

そばの成熟過程および調理時の そばアレルギーに関する研究

「そば」アレルギーに関する調査・研究Ⅱ

信州大学農学部
応用生命科学科准教授(工学博士)

中村 浩蔵

1 目的

“そば”は、そばアレルギーの原因食材であり、アレルギー物質を含む「特定原材料等」として表示が義務付けられている¹⁾。そばアレルギーは、症例は少ないもののごく微量のそば混入でも重篤な症状（アナフィラキシー症状）を引き起こすことがあり、そばを含む食品を製造する場合には特に注意して正確な表示をする必要がある。そばアレルギーの原因物質は、そば粉に多く含まれるそばアレルゲンと呼ばれるタンパク質である。つまり、例えばそば粉を扱わなかったとしても、そばアレルゲンタンパク質が混入していればそばアレルギーが引き起こされてしまう。そばアレルゲンタンパク質を、目で確認することは不可能であり、意図せず食品に混入する恐れがある。

そば主要アレルゲンタンパク質は、Fag e 1、Fag e 2、Fag e 3の3種類であることが知られている。Fag e 1は13Sグロブリン種子貯蔵タンパク質の β -サブユニットである22 kDaのタンパク質²⁾、Fag e 2は2Sアルブミンファミリーに属する16 kDaの種子貯蔵タンパク質³⁾、Fag e 3は分子量19 kDaの種子貯蔵タンパク質である⁴⁾。この中で、酵素分解されにくいFag e 2がそばによるアナフィラキシー症状の原因アレルゲンタンパク質であることが示唆されている³⁾。

そばは、播種から約20～40日で開花し、約65～90日ほどで種子が収穫される。花粉が虫や風によって運搬されることで受粉する他花受粉作物であるため、そばの花粉は広範囲に飛散する。そして開花時期が長いため、収穫時には花、葉、未成熟種子が混入する。もしも、花粉や花、葉、未成熟種子、完熟種子にもそばアレルゲンタンパク質が多く含まれていれば、そばアレルギーが引き起こされる恐れがある。また、そばアレルゲンタンパク質は水溶性であり、そばのゆで汁に溶け出す。そのため、そばのゆで汁で他の食材を調理した場

合、そばアレルギータンパク質が付着してしまう。そこで本研究では、そばの成熟過程（^{やく}薬（花粉）、花弁、葉、未成熟種子、完熟種子）およびそば調理に伴うそばアレルギータンパク質の挙動を、国のガイドライン⁵⁾に準拠したそば可溶性タンパク質測定法によって調査した。

2 試験方法

試験材料

【^{やく}薬（花粉）、花弁、葉、未成熟種子、完熟種子】

材 料：(株) おびなたより提供

品 種：戸隠在来種

栽培地：長野市戸隠豊岡1404

平成25年7月21日 播種

平成25年8月29日 花と葉採取（播種から40日）

平成25年9月12日 未成熟種子採取（播種から54日）

平成25年9月26日 完熟種子採取（播種から68日）

花から分離した薬、花弁、葉、未成熟種子、完熟種子を、それぞれ個別に凍結乾燥した。薬は、凍結乾燥物をそのまま試験サンプルとし、薬以外は、ミルミキサーを用いて約400メッシュに粉砕し試験サンプルとした。

【調理そば、うどん】

材料：生そば（十割そば、二八そば、同割そば、国産そば粉および国産小麦粉使用、全国麺類生活衛生同業組合連合会提供）、生うどん（国産小麦使用、購入市販品）、冷凍調理そば（同割そば、信州大学生協農学部店提供）、冷凍調理うどん（信州大学生協農学部店提供）

調理方法：各そばサンプル1人前（生同割そば（125g）、生二八そば（145g）、生十割そば（160g）、冷凍調理そば（210g）を、それぞれうどんサンプル1人前（生うどん（170g）、冷凍調理うどん（220g））と共に業務用ゆで麺機の沸騰水中（28L）に同時投入し、所定の調理時間の後、

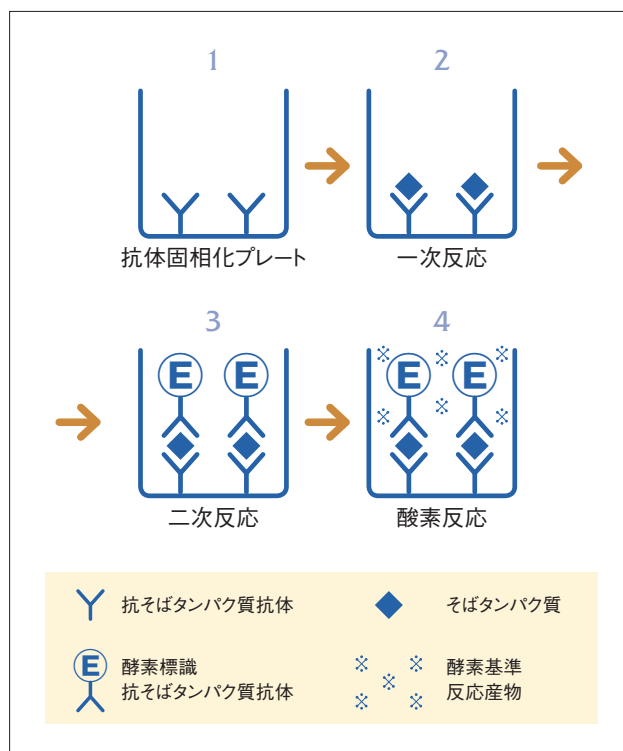
各サンプルを引上げた。そば（調理前、調理後）、うどん（調理前、調理後）、ゆで汁を、それぞれ凍結乾燥し、ミルミキサーで約400メッシュに粉砕し試験サンプルとした。調理時間は表2、3に示した。

そばアレルギータンパク質測定

【測定キット】 モリナガFASPEKシリーズソバ測定キット（以下、測定キット）を用いたELISA法（Enzyme-linked immunosorbent assay：固相酵素免疫検定法）でそば可溶性タンパク質を定量した。本測定キットは、厚生労働省通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」に示されたガイドラインに準拠している⁵⁾。

【測定原理】 まず、プレートに固定したそばタンパク質ポリクローナル抗体（複数種類のそば可溶性タンパク質に結合する抗体）に、測定試料中のそば可溶性タンパク質を結合させる（一次反応）。次に、結合したそば可溶性タンパク質に酵素を結

図1 そば可溶性タンパク質測定原理(モリナガFASPEKシリーズソバ測定キット取扱説明書より転載)



合せたそばタンパク質ポリクローナル抗体を結合させる（二次反応）。最後に、酵素と反応すると発色する発色酵素基質を加えた後に吸光度を測定し、同時に測定した標準溶液の吸光度と比較することで試料中のそば可溶性タンパク質濃度を求める（酵素反応）。試料中のそば可溶性タンパク質が多ければ、多くの酵素が結合するため強く発色する。

【測定手順】

- ①測定キット付属の抽出用A液、抽出用B液、精製水を1：1：1：17の割合で混合し、検体抽出液を作製した。
- ②試験サンプル（1.0 g）に検体抽出液（19 mL）を加え泡立たないようにボルテックスした後、振とう機で15時間そば可溶性タンパク質を抽出（100往復ストローク／分、室温、振とう幅約3 cm）し、抽出液のpHがpH6.0～8.0であることをpH試験紙で確認した。
- ③抽出液を遠心分離（23℃、3000 g、20 min）し、水層（以下、上清）を測定試料とした。
- ④（一次反応）適した濃度に希釈した測定試料（100 μL）を、そばタンパク質ポリクローナル抗体を固定したウェル（測定用のくぼみ）に添加し、25℃で1時間静置した。
- ⑤（二次反応）ウェル内の溶液を完全に除去し、調製済み洗浄液（300 μL）での洗浄を6回繰り返した後、酵素標識抗体溶液（100 μL）をウェルに添加し25℃で30分静置した。
- ⑥（酵素反応）ウェル内の溶液を完全に除去し、調製済み洗浄液（300 μL）での洗浄を6回繰り返した後、酵素基質溶液（100 μL）をウェルに添加し遮光して25℃で10分静置後、反応停止液（100 μL）をウェルに添加し酵素反応を停止させた。
- ⑦酵素反応停止後30分以内に、ウェルの吸光度（415 nm）を測定した。
- ⑧同様の測定から求めた標準溶液の標準曲線から、試料中のそば可溶性タンパク質濃度を求めた。

3 結果

本試験は、試料中に含まれるそば（種子）の可溶性タンパク質を測定するものである。つまり、そばアレルゲンタンパク質以外のタンパク質も測定されるため、そばアレルゲンタンパク質だけを測定するよりも、より高い安全性が確保されると考えられる。アレルギー物質を含む食品の検査方法⁵⁾では、食品1 gあたりのそば由来のタンパク質含量が10 μg以上の試料について“微量を超えるそばが混入している”と判断され、食品中に含まれる特定原材料等の総タンパク量が、数μg/gに満たない場合は表示の必要性はないとされている⁶⁾。本研究でも、これらの指標に従って、特定原材料であるそば混入の危険性について判断した。

そばの成熟過程試料（葯（花粉）、花弁、葉、未成熟種子、完熟種子）中のそば可溶性タンパク質含量

測定結果を表1に平均±標準誤差（以下、Mean±SE）で示した。3回繰り返し測定での相対標準偏差（relative standard deviation、以下RSD）は、葉を除いて7.8%以下と良好な精度を示した。葉ではRSDが10%を超えたが、そば可溶性タンバ

表1 そばの成熟過程試料中のそば可溶性タンパク質含量(n=3)

試料	Mean ± SE (μg/g)	RSD (%)
葯（花粉）	0.16 ± 0.007	7.8
花弁	0.24 ± 0.007	5.0
葉	0.021 ± 0.001	12.6
未成熟種子	2.3 × 10 ⁴ ± 310	2.4
完熟種子	8.4 × 10 ⁴ ± 613	1.3

ク質含量は極めて少なく、結果判定に問題はないと考えられる。

そばの成熟過程試料中のそば可溶性タンパク質含量測定の結果、葯（花粉）、花弁、葉のそば可溶性タンパク質含量は極めて少ないことが判った。すなわち、特に大量に接する場合や摂取する場合を除いて、これらの部位に含まれる既知のそばアレルギータンパク質がそばアレルギーを引き起こす心配はないと考えられた。そば可溶性タンパク質は、完熟種子中では開花から2週間程度の未成熟種子の3.7倍に増加しており、そば可溶性タンパク質は種子が成熟するに従い増加した。しかし、未成熟種子であっても多量のそば可溶性タンパク質を含んでおり、そばアレルギーへの十分な注意が必要である。

調理そば、うどん、ゆで汁中のそば可溶性タンパク質含量

そば試料（調理前後）およびそばゆで汁中のそば可溶性タンパク質含量測定結果を表2に示した。3回繰り返し測定でのRSDは10.9%以下と良好な精度を示した。

未調理の生そば試料は、そば粉の配合割合に比例してそば可溶性タンパク質含量が変化した。調理後は、水分量増加のため重量がそれぞれ約1.7

倍（同割）、約1.4倍（二八）、約1.2倍（十割）に増加し、単位重量当たりのそば可溶性タンパク質含量が低下した。冷凍調理そばでは、調理による重量変化は見られなかったが、そば可溶性タンパク質含量は低下した。この調理過程でそば試料からゆで汁に溶け出したそば可溶性タンパク質含量は10.3～32.2 μg/mLであり、たとえ1人前の調理であっても、そばアレルギーを引き起こすそばタンパク質がゆで汁に溶け出すことがわかった。その量はそばの配合割合と調理時間に影響を受け、同割そばは、そばの配合割合は低い調理時間が長い場合最も多くのそば可溶性タンパク質がゆで汁に溶け出した。ゆで汁（28 L）中のそば可溶性タンパク質量は、同割そばで0.90 g、二八そばで0.52 g、十割そばで0.66 g、冷凍調理そばで0.29 gと見積もられ、それぞれの原料そばの、0.72%、0.36%、0.41%、0.14%が溶出した。

そば試料と共に調理したうどん試料中および単独で調理したうどん試料中のそば可溶性タンパク質含量測定結果を表3に示した。3回繰り返し測定でのRSDは、未調理の生うどん、冷凍調理そばと共に調理した冷凍調理うどんを除いて6.1%以下と良好な精度を示した。未調理生うどん、冷凍調理そばと共に調理した冷凍調理うどんではRSDが大きいですが、いずれの試料中でもそば可溶性

表2 そば試料、そばゆで汁中のそば可溶性タンパク質含量 (n = 3)

試料	調理前 (mg/g)		調理後 (mg/g)		ゆで汁 (μg/mL)		調理時間
	Mean ± SE	RSD (%)	Mean ± SE	RSD (%)	Mean ± SE	RSD (%)	
生そば(同割)	54.4 ± 1.2	3.8	32.8 ± 1.4	7.7	32.2 ± 1.1	5.9	2分
生そば(二八)	76.0 ± 0.7	1.6	50.5 ± 0.2	0.7	18.4 ± 0.2	1.5	1分
生そば(十割)	91.7 ± 0.6	1.2	67.2 ± 1.5	3.8	23.6 ± 0.4	2.7	45秒
冷凍調理そば	88.8 ± 0.9	1.7	60.7 ± 2.8	7.9	10.3 ± 0.6	10.9	40秒

表3 そば試料と共に調理したうどん試料中のそば可溶性タンパク質含量 (n = 3)

試料	調理前 (μg/g)		調理後 (μg/g)		調理時間
	Mean ± SE	RSD (%)	Mean ± SE	RSD (%)	
生うどん	0.24 ± 0.02	18.5	0.63 ± 0.002	0.68	9分
+生そば (同割)	—	—	12.0 ± 0.15	2.1	2分
+生そば (二八)	—	—	11.8 ± 0.08	1.1	1分
+生そば (十割)	—	—	7.9 ± 0.13	2.8	45秒
冷凍調理うどん	0.15 ± 0.004	6.1	N.D.*	N.D.*	50秒
+冷凍調理そば	—	—	0.047 ± 0.008	30.2	40秒

*N.D.: 未検出 (Not Determined)

タンパク質含量は極めて少なく、結果判定に問題はないと考えられた。

本試験で用いた生うどん、冷凍調理うどんには、調理前後共に、そば可溶性タンパク質は殆ど含まれていなかった。生うどんと各そば試料をゆで麺機に同時投入し、一定調理時間後にそば試料を引き上げた後、うどん試料はそのまま所定の調理時間調理した。その結果、全ての調理生うどん試料でそば可溶性タンパク質が検出され、その量は7.9～12.0 μg/gであった。この試験は1人前のそば試料で行ったものであるが、そばアレルギーを引き起こす可能性があるそば可溶性タンパク質量がうどん試料に含まれていた。冷凍調理うどんと冷凍調理そばを調理した場合は、調理時間が短いこともあり、調理したうどん試料からそば可溶性タンパク質はほとんど検出されなかった。しかし、1人前でもそばアレルギーを引き起こすことが出来る量のそばタンパク質がゆで汁に溶け出しており、また、飲食店では一般に1人前だけを調理することは想定されないため、十分な注意が必要である。

4 考察

そばの成熟過程試料のうち、花粉、花弁、葉中には、日常生活で接する量であれば、そばアレルギーを引き起すだけのそば可溶性タンパク質は含まれていないという結果となった。しかし、森山先生がご指摘のように、そばの茎葉には未知のそばアレルゲンタンパク質が含まれている可能性があり、そばアレルギー患者はこれらのそば部位を含む食品への注意が必要と考えられる。また、消費者庁が食品へのそばの混入を試験する場合には、検査特性の異なる2種の検査でスクリーニングを行う⁵⁾。本試験で用いたELISA法の他には、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法による定性試験(確認検査)が採用され、2種の試験のうちどちらかで陽性であれば、そば混入と判定される⁵⁾。PCR法は、ELISA法よりも鋭敏に特定のそばアレルゲンタンパク質を検出、定量することが出来るため、例えELISA試験で陰性であってもそばアレ

ルギーの心配がないとは断言できないことを付言しておく。

調理に伴うそばアレルギーによる汚染試験では、例え、飲食店で取り扱われる最少量である1人前のそばと一緒に調理しただけで、そばを含まない他の食材にそば可溶性タンパク質が付着し、そばアレルギーを引き起こされる恐れがあることが明らかとなった。したがって、「1人前のそばくらいならいいだろう」という甘い判断は危険である。本試験で用いた生うどんは、うどん専門店から取り寄せたものであり、そば可溶性タンパク質はほぼ含まれていなかった。しかし、そば(手打ち)を扱う飲食店で調製された手打ちうどん(未調理)のそば可溶性タンパク質含量は、 1.7 ± 0.13 mg/gと、アレルギーを引き起こすには十分なそば可溶性タンパク質が含まれていた。このことは、そば粉を取り扱う飲食店では、相当な注意をしても必然的にアレルギーを引き起こす量のそば可溶性タンパク質が混入する危険性を示唆するものと考えられる。

そばアレルギーは、アレルギーの中で最も症状が重いことが知られており死亡事故も発生している。そのため、そばを使用した飲食物には表示義務が課せられているわけである。一方でそばは、栄養価が高く、様々な食品機能性を有する優れた食品でもある。そばの特定原材料表示は、そば食およびそば文化を否定するものでは決していない。そば食文化を守り発展させるためには、そばを微量でも含む可能性がある食品には、必ずその旨を表示し、未然に事故を防ぐことが重要である。

最後に、本試験の結果は、特定の食品試料に対するものであり、普遍的な結果を示すものではない。そばの栽培地や品種、各飲食店で取り扱うそば試料や調理方法は、それぞれ全て異なるものである。本試験結果は、あくまで参考事例として役立てていただきたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省通知「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令(平成13年厚生労働省令第23号)」(平成13年3月15日付食発第79号)。
- 2) K. Fujino, H. Funatsuki, M. Inada, Y. Shimono and Y. Kikuta (2001) Expression, Cloning, and Immunological Analysis of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seed Storage Proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), pp.1825-1829.
- 3) K. Tanaka, K. Matsumoto, A. Akasaka, T. Nakajima, T. Nagasu, Y. Iikura and H. Saito (2002) Pepsin-Resistant 16-kD Buckwheat Protein is Associated with Immediate Hypersensitivity Reaction in Patients with Buckwheat Allergy, *International Archives of Allergy and Immunology*, 129(1), pp.49-56.
- 4) S. Y. Choi, J. H. Sohn, Y. W. Lee, E. K. Lee, C. S. Hong and J. -W. Park, (2007) Characterization of Buckwheat 19-KD Allergen and Its Application for Diagnosing Clinical Reactivity, *International Archives of Allergy and Immunology*, 144(4), pp.267-274.
- 5) 厚生労働省通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(平成14年11月6日付食発第1106001号)。
- 6) 消費者庁ホームページ「アレルギー物質を含む食品に関する表示 Q & A (http://www.caa.go.jp/foods/qa/allergy01_qa.html)

【参考・引用文献】

- 相原道子編(2013)『Derma. 食物アレルギーマニュアル2013年6月号No.205』全日本病院出版会
- 石綿肇・西宗高弘・吉田勉編著(2011)『食品衛生学…食品の安全性…』学文社
- 海老澤元宏編(2013)『症例を通して学ぶ年代別食物アレルギーのすべて』南山堂
- 宇理須厚雄監修(2011)『食物アレルギーの基礎と対応』みらい
- 宇理須厚雄・近藤直実監修(2011)、日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会作成『食物アレルギー診療ガイドライン2012』協和企画
- 宇理須厚雄総監修(2012)「ぜん息予防のためのよくわかる食物アレルギーの基礎知識・2012年改訂版」独立行政法人環境再生保全機構
- 海老澤元宏監修(2012)『食物アレルギーの栄養指導』医歯薬出版
- 香川芳子監修(2013)『食品成分表2013』女子栄養大学出版部
- 川端輝江編著(2012)『オールカラーしっかり学べる!栄養学』ナツメ社
- 上野川修一編(2003)『食品とからだ—免疫・アレルギーのしくみ—』朝倉書店
- 『公衆衛生2013年10月号』医学書院
- 厚生労働科学研究班(2011)『食物アレルギーの栄養指導の手引き2011』
- 厚生労働科学研究班(2011)『食物アレルギーの診療の手引き2011』
- 厚生労働省(2008)『加工食品のアレルギー表示』
- 独立行政法人国民生活センター(2003)『そばを含有する可能性のある食品のテストと調査—そばアレルギーを持つ人への情報提供を目的に—』
- 独立行政法人国民生活センター(2009)『「外食」で提供された食品に係わる事故—事故に遭ったときの対処方法などについて—』
- 酒井健夫・上野川修一編(2008)『日本の食を科学する』朝倉書店
- 佐藤和人・本間健・小松龍史編『エッセンシャル臨床栄養学』医歯薬出版
- 佐守友仁(2013)『知って安心! 食物アレルギー診療室からのメッセージ』診断と治療社
- 実教出版編集部編(2012)『2013オールガイド食品成分表』実教出版
- 椛島健治編(2013)『実験医学増刊 Vol. 31 No. 17 病態の理解に向かうアレルギー疾患研究—なぜ、アレルギーが起こるのか? 発症・進展の新概念と臨床への展開』羊土社
- 公益財団法人全国生活衛生営業指導センター(2004)『飲食業の苦情対応の手引き』
- 消費者庁(2010)『加工食品製造・販売業のみなさまへ アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック』
- 消費者庁食品表示課(2012)『食品表示に関する行政の動き』
- 永倉俊和(2010)『アレルギーのふしぎ』ソフトバンククリエイティブ
- 中村丁次他編著(2010)『食物アレルギー AtoZ』第一出版
- 日本食品衛生学会編(2009)『食品安全の事典』朝倉書店
- 日本食品免疫学会編(2011)『食品免疫・アレルギーの事典』朝倉書店
- 藤田保健衛生大学小児科免疫アレルギーリウマチ研究会作成(2012)『食物アレルギーひやりはっと事例集2012』
- 眞鍋穰(2011)『そうなんだ! アレルギー—しくみと対処法を知る』新日本出版社
- 山本一彦編(2012)『アレルギー病学(普及版)』朝倉書店
- 渡辺隆文・夫馬直実(2012)『あきらめない! アレルギー治療』NHK出版