

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：43602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350113

研究課題名(和文) 高圧加熱処理による小麦アレルゲン低減化に関する研究

研究課題名(英文) Study on degradation of wheat allergens by high pressure heating

研究代表者

友竹 浩之 (Tomotake, Hiroyuki)

飯田女子短期大学・家政学科・教授

研究者番号：90300136

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)：小麦粉を粉のままオーブンまたはオートクレーブで加熱すると、未処理のものに比べてタンパク質の溶解性が著しく低下し、主要アレルゲンの抗原性も加熱時間とともに低下することがわかった。さらに、加熱処理したグルテンでラットを飼育すると、グルテンが消化・吸収されず、糞中に排泄されることがわかった。以上のことより、加熱処理小麦粉は、小麦の除去解除を目指すにあたって、小麦粉を試す前の中間食材として利用できる可能性が示唆された。

加熱した小麦粉の食材としての特徴を調べた結果、10分程度の加熱までは、菓子類や麺に応用できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The solubility of the wheat protein was significantly lower in the flour prepared at various heating condition (oven or autoclave). The amount of wheat antigen decreased with the heat treatment time. The amount of protein in feces was significantly higher in the rats fed heat treated gluten. These results indicated that heat treated wheat flour was useful food for abandon removal of wheat.

The flour prepared at heating on 10 minute can be applied to confectionery and noodles.

研究分野：基礎栄養学

キーワード：小麦粉 加熱処理 低アレルゲン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、食物アレルギー患者は増加傾向にあり、原因食品として、卵、牛乳の次に小麦が挙げられている。小麦アレルギーは、卵もしくは牛乳アレルギーと比べて治癒しにくいといわれており、食物依存性運動誘発性アナフィラキシーの原因食品にもなっている。また、小麦のように様々な食品に使用される食物が原因の場合、患者や料理を作る家族の生活の質は著しく低下する。

食物アレルギー治療の原則は原因の回避、すなわちアレルゲンを含む食品の摂取回避（アレルゲン除去食）であり、最も合理的かつ有効な治療である。しかしながら、アレルゲン除去食の目的は、アレルゲンの回避を続けることではなく、早期の耐性の獲得、すなわち症状を起こさずに「食べること」であるということ念頭において食事指導することが重要である(1)。食品を低アレルゲン化して積極的な摂取を促すことは、食物アレルギー児および家族の QOL の向上に有用であり、早期の耐性の獲得につながる可能性もある。

当研究室では、そば粉をオートクレーブ（高圧加熱）処理することにより、アレルギー原因物質の溶解性と抗原性が低下することを見出した(2)。要約すると以下のとおりである。

- ・ SDS-PAGE 分析の結果、オートクレーブ処理によって、24kDa アレルゲンを含む、主要バンドの量が減少した。

- ・ そば粉中のタンパク質の溶解性は、オートクレーブ処理によって、著しく減少した。

- ・ 24kDa アレルゲンタンパク質に特異的なモノクローナル抗体を用いた ELISA 分析の結果、オートクレーブ処理したそば粉の抽出タンパク質の反応性は、同濃度の未処理の抽出タンパク質に比べて著しく減少した。

これらの結果は、小麦粉にも応用できる可能性が高い。

卵は加熱により抗原性が低下しやすいため、十分な加熱調理により摂取可能となることが多い。これには、凝固による不溶化と副材料による不溶化などが関わっていることが明らかとなっている。一方、小麦粉は調理による低アレルゲン化が若干認められているのみであり、通常の調理方法では、小麦アレルギー児が摂取することが可能なまでに小麦抗原を低減化することはできない。一般的に、酵素を用いてアレルゲンを分解する方法があるが、小麦には適用が困難であり、かつ、酵素処理すると製麺等は困難になる。

アレルゲン除去食が必要なのは、乳児期発症のアトピー性皮膚炎と、即時型アレルギー反応を起こす症例が大半を占め、治療に必要な食品除去の程度は、症状によって異なり、抗原性の低減化により摂取可能となる軽症例も存在する。また、最近は専門医の指導のもと、「一部の患者を除き、アレルギー症

状が出る食べ物を最小限除去して、食べられるものは少しずつ食べるようにする」との治療方針が主流になってきている。

(1) 食物アレルギーの診断と治療の標準化：伊藤節子，アレルギー（2006）；55：1491-1496.

(2) An autoclave treatment reduces the solubility and antigenicity of an allergenic protein found in buckwheat flour. Tomotake H, Yamazaki R, Yamato M. J Food Prot. (2012);75(6):1172-1175.

## 2. 研究の目的

本研究では、小麦粉を高圧加熱処理することにより、卵と同様にアレルゲンタンパク質を不溶化させ、低アレルゲン化することを目指している。高圧加熱処理により低アレルゲン化する本研究は、他のアレルゲン低減化を目的とした研究の中でも、簡単でコストがかからず、実用化の可能性も高い。本研究が成功すれば、小麦アレルギー児および家族への朗報となる。また、小麦は様々な食品に使用されることから、食品製造業者から飲食サービス業に至るまで対策が必要となっており、低アレルゲン化小麦粉への市場ニーズは大きい。

## 3. 研究の方法

### (1) 小麦粉またはグルテンの加熱処理

小麦粉は市販の薄力粉またはデュラムセミolina粉を用いた。小麦粉をアルミホイルの上に平らに広げて包んだ後、オーブン（200℃、10～20分）または、オートクレーブ（121℃、10～20分）で加熱した。市販の小麦グルテンについても同様に加熱処理した。

### (2) 小麦粉の溶解性測定

加熱処理後の小麦粉（5mg）から水（2.5ml）または、尿素と SDS を含む緩衝液でタンパク質を抽出し（60℃、1時間）、抽出液のタンパク質含量を測定した。

### (3) 成分分析

抽出液中のタンパク質濃度は、キット（ブラッドフォード法）を用いて測定した。抽出液の構成タンパク質について、SDS-PAGE により調べた。サンプルは、SDS-PAGE 用サンプル処理液を加え（1:1）、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

### (4) 抗原性試験

抽出液中のグリアジン含量は、抗グリアジン抗体を用いた ELISA により測定した。すなわち、段階希釈した抽出液を 50 μl ずつ ELISA プレートに入れ、4℃で1晩放置した。PBS でプレートを洗浄後、7%BSA で1時間ブロッキングした。洗浄後、ペルオキシダーゼをラベルした抗グリアジン抗体 50 μl を入れ、1時間反応させた。洗浄後、キット（ABTS）を用いて、発色させた後、405nm の吸光度を測定した。

### (5) 消化性試験 (in vitro)

試料(グルテン)を水にけん濁し、6N塩酸でpH 2.0に調整した。37°Cに保温し、ペプシン1.5mgを添加した。攪拌しながら時間毎にサンプリングした。その後、10%水酸化ナトリウムでpH8.5に調整し、パンクレアチン4.5mgを添加した。同様に攪拌しながら時間毎にサンプリングした。サンプルは30%トリクロロ酢酸を添加後、遠心した。上清に7%炭酸水素ナトリウムと0.1%TNBSを添加し、420nmの吸光度を測定した。

### (6) 消化性試験 (動物実験)

未処理、オーブン加熱またはオートクレーブ加熱したグルテンをタンパク質源として飼料を作製し、SD系雄ラットを飼育した(グルテン群、オーブン加熱群、オートクレーブ加熱群)。実験期間は7日間とし、最後の2日間の糞を採取した。糞中の窒素含量はケルダール法で分析した。

#### 動物実験

実験動物: SD系雄ラット	飼料組成			
	未処理群	オーブン加熱群	オートクレーブ加熱群	
実験期間: 7日				
飼料: タンパク質含量 20% 食物繊維含量 5%				
グループ: 未処理群(n=5) オーブン加熱群(n=5) オートクレーブ加熱群(n=5)				
	未処理	275	0	0
	オーブン加熱	0	275	0
	オートクレーブ加熱	0	0	275
	レシチン	3	3	3
	コーン油	86	86	86
	ミネラル混合	35	35	35
	ビタミン混合	10	10	10
	セルロース	50	50	50
	α-コングスターチ	341	341	341
	シュクロース	200	200	200

### (7) 食品試作

未処理、オーブン10分加熱または20分加熱した小麦粉、ホワイトソルガムの4種類の粉を用いて各食品の試作を行った。ホワイトソルガムは、中野産業(株)から購入した。作り方は以下のとおりである。

#### 「かりんとう」

材料	分量 (2人分)
粉	100g
砂糖	大1
B. P.	小0.5
水	50cc
揚げ油	適量
仕上げ用砂糖	60g
水	大1
塩	0.2g

- ①粉、砂糖、B. P. を混ぜる。
- ②生地がなめらかになったら打ち粉をして3mmくらいに麺棒でのばし、たて4cm、幅3mmくらいに切る。
- ③180°Cの油で揚げる。
- ④フライパンに仕上げ用の砂糖、塩と水を火にかけて、揚げた生地を入れて混ぜる。

#### 「ドーナツ」

材料	分量 (2人分)
粉	100g
B. P.	5g

砂糖	15g
塩	0.2g
豆乳	50cc
仕上げ用砂糖	適量

- ①ボウルに粉類を合わせて泡だて器で混ぜ合わせる。
- ②180°Cの油で揚げる。
- ③仕上げ用砂糖をまぶす。

#### 「うどん」

#### 材料 分量 (2人分)

小麦粉	150g
片栗粉	15g
熱湯	150g
打粉	適量

- ①ボウルに粉類を入れ、熱湯を注ぎ捏ねる。
- ②表面に艶が出たらひとまとめにし袋に入れて30分寝かせる。
- ③生地を伸ばして5mm程度の幅に切り、茹でたら冷水でしめる。

## 4. 研究成果

### (1) 加熱処理小麦粉またはグルテンの性状

加熱処理後の粉の性状を比較すると、加熱時間とともに色(茶色)が濃くなり、オーブン加熱では、粉が著しく乾燥した。一方、オートクレーブ加熱では、色の変化が少なかった。

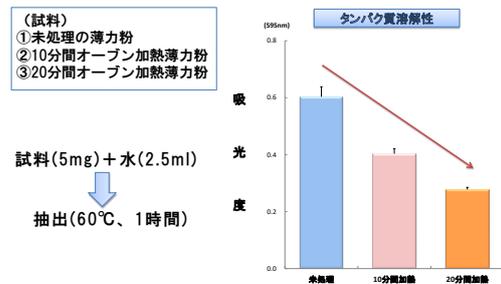
#### 小麦粉の加熱処理



### (2) 加熱処理小麦粉の溶解性

小麦粉を粉の状態でもオーブン加熱すると、加熱時間とともにタンパク質が明らかに抽出されにくくなるのがわかった。

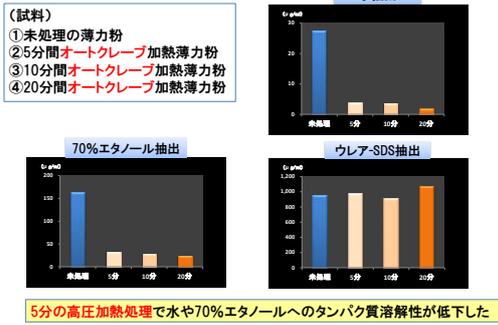
#### 小麦粉タンパク質の溶解性測定



加熱時間が長いほどタンパク質は不溶化し水に溶けにくくなる

一方、小麦粉を粉の状態でもオートクレーブ加熱しても、水や70%エタノールへのタンパク質溶解性が著しく低下した。

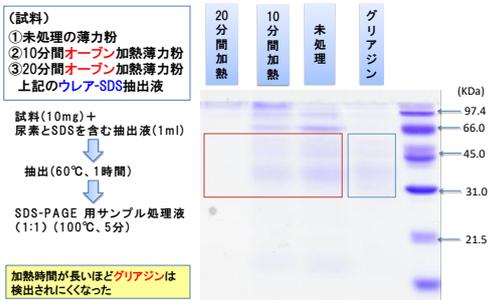
### 小麦粉タンパク質の溶解性測定



### (3) 加熱処理小麦粉のタンパク質組成

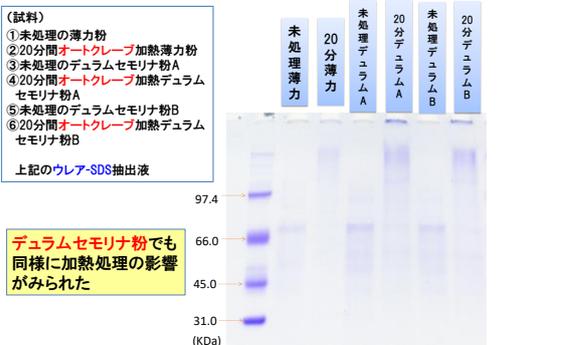
SDS-PAGE 分析の結果、検出されるアレルゲンタンパク質の量が加熱処理により減少していた。とくに、加熱時間が長いほど、グリアジンのバンドが検出されにくくなった。

#### 小麦粉タンパク質の電気泳動パターン



デュラム小麦粉においても、同様に加熱処理の影響がみられた。

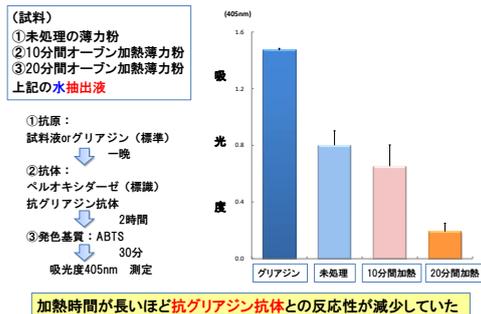
#### デュラム小麦タンパク質の電気泳動パターン



### (4) 加熱処理小麦粉の抗原性分析

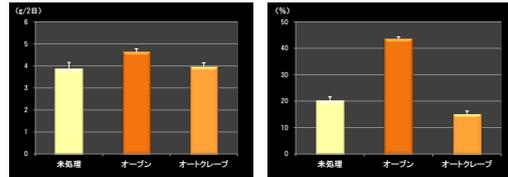
ELISA 分析の結果、水抽出液中のアレルゲン量が、加熱処理により減少した。このとき、加熱時間が長いほど、抗グリアジン抗体との反応性が減少していた

#### 小麦主要アレルゲンのELISA分析



#### 糞重量

#### 糞中タンパク質含量

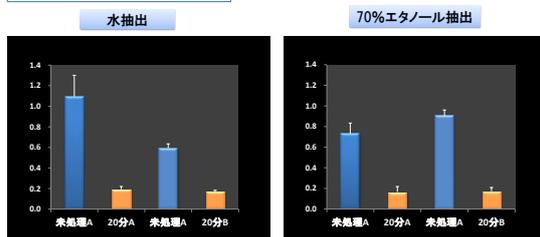


※ 平均値±標準誤差、(n=5)

オープン加熱処理したグルテンは、大部分が排泄されていた

デュラム小麦粉においても、同様に加熱処理の影響がみられた。

#### 小麦主要アレルゲンのELISA分析



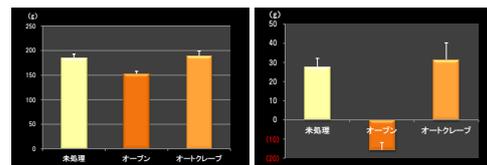
### (5) 加熱処理グルテンの消化性

試験管内での消化実験の結果、加熱処理をしたグルテンは、未処理のグルテンと同様に遊離のアミノ酸が増加した。

動物実験の結果、グルテンのオープン加熱処理は、ラットの成長を阻害した。

#### 摂餌量

#### 体重増加量

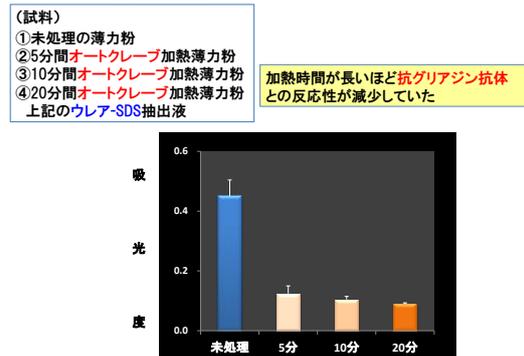


※ 平均値±標準誤差、(n=5)

グルテンのオープン加熱処理は、ラットの成長を阻害した

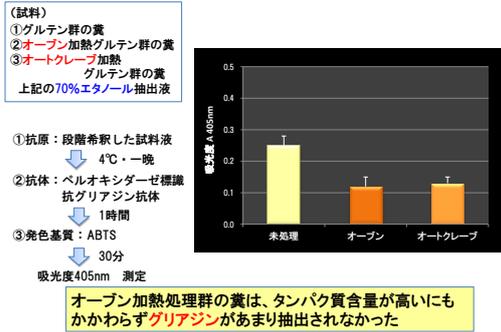
また、オープン加熱処理したグルテンは、大部分が排泄されていた。

#### 小麦主要アレルゲンのELISA分析



オープン加熱処理群の糞は、タンパク質含量が高いにもかかわらずグリアジンがあまり抽出されなかった。

### 糞抽出液のELISA分析



### (6) 加熱処理小麦粉を用いた食品

(かりんとう)

ホワイトソルガムは、完全に粉っぽくて生地にまとまりがなく、寝かせて揚げても特に変化がなかった。少し癖のある味わいが、黒糖の風味で上手くフォローされていた。歯ごたえは固くボリボリとしており膨らんでいる感じはしなかった。

10分間加熱したものは、生地に多少まとまりが出ており、グルテンが少し残っているように感じたが、小麦粉に比べると少しパサパサしていた。見た目は少し茶色く色づいていたが、気になるほどでもなかった。揚げても少ししか膨らんでいなかった。少々焦げた味もしたが、油で揚げているので逆に良い風味に感じた。黒糖でコーティングしているのも更に違和感がなかった。

20分間加熱したものは、ほぼ完全にまとまりがなく、グルテンはほとんど感じなかった。また、粉自体の水分が飛んでいるため、濾してもだまが多く水分を多く必要としていた。色は完全な茶～焦げ茶色をしており、揚げるからまだ良いが、これを小麦粉として通常使うには難しい気もした。揚げても膨らまず硬いままで、よく言えば香ばしく、悪く言えば焦げっぽい味がした



(ドーナツ)

ホワイトソルガムは、サラサラとした感じで粘り気が少なかった。加熱すると小麦粉ほどではないが膨らんでいた。独特の風味があり、少し水っぽく感じた。10分間加熱したも

のは、生地を作っているときはあまり小麦粉と変化はなかった。加熱すると、多少膨らみは少ないもののベーキングパウダーが入っているため小麦粉同様膨らんでいた。味は少々焦げたような香りは残っているが、気になるほどではなく程よい風味に感じた。

20分間加熱したものは、パサパサとしており他のものよりも多く水分を必要とした。粉は振るっていたが、少々だまが残っていた。加熱してもほとんど膨らみはなく、加熱前と変化がなかった。焦げの味が強く、少しパサパサしていた。

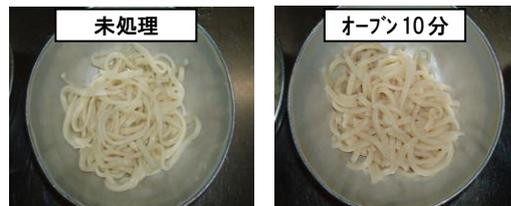


(うどん)

ホワイトソルガムは、まとまりがなく、紙粘土をこねる感覚だった。一応はまとまるが、コシはない。茹でる時には少し混ぜただけでボロボロと崩れてしまった。プチプチと切れてしまったため全体的に短く、独特の風味があり、少々食べにくい。片栗粉が入っているため多少はツルツルとした食感がある。

10分間加熱したものは、小麦粉に比べるとまとまりにくく伸びる感じもしないが、他の2種類よりはまとまりやすさを感じた。多少はグルテンが残っているのか、あまりちぎれず、茹でた時の破損もほとんど見られなかった。少し焦げの風味もあるが、ほとんど気にならずうどんに近いと感じた。

20分間加熱したものは、ほとんどまとまらず水分を多く必要とした。しかし、いつまでこねてもコシは出ることはなく、なんとかまとまる程度にしかかなかかった。麺を切るときはボロボロしてしまい、麺としての形状を保つことができなかった。焦げの味を強く感じ、苦い。



以上のことより、小麦粉を加熱処理することにより、アレルギーとなるタンパク質が不溶化し、消化されにくくなることが分かった。小麦アレルギーに限らず、アレルギーを持つ子供の親は食事に敏感になるものである。

現在の治療方針とはいえ、いきなり原因食材を与えるのは抵抗が生じる。除去解除を目指すにあたって、ホワイトソルガムや米粉のようなアレルゲンが含まれていないものと、小麦粉の中間となる食材があればスムーズな移行も可能になるかもしれない。加熱処理小麦粉が小麦粉を試す前の中間食材として利用できるように、更なる研究を続けていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1 Hosaka T, Sasaga S, Yamasaka Y, Nii Y, Edazawa K, Tsutsumi R, Shuto E, Okahisa N, Iwata S, Tomotake H, Sakai T. Treatment with buckwheat bran extract prevents the elevation of serum triglyceride levels and fatty liver in KK-A(y) mice. J Med Invest. 2014;61(3-4):345-52.
- 2 Tomotake H, Kayashita J, Kato N. Hypolipidemic activity of common (Fagopyrum esculentum Moench) and tartary (Fagopyrum tataricum Gaertn.) buckwheat. J Sci Food Agric. 2015 Aug 15;95(10):1963-7.
- 3 Yang Y, Sitanggang NV, Okazaki Y, Tomotake H, Arita K, Ashida T, Kato N. Supplemental fermented plant product ('Manda Koso') reduces succinate and deoxycholate, as well as elevates IgA and mucin levels, in rats fed a high-fat diet. Biomed Rep. 2015 Nov;3(6):787-791

[学会発表] (計 7 件)

- 1 友竹浩之、千裕美、山下紗也加  
加熱処理による小麦アレルゲンの不溶化に関する研究  
第 61 回日本栄養改善学会  
(2014 年 8 月 22 日：パシフィコ横浜)
- 2 友竹浩之、伊藤瑠美、志摩妃沙、中村未来、山原愛理  
パイナップル酵素による卵・牛乳アレルゲンの分解  
日本農芸化学会学術総会 2015 年度大会  
(2015 年 3 月 27 日：岡山大学)
- 3 Tomotake H, Kohri T, Silk worm pupae (Bombyx mori) are new sources of high quality protein, lipid and alpha-glucosidase inhibitor. 12th Asian Congress of Nutrition (国際学会)  
(2015 年 5 月 15 日：横浜国際会議場)
- 4 Yang Y, Sitanggang NV, Okazaki Y, Tomotake H, Arita K, Ashida T, Kato N. Effect of fermented plant product on

colonic luminal environment in rats fed a high-fat diet.

12th Asian Congress of Nutrition (国際学会)

(2015 年 5 月 15 日：横浜国際会議場)

- 5 友竹浩之、新居住孝、郡俊之  
小麦アレルゲンを不溶化させる加熱処理条件の検討  
第 70 回日本栄養食糧学会  
(2016 年 5 月 15 日：武庫川女子大学)
- 6 友竹浩之、小瀬木一真、今岡早希、村澤久司、塩澤信也  
粉豆腐の栄養機能および調理特性について  
日本調理科学会平成 28 年度大会  
(2016 年 8 月 28 日：名古屋学芸大学)
- 7 友竹浩之、岩瀬彩香  
加熱処理が小麦アレルゲンの消化性に与える影響  
日本農芸化学会学術総会 2017 年度大会  
(2017 年 3 月 19 日：京都女子大学)

[図書] (計 3 件)

- 1 友竹浩之、郡俊之/編  
公衆栄養学概論  
講談社サイエンティフィック  
2016 年 171 ページ
- 2 友竹浩之、塚原丘美/編  
臨床栄養学概論  
講談社サイエンティフィック  
2016 年 185 ページ
- 3 友竹浩之、桑波田雅士/編  
新・栄養学総論  
講談社サイエンティフィック  
2016 年 168 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件) なし

○取得状況 (計 0 件) なし

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

友竹 浩之 (TOMOTAKE HIROYUKI)

飯田女子短期大学・家政学科・教授

研究者番号：90300136

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし