抗 Glyoxalase I 抗体, ③ 抗 RAG2 抗体, ④ 患者血清, cont. ; コシヒカリ (無処理), CO₂ ; 高圧二酸化炭素処理 (3 MPa, 30 min), r.t. ; 常温, 4 w ; 4 週間貯蔵後

図 2 図 1 の Glyoxalase I をデンストメーターにより測定した結果

cont. ; コシヒカリ (無処理), CO₂ ; 高圧二酸化炭素処理 (3 MPa, 30 min), r.t. ; 常温, 4 w ; 4 週間貯蔵後

図 3 各害虫防除処理がアレルゲンタンパク質に及ぼす影響

A ; 全タンパク質染色, B ; ウェスタン解析

① CBB 染色, ② 抗 Glyoxalase I 抗体, ③ 抗 RAG2 抗体, ④ 患者血清, cont. ; コシヒカリ (無処理), CO₂ ; 高圧二酸化炭素処理, Br ; 臭化メチルくん蒸, PH₃ ; リン化水素くん蒸, r.t. ; 常温, 4 w ; 4 週間貯蔵後

図 4 貯蔵害虫がアレルゲンタンパク質に及ぼす影響

A ; 全タンパク質染色, B ; ウェスタン解析

① CBB 染色, ② 抗 Glyoxalase I 抗体, ③ 抗 RAG2 抗体, ④ 患者血清, 1 ; コシヒカリ (無処理), 2 ; 摂食後 (幼虫除去後に抽出), 3 ; 摂食後 (幼虫+玄米で抽出), 4 ; ノシメダラメイガの幼虫

無処理, 摂食後の玄米より幼虫除去してタンパク質を抽出したもの, および摂食後の玄米から幼虫を取り除かずタンパク質を抽出したものを比較したが差異は見られなかった. 抗 Glyoxalase I 抗体にて虫のみに対しても 30kDa 付近で反応性のあるバンドが認められた. コメの 33 kDa タンパク質はヒト, 植物, 酵母, および細菌等, 様々な生物の Glyoxalase I との相同性が確認されていることから, ノシメダラメイガにても同様な配列が存在する可能性が示唆され, 交差性をもたらしたと考えられる. また, 虫のみのタンパク質抽出系においてコメアレルギー患者血清に対して顕著に反応することはなかった.

ノシメダラメイガの幼虫, および成虫は多少の誤食にて健康に影響はないとされているが, アレルゲンとして同定されているノシメダラメイガのアルギニンキナーゼはダニアレルゲンと交差性があるとの報告²⁰⁾もなされており, ダニアレルギー患者の場合にはノシメダラメイガの幼虫の誤食に注意喚起が必要であると考えられる.

以上のように臭化メチル代替くん蒸処理の高圧二酸化炭素処理, およびリン化水素処理は, 臭化メチル同様, 処理後にいくつかの条件で保管しても, 調べたコメアレルゲンタンパク質への影響は殆どないことを初めて明らかにした. さらに害虫摂食によるコメアレルゲンタンパク質の影響も認められないことが明らかとなった.

3. 要 約

食物アレルギー患者数は増加傾向にあり, 特に先進国の消費者にとって大きな問題となっている. 日本人の主食であるコメに対するアレルギーも報告されている. アナフィラキシーショック等の症状を示すことは非常にまれであるが, アトピー性皮膚炎の原因食物の一つとして考えられている. 貯蔵害虫防除を目的とした臭化メチル代替殺虫技術として開発された高圧二酸化炭素処理を玄米に対し施し, コメのアレルゲンタンパク質にどのような影響を及ぼすかについて検討した. また, 従来使用されてきた, 臭化メチ

ルおよびリン化水素によるくん蒸処理も行った. さらに, 貯蔵害虫であるノシメダラメイガ (*Plodia interpunctella*) の幼虫を玄米に投入し, 摂食後のコメアレルゲンタンパク質への影響も検討した. その結果, これらの害虫防除処理, および貯蔵害虫の摂食によるアレルゲンタンパク質への影響は認められなかった.

本研究は, 農林水産技術会議委託研究「遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究」の一環として行われた. また, くん蒸処理をしていただいた農林水産省横浜植物防疫所に感謝致します.

文 献

- 1) 川田康介, 宇理須厚雄, 小児における食物アレルギーの現況と課題, ジャパンフードサイエンス, **46**, 22-25 (2007).
- 2) 近藤康人, 主なアレルゲン含有食物とその対策—米・小麦・そば—, 小児科臨床, **53**, 655-659 (2000).
- 3) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 稲本 真, 駒田英勝, 山田政功, 鳥居新平, アトピー性皮膚炎における食餌性アレルゲンの検討—とくに穀物アレルゲンについて—, 小児科臨床, **38**, 2545-2552 (1985).
- 4) Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R. and Torii, S., Purification and properties of an allergenic in rice grain. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1465-1470 (1998).
- 5) 池澤善郎, 椿 和文, 大砂博之, 嶋田禎祐, 茂木和之, 杉山宏, 勝俣和子, 安西弘行, 天野三郎, アレルゲン低減化米 (AFT-R1) の有用性と塩不溶性米アレルゲン分子の解析, アレルギー, **48**, 40-49 (1999).
- 6) Molina, M.J. and Rowland, F.S., Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, **249**, 810-812 (1979).
- 7) 中北 宏, 貯蔵害虫くん蒸剤ホスフィンの作用機構に関する研究, 日農薬誌, **12**, 299-309 (1987).
- 8) 中北 宏, 貯蔵食品害虫の特徴と防除, 食糧—その科学とその技術—, **32**, 25-55 (1994).
- 9) 宮ノ下明大, 今村太郎, 高圧二酸化炭素を用いた貯蔵食品害虫の殺菌技術, 食糧—その科学とその技術—, **44**, 59-72 (2006).
- 10) 宮ノ下明大, 今村太郎, 農薬登録された高圧炭酸ガスを用

- いたクリキゾウムシ殺虫技術, 食品工業, **51**, 46-49 (2008).
- 11) 高橋敬一, 宗田奈保子, 内藤成弘, 池長裕史, 中北 宏, 岡留博司, 豊島英親, 大坪研一, 玄米の高圧二酸化炭素処理が発芽率および食味に及ぼす影響, 食品総合研究所研究報告, **65**, 33-37 (2001).
- 12) Adachi, T., Izumi, H., Yamada, T., Tanaka, K., Takeuchi, S., Nakamura, R. and Matsuda, T., Gene structure and expression of rice seed allergenic proteins belonging to the α -amylase/trypsin inhibitor family. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 239-248 (1993).
- 13) Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M. and Nakamura, R., Immunochemical studies on rice allergenic proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 509-513 (1991).
- 14) Usui, Y., Nakase, M., Hotta, H., Urisu, A., Aoki, N., Kitajima, K. and Matsuda, T., A 33-kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. *Japonica*) cDNA cloning, expression, and identification as a novel glyoxalase I. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11376-11381 (2001).
- 15) 農林水産省 法律第 151 号 (昭和 25 年 5 月 4 日).
- 16) 農林水産省 農政局長通達 (45 農政第 2628 号 昭和 46 年 2 月 6 日).
- 17) 穀物の収穫後処理技術協力高度化研究会, 「米のポスト・ハーベスト技術」, (エーシーイー コーポレーション(株), 東京) p. 269 (1995).
- 18) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1979).
- 19) 大羽美香, 海老原光湖, 森山達哉, 橘田和美, 川本伸一, コメアレルゲン抗体の作製と評価, 日本農芸化学会 2007 年度大会講演要旨集, p. 289, 東京 (2007).
- 20) Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W.R., Schöller, M., Prozell, S., Wiedermann, G., Valent, P., Valenta, R. and Duchêne, M., Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J. Immunol.*, **167**, 5470-5477 (2001).
- (平成 20 年 11 月 21 日受付, 平成 21 年 1 月 8 日受理)
-