

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33939
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K00831
研究課題名(和文)牛乳アレルギーに対するバイクドミルクの有用性

研究課題名(英文)Effect of Baked milk for milk allergy

研究代表者

和泉 秀彦 (IZUMI, HIDEHIKO)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・教授

研究者番号：80351211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：牛乳アレルギー患者は、バイクドミルク(BM)なら症状誘発することなく摂取できることが報告されている。しかし、この理由については十分に解明されていない。そこで、申請者らは、牛乳をグルテンと混合し焼成した際のBM中の s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリンの溶解性および消化性について明らかにすることを目的とした。試料は、SDS-PAGEおよびイムノブロットにより解析した。バイクドミルク中の s1-カゼインおよび β -ラクトグロブリンは、可溶性画分には存在せず、不溶化していた。BM中の s1-カゼインの消化性は、焼成前と比較して低下していた。不溶化した β -ラクトグロブリンは、消化されずに残存していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、バイクドミルク中の主要アレルゲンである s1-カゼインおよび β -ラクトグロブリンの性質は、牛乳中とは異なり不溶化し、消化性も低下していることが明らかとなった。この性質の変化により、患者の牛乳摂取可能量を増加させること、食事のバリエーションを増加させることができると考える。さらに、免疫療法の導入初期に利用することで、患児が直面している微量の誤食によるアナフィラキシーのリスクを軽減できると考える。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that patients with cow's milk allergy can ingest baked milk without adverse reactions, although this has not been characterized sufficiently. Here, we investigated the solubility and digestibility of s1-casein and β -lactoglobulin when milk was mixed with gluten, and then baked. Samples were analyzed using SDS-PAGE and immunoblot. s1-Casein and β -lactoglobulin in the PBS extract from the baked milk with gluten were not detected compared with that in the milk. s1-Casein and β -lactoglobulin were detected as insoluble fractions. The digestibility of s1-casein in BM was decreased compared with that in the non-baked milk. The insolubilized β -lactoglobulin was not digested and thus remained.

研究分野：食品学・食品機能学

キーワード：牛乳アレルギー バイクドミルク

1. 研究開始当初の背景

近年、重症食物アレルギー児の治療及びアナフィラキシー予防として経口免疫療法(Oral Immunotherapy:OIT)が試みられている。しかし、牛乳アレルギーはその中でも最も治療成績が悪い。鶏卵や小麦は固体であるのに対して牛乳が液体であること、鶏卵や小麦は高度に加熱した後に OIT を施行しているのに対して、牛乳は未加熱で摂取していることなどが原因としては考えられるが科学的根拠はない。より安全で有効な治療法を開発するために、牛乳そのものを用いた OIT 以外の方法が模索されているが成功例の報告は少ない。

牛乳アレルギーは、その中心となるカゼインが特定の立体構造を取らないことから、患者の IgE 抗体は主としてその一次構造を認識しており、加熱変性による低アレルギー化は期待しにくいと考えられてきた。しかし Kim ら³⁾は、通常の牛乳摂取が不可能な場合でも小麦と高温で加熱した Baked Milk (BM) であれば摂取が可能であること、BM 摂取を施行できた群では過去の類似症例と比べ早期に耐性を獲得できたと報告している。

この症例の違いは、牛乳アレルギーの存在状態および性質が、牛乳中と BM 中で異なるのではないかという仮説をたて本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

食物アレルギーの治療において OIT が試みられている。しかし、牛乳アレルギーは最も治療効果が悪い。そこで牛乳と小麦を混捏して焼いた BM に着目し、牛乳タンパク質の牛乳中と BM 中での存在状態および性質の違いを明らかにするとともに、それらの消化性の違いを *in vitro* の系において解明する。

3. 研究の方法

BM 中の牛乳タンパク質の存在状態および性質の解析

市販牛乳と薄力粉 (1g:30g ~ 30g:30g) を混ぜ、ホットプレートを用いて 180 で焼いてパンケーキを作製する。作製したパンケーキは凍結乾燥させ、PBS で可溶性タンパク質を、SDS 溶液で不溶性タンパク質を、メルカプとエタノールを含む SDS 溶液 (ME-SDS) で総タンパク質を抽出し、SDS-PAGE でタンパク質組成を、牛乳の主要アレルギーであるカゼインおよび β -ラクトグロブリンについては特異抗体を用いたイムノプロットにより検出した。また、阻害 ELISA 法あるいはサンドイッチ ELISA 法を用いてグルテンに組み込まれた牛乳アレルギーを定量し、存在状態の違う牛乳アレルギーの割合を解析した。

消化性の解析

BM 中と BM の未加熱 (ドウ) 中の牛乳アレルギーのペプシン (30 分) およびパンクレアチン (0 ~ 60 分) に対する消化性を *in vitro* の系で、SDS-PAGE および牛乳アレルギーに対する特異抗体を用いて解析した。

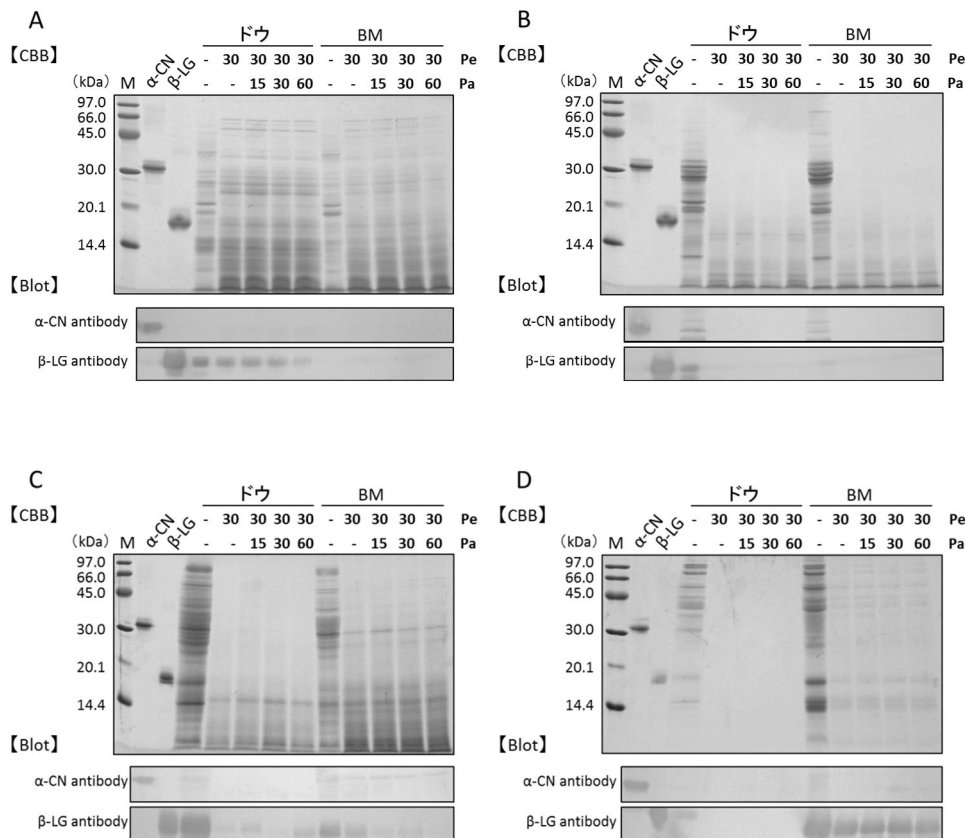
4. 研究成果

牛乳および牛乳と薄力粉を混ぜた未加熱の試料中のカゼインおよび β -ラクトグロブリンは PBS で抽出され、可溶性のタンパク質として存在していた。しかし、これに対して、牛乳と薄力粉を混ぜたのち加熱した試料中では、カゼインおよび β -ラクトグロブリンは PBS では抽出されず、カゼインは SDS 溶液で抽出され、 β -ラクトグロブリンは ME-SDS 溶液で抽出された。

以上の結果より、牛乳中のアレルギーであるカゼインおよび β -ラクトグロブリンは、薄力粉と混ぜて加熱することにより、不溶化することが明らかとなり、特に、 β -ラクトグロブリンは、

グルテンのS-S結合に取り込まれている可能性が示唆された。

消化処理後の試料を遠心分離し、上清と残渣に分け、残渣からタンパク質を抽出し、アレルギーをSDS-PAGEおよび特異抗体を用いたイムノブロットにより解析した。その結果、ドウ中にはカゼイン (CN)は検出されず、BM中のCNは不溶性画分にて検出された。この結果より、BM中のCN消化性が低下したことが示唆された。また、ドウ中の β -ラクトグロブリン (β -Lg)は可溶性画分にて検出され、BM中の β -Lgは不溶性画分にて検出された(下図)。もともと消化されにくい β -Lgは、BM中でも変わらず消化されにくいことが示唆された。



ドウおよびBM中のアレルギーのアレルゲンのペプシン及びパンクレアチンによる消化性

消化処理後の上清(A)、残渣中の塩溶性タンパク質(B)、残渣中の不溶性タンパク質(C)、および残渣中のSS結合を有する不溶性タンパク質(D)

<引用文献>

- 1) 小田奈穂、椋村春江、小林貴江、漢人直之、伊藤浩明、牛乳アレルギーにおける除去解除のための食事指導(第3報) 日本小児アレルギー学会誌、27(5) 701-709 (2013)
- 2) 椋村春江、小田奈穂、小林貴江、漢人直之、和泉秀彦、伊藤浩明、タンパク質換算を用いた小麦アレルギー患者への除去解除指導(第4報) 日本小児アレルギー学会誌、27(5) 710-720 (2013)
- 3) Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson HA, Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J. Allergy Clin Immunol.*, **128**(1), 125-131(2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 内藤宙大, 山田千佳子, 和泉秀彦 | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 牛乳タンパク質の加工に伴う組成変化 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 日本食品科学工学会誌 | 6. 最初と最後の頁 195-200 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/nskkk.66.195 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 内藤宙大, 山田千佳子, 和泉秀彦 | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 牛乳アレルギーのIgEエピトープ | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 名古屋栄養科学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 67-72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Naito, M., Yamada, C., Matsuda, T., and Izumi, H. | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Change in Solubility, Allergenicity, and Digestibility of Cow's Milk Protein in Baked Milk. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Food Sci. Technol. Res. | 6. 最初と最後の頁 129-138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr26.129 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 内藤宙大, 山田千佳子, 和泉秀彦 |
| 2. 発表標題 牛乳経口免疫療法によるカゼイン特異抗体の変動 |
| 3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 内藤宙大、山田千佳子、和泉秀彦 |
| 2. 発表標題 ベイクドミルク中のカゼインの吸収性 |
| 3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |