

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19713

研究課題名（和文）未利用資源を活用した小麦加工品の新規低アレルギー化技術の開発

研究課題名（英文）Development of new hypoallergenic technology for processed wheat products using unutilized resources

研究代表者

鶴永 陽子（Tsurunaga, Yoko）

島根大学・学術研究院人間科学系・教授

研究者番号：60517051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：小麦依存性運動誘発アナフィラキシー（WDEIA）の原因物質はグルテン画分（5-グリアジン）である。一方、植物中に普遍的に含有されている可溶性タンニンは、タンパク質と強く結合してタンパク質の3次元構造や重合を阻害する特性を有する。そこで本研究では、タンニンを利用したアレルギーの変性方法について検討した。小麦の一部をクリ渋皮やカキ幼果などのタンニン素材と置換したクッキーとパンを製造し、2種のELISA法、ならびにウェスタンブロットング分析にて低アレルギー化を評価した。その結果、タンニン素材の添加によりクッキーとパンのアレルギーが低減し、タンニン素材の置換量が多いほどその効果が顕著に表れた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小麦は学童期以降の食物アレルギーにおいて頻度の高い原因食品の一つで、多くが重篤なWDEIAとなる。小麦アレルギー患者は小麦摂取制限や食後の運動制限を強いられることになり、QOLが著しく低下する。これまで、小麦の低アレルギー化については、タンパク質分解酵素や加熱処理の利用によるエピトープ（アレルギーの性質を示す部分で、抗体が特異的に結合する抗原のアミノ酸配列）の分解、育種によるアレルギー欠乏系統の育成等が試みられてきた。本研究では、小麦加工品の製造途中にタンニン素材を添加する手法を試みて、その可能性を見出すことができた。課題も見つかったため、今後はそれらの課題を解決できる研究を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：The causative agent of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (WDEIA) is the gluten fraction (5-gliadin). On the other hand, soluble tannins, which are universally present in plants, have the property of strongly binding to proteins and inhibiting their three-dimensional structure and polymerization. In this study, we investigated a method of denaturing allergenic proteins using tannins. Cookies and breads were made by replacing a part of wheat with tannins such as chestnut inner shell and young persimmon fruit, and their hypoallergenicity was evaluated by two types of ELISA and Western blotting analysis. The results showed that the addition of tannin material reduced allergens in cookies and breads, and the effect was more pronounced the greater the amount of tannin material substituted.

研究分野：食品加工、機能性

キーワード：食物アレルギー 小麦依存性運動誘発アナフィラキシー 低アレルギー化 小麦加工品 パン クッキー

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小麦は、食物アレルギーの最も一般的な原因の1つである。小麦に対する食物アレルギーは、学童および成人において小麦依存性運動誘発アナフィラキシー(WDEIA)として現れることがある。WDEIAの特徴は、小麦の摂取だけでは反応せず、摂取後の運動やアスピリンの服用などの二次的要因が加わることによりアレルギー症状を示す。WDEIAを引き起こす主要なアレルゲンはグルテンタンパク質である $\omega$ -5-グリアジンであることが明らかにされている。しかし、このWDEIAに対する標準化された予防策は現在確立されていない。また、小麦はその加工性の高さから、さまざまな食品に使われており、日常の食事で小麦を避けることは患者への負担も大きい。一方、タンニン、植物由来で天然の反応性の高いポリフェノールで、リグニンに次いで2番目に豊富な天然芳香族ポリマーの供給源であることが知られている。縮合型のタンニンはタンパク質結合能力が著しく高く、タンニン-タンパク質複合体を形成することも多数報告されている。我々は、このタンニン-タンパク質複合体の形成を小麦のアレルゲン低減化に活用することを目指した。

### 2. 研究の目的

植物中の可溶性タンニンは、タンパク質と強く結合してタンパク質の3次元構造や重合を阻害する特性を有するとともに、抗酸化性等の健康機能性が非常に高い。また、我々はこれまでに可溶性タンニンがグルテンネットワークの形成を阻害することを報告している。そこで、本研究では、可溶性タンニンのグルテン形成阻害作用を活用した、これまでの手法とは全く異なる簡便かつ低コストな小麦の低アレルゲン化の方法を検討し、健康機能性ならびに嗜好性の高い小麦加工品の製造技術の開発を目指した。また、我々は、これまでに $\omega$ -5 グリアジンの遺伝子座を欠失した小麦系統1BS-18「ミナミノカオリ」(以下1BS-18M)の育成をしているが、一部の患者では摂取後にアレルギー症状をきたす場合があることを確認している。本研究のタンニン添加の技術を、この低アレルゲン化小麦系統1BS-18Mに応用し、さらなる低アレルゲン化について検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンニン素材

本研究では、タンニンが豊富な材料としてクリ渋皮とカキ幼果を選択した。クリ渋皮は剥離性に優れた品種「ポロタン」(茨城県つくば市)を使用し渋皮のみを恒温オーブンを使用して60℃で12時間乾燥させた。島根県農業技術センター(島根県出雲市)よりカキ品種「西条」の幼果を採取し、ヘタと種子を除去した後、凍結乾燥した。各乾燥サンプルを粉砕し、1.0 mmのふるいに通し、分析まで-25℃で保存した。

#### (2) クッキーの製造と分析用試料調製

対照区(タンニン素材無添加区)のクッキーの材料は、薄力粉200g、無塩バター120g、グラニュー糖60g、卵25g、食塩2gであった。タンニン素材置換クッキーを製造するために、薄力粉の一部をタンニン素材に置換したクッキーを製造した。具体的には、材料の全重量(407g)の3%(12.21g)、5%(20.35g)、および10%(40.7g)の薄力粉をクリ渋皮、またはカキ幼果粉末に置換した。クッキーを調製するため、原料をミキサーで混合した。冷蔵庫で約30分(10℃)冷やした後、100gに分割し、直径2cm、長さ16cmの棒状に成形後、再度ラップに包み冷凍した。冷凍生地を合計30枚程度(厚さ6mm)に切り、スチームコンベクションオーブン(Convection Oven NE-CBS 2700、パナソニック株式会社、大阪、日本)で、170℃で15分間焼成した。一晩放冷した後、粉砕して分析試料とした。

#### (3) パンの製造(タンニン素材の選定)

まず、有望なタンニン素材を特定するため、タンニン含有量が高いクリやカキの各部位を使用してパンを試作した。基本材料は強力粉250g、無塩バター10g、白砂糖17g、スキムミルク6g、塩5g、ドライイースト2.8g、水180gとした。タンニン添加区では、小麦粉重量の5%(12.5g)をタンニン材料で置換し、全自動ベーカリーを使用して焼成した。

#### (4) パンの製造(クリ渋皮の置換量の検討)

次に、最も低アレルゲン化の効果が高かったクリ渋皮を用い、置換量の条件を1、3、5、10%に設定した実験を行った。2回捏ねる中種法を用いた。具体的には、小麦粉120g、ドライイースト6g、砂糖20g、水204gをニーダーに入れ、5分間捏ね、10分間熟成(25℃)した。次に小麦粉180g、塩4gを加えて5分間捏ねた。次いで、バター15gを加え、さらに10分間(25℃)混練した。スチームコンベクションオーブンを使用して、スチーム機能を使用して35℃、30分間一次発酵させた。その後、ニーダーを用いて20秒間脱気した後、生地をニーダーから取り出し、2個に分割して35℃で15分間二次発酵を行った。生地を軽く押さえてガスを抜き、1斤用

の型に入れ、35℃で40分間発酵させた後に焼成した。クリ渋皮は2回の混捏時にそれぞれで添加された。1回目の混捏では、120gの小麦粉の重量の3、5、または10%がタンニン材料で置換えされ、2回目の混捏では、180gの小麦粉の3、5、または10%重量が置換えされた。

#### (5) パンの試料調製

焼き上がった後、直ちに型から取り出し、上部をあけたポリエチレン袋に入れ、25℃で24時間冷却した。25℃で72時間乾燥させた後に粉碎し、ウェスタンブロット分析ならびに抗酸化活性測定試料とした。

#### (6) 分析方法

小麦アレルゲン含有量の評価は、2種のELISAキット（グリアジン用 FASPEK ELISA II® シリーズ、FASTKIT ELISA Ver.小麦用 III® シリーズ）を使用した。さらに、 $\omega$ 5-グリアジンのレベルについては、ウェスタンブロット分析を実施した。

#### (7) パンの比容積と抗酸性評価

比容積は菜種置換法（AACCI法 10-05.01）、可溶性タンニン含量はFolin-Ciocalteu法、抗酸化活性は2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) および Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (H-ORAC) 法により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) タンニンがクッキーの免疫反応性タンパク質含有量に与える影響

本研究は、小麦粉（薄力粉）の3%、5%、10%をクリ渋皮とカキ幼果に置き換えることにより、タンニンの添加が小麦アレルゲンに及ぼす影響を調査した。2種のELISA法でのアッセイの結果、両方のキットが同様の傾向を示し、クリ渋皮およびカキ幼果を用いたすべての処理区で対照区と比較して値が大幅に減少した。クリ渋皮では、添加率が増加するにつれて、Faspek値およびFastkit値は顕著に低下した。対照的に、カキ幼果では、その添加によりFaspek値とFastkit値は減少したが、濃度依存的ではなかった。クリ渋皮およびカキ幼果の可溶性タンニン含量は、それぞれ $26,454 \pm 1262$  および  $3756 \pm 175$  mg カテキン eq/100 g DWであり、クリ渋皮の方が著しく高かった。したがって、可溶性タンニン含量が高いクリ渋皮は、カキ幼果よりもサンプル中のより多くの抗原タンパク質に結合し、Faspek および Fastkit 値が低下した可能性がある。特に、10%クリ渋皮置換区でのFaspek値とFastkit値は対照区よりも有意に低かった。対照区のFaspek値は48.4 mg/gであったのに対し、10%クリ渋皮置換区では21.2 mg/g(43.7%減少)だった。また、対照区のFastkit値が35.0 mg/gだったのに対し、10%クリ渋皮置換区では3.7 mg/gに減少した。SDS-PAGEゲルにおけるクッキーサンプルのCBB染色により、対照区には、25 kDa領域から大領域までの範囲のスミア染色に加えて、分子量25~250 kDaの範囲のいくつかのタンパク質バンドがあることが示された。 $\omega$ 5-グリアジンを検出するためのウェスタンブロット分析では、対照区のクッキーよりもクリ渋皮またはカキ幼果置換クッキーの小麦アレルゲン含有量が低いことが示され、この効果はクリ渋皮置換クッキーで顕著であった。この結果より、クリ渋皮とカキ幼果を添加することで、クッキー中の小麦アレルゲンレベルを減少させることが示唆された。

#### (2) タンニンがパンの免疫反応性タンパク質含有量に与える影響

市販のパン小麦（強力粉）と1BS-18Mを使用した。まず、カキとクリの未使用部分を加えたパンを製造し、タンニン素材の選定をした。その結果、タンニン素材としてクリ渋皮が最も優れていることがわかった。次に、強力粉と1BS-18Mの両方について、クリ渋皮の添加（3、5、または10%）が小麦アレルゲンの免疫反応性におよぼす影響を、WDEIA患者から得た血清と抗 $\omega$ 5-グリアジン抗体を用いたウェスタンブロット分析で判定した。その結果、強力粉と1BS-18Mともに、クリ渋皮の添加量を増やすほどパンのアレルギー誘発性を軽減し、抗酸化活性が向上することがわかった。しかしながらクリ渋皮10%添加区はパンの膨らみが悪く、比容積の値も、クリ渋皮無添加（対照）区やその他の処理区と比較して著しく低かった。パンはグルテンネットワークを必要とする小麦製品であるため、クリ渋皮添加による $\omega$ 5-グリアジン含有量の減少が、品質低下に大きく影響したと考えられる。以上の結果から、品質を維持しながら低アレルギー性を実現するために、クリ渋皮の置換は5%に留めるのがよいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tsurunaga Yoko, Arima Shiori, Kumagai Sae, Morita Eishin	4. 巻 12
2. 論文標題 Low Allergenicity in Processed Wheat Flour Products Using Tannins from Agri-Food Wastes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 2722 ~ 2722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods12142722	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 Tsurunaga Yoko, Morita Eishin	4. 巻 29
2. 論文標題 Effect of Adding Chestnut Inner Skin on Allergenic Protein, Antioxidant Properties, and Quality of Bread	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 863 ~ 863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules29040863	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷早恵, 森田栄伸, 有間史織, 高橋哲也, 鶴永陽子
2. 発表標題 タンニンを含む未利用資源添加によるクッキーの低アレルギー化
3. 学会等名 第69回（一社）日本家政学会中国・四国支部 研究発表会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アレルギー発症抑制食品	発明者 鶴永陽子, 森田栄伸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-129816	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	森田 栄伸  (Morita Eishin)  (90182237)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授     (15201)	

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