

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700594
 研究課題名 (和文) 食物抗原の腸管吸収性とアレルギー誘発能に及ぼす加工・調理の影響

研究課題名 (英文) Effects of cooking and food processing on intestinal absorption and allergenic potency of food proteins

研究代表者
 山田 千佳子 (YAMADA CHIKAKO)
 名古屋学芸大学・管理栄養学部・助教
 研究者番号：30351216

研究成果の概要：

米および卵白中の抗原タンパク質の消化性および腸管吸収性について、マウスを用いて検討した。その結果、抗原タンパク質は十分に消化されず、未分解のまま小腸の吸収部位に達し、未分解物が選択的に血中へ移行していた。さらに抗原タンパク質を経口投与後の抗体応答を解析した結果、血中の滞留期間が長かったタンパク質で抗体応答が見られ、抗原タンパク質の消化、吸収性と免疫応答との間には関連性があることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食物アレルギー、タンパク質の消化と吸収

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、現代の食生活に不可欠である卵、牛乳、大豆、米などのタンパク質を含む食品の摂取による食物アレルギーが問題になっている。通常、日常的に摂取される食物は、タンパク質分解酵素による抗原の分解、および消化管内腔に分泌された IgA 抗体や消化管上皮細胞のバリア機能などにより、抗原の取り込みおよび生体内での好ましくない免疫応答が起こらないようになっている。それにも関わらず、免疫学的に活性が保持されたままの抗原タンパク質が体内に取り込まれて

免疫系を刺激し、食物アレルギーを引き起こすことがある。

(2) 一般に、食物は摂取される前に酸や加熱、または油脂との乳化や空気との気泡形成など調理、加工の段階でタンパク質が変性を受けたり、他の食品成分と反応したりする可能性がある。この変性や他の食品成分との相互作用により消化管での消化・分解性に変化が生じ、それに伴う消化管からの吸収およびその後誘導される免疫応答にも差異が見られると考えられる。

2. 研究の目的

食物アレルギーの機序解明の第一歩として、食餌性タンパク質抗原の消化分解、および消化管からの吸収とアレルギー誘発能との関連について調べ、それが加工、調理によってどのように変化するのか明らかにすることを本研究の目的とした。

(1) 通常、多くの食品は摂取前に調理、加工されるため、そこに含まれるタンパク質は、変性や他の成分と相互作用する可能性がある。食物アレルギーは抗原性を保持したまま吸収された抗原タンパク質により引き起こされるため、変性や他の食品成分との相互作用により消化、分解性が良くなれば、アレルギーが抑制されると考えられる。そこで、種々の食物抗原タンパク質を様々な方法により変性させ、実験動物モデル系を用いて、経口投与された変性タンパク質の消化・分解性と、体内への吸収にどのような差異が見られるかを未変性タンパク質と比較解析する。

(2) 未変性および変性タンパク質をマウスに経口投与し、その後に誘導される免疫応答を調べ、関連を明らかにすることにより、アレルギーを誘導しない調理、加工方法および摂取方法を模索する。

(3) すでに SDS-PAGE 解析により、タンパク質レベルでの低アレルゲン化が確認されている食品を用いて、同方法により実際にアレルギーが抑制されているかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 抗原タンパク質の変性による消化・分解性の変化の解析

抗原タンパク質として、卵のアレルゲンであるオボアルブミン(OVA)、リゾチーム(LY)、米のアレルゲンである 14-16 kDa アルブミン(RA)を使用した。OVA、RA はそれぞれ卵および米から精製した。これらの抗原タンパク質を 100°C で 5 分加熱変性させ、未変性および加熱変性タンパク質について、人工胃液(ペプシンを含む)および人工腸液(パンクレアチンを含む)中で 0-120 分反応させた。反応後の溶液を SDS-PAGE 後、特異抗体を用いたイムノブロット法で各抗原タンパク質を検出し、消化性を比較した。

さらに、*in vivo* でのタンパク質分解酵素による消化・分解に差が見られるかどうかを解析した。OVA、LY、RA 20mg をマウスに胃内投与し、30、60、90 分後に屠殺して消化管を摘出した。さらに胃、小腸、盲腸、大腸に分割後、PBS で洗浄することにより消化管内容物を回収した。この試料溶液中の抗原タンパク質を SDS-PAGE および特異抗体を用

いたイムノブロット法で検出し、抗原タンパク質の分解の様子を比較した。

(2) 変性タンパク質の消化管からの吸収と体内動態の解析

経口投与した抗原タンパク質の吸収について明らかにするために、OVA、LY をマウスに経口投与し、30 分後に門脈血を採取した。血清中の抗原タンパク質の存在形態について、イムノブロット法で解析した。

さらに、抗原タンパク質の種類によって、消化管から体内への吸収量に違いがあるかどうかを明らかにするために、OVA、LY、RA をビオチン化標識後、麻酔下で開腹したマウスの十二指腸に 4mg 投与して門脈血を採取した。得られた血清中の抗原タンパク質について、アビジンを固相としたサンドイッチ ELISA 法で定量し、投与から吸収されるまでの時間、吸収量について比較した。

(3) 抗原タンパク質特異的免疫応答の解析

吸収された抗原タンパク質量と、投与後に引き起こされる免疫応答との関連を明らかにするために、各抗原タンパク質を経口投与後の抗体応答について解析した。B10.A マウス(6 週齢、雌)に OVA または LY を 20mg ずつ、6 日間経口投与した。その後、末梢血を採取し、血清中の IgG1、IgE 抗体価を ELISA 法で測定し、その変動を比較した。

以上の結果から、各抗原タンパク質の消化、吸収性と摂取後に誘導される免疫応答との関連性について考察した。

4. 研究成果

(1) 抗原タンパク質の変性による消化・分解性の変化の解析

各抗原タンパク質を人工胃液および人工腸液中で 0-120 分反応させ、消化性を比較した。OVA および LY の結果を図 1 に示した。

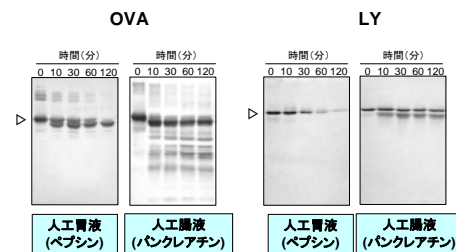


図1 *in vitro*でのOVA・LYの消化酵素による分解

OVA、LY とともに、人工胃液および人工腸液中で 120 分反応させても完全には分解されなかった。また、RA についても同様の結果が得られ、アレルゲンとなるタンパク質は、消化酵素に対して抵抗性を示すことが明ら

かとなった。さらに、OVA、LY については加熱変性させ、未変性の場合の消化性と比較した。その結果、OVA は加熱変性により著しく消化性が上がったのに対して、LY はほとんど変化が見られず、加工することによりタンパク質の消化性は変化するが、その度合いはタンパク質によって異なることが確認された。

次に、各抗原タンパク質をマウスに胃内投与し、消化管内での分解の様子を比較した。OVA および LY の結果を図 2 に示した。

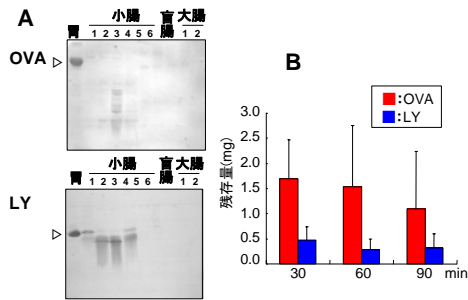


図2 経口投与抗原タンパク質の消化管での存在状態と小腸内残存量

OVA または LY をそれぞれ 20mg マウスに胃内投与し、30 分後に消化管内容物を回収した。SDS-PAGE および特異抗体を用いた免疫ブロット法で OVA および LY を検出した結果 (図 2-A)、投与したタンパク質は、消化酵素による分解を受けながら吸収部位である小腸に到達しており、吸収部位において抗原性を保持していた。この抗原性を保持したまま小腸内に残存していたタンパク質を定量した結果 (図 2-B)、LY より OVA の方が残存量は多かった。RA についても同様に解析を行ったところ、小腸内残存量は 0.07-0.59mg であった。以上の結果より、抗原タンパク質は *in vivo* においても消化されにくく、小腸の吸収部位において抗原性を保持した状態で残存しているものの、その残存量には差が見られることが明らかとなった。

(2) 変性タンパク質の消化管からの吸収と体内動態の解析

経口投与した抗原タンパク質が、小腸内に抗原性を保持したまま残存することを確認した。そこで、次に、この抗原タンパク質の消化管から体内への吸収について、門脈血を採取し解析を行った。OVA および LY の結果を図 3 に示した。

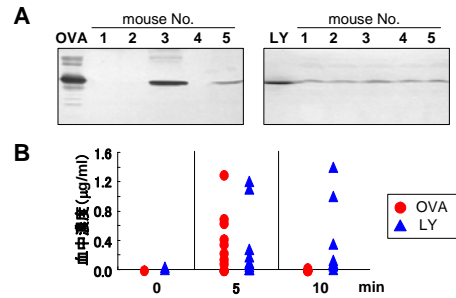


図3 消化管から門脈血中への抗原タンパク質の移行

各タンパク質をマウスに経口投与し、30 分後の門脈血を採取した。血清中の抗原タンパク質を免疫ブロット法で検出した結果 (図 3-A)、小腸内に検出された分解断片 (図 2-A) は血中にはなく、未分解物のみが検出された。したがって、小腸内の抗原性を保持した分解断片は血中には移行せず、未分解物のみが選択的に血中へ移行していることが明らかとなった。

さらに、抗原タンパク質によって、消化管から体内への吸収量に違いがあるかどうかを明らかにするために、マウスの十二指腸に抗原タンパク質を投与して門脈血を採取した。得られた血清中の抗原タンパク質を定量し、投与から吸収されるまでの時間、吸収量について比較した (図 3-B)。その結果、OVA は十二指腸投与 5 分後に最も血中濃度が上昇し、その後減少したが、LY は 5-10 分にかけて血中から検出され、吸収が異なっていた。しかし、その血中濃度に差は認められなかった。RA についても血中濃度の解析を行った結果、十二指腸投与 5 分後に、0-2.5µg/ml の濃度で血中から検出された。

(3) 抗原タンパク質特異的免疫応答の解析
抗原タンパク質の消化、吸収性と、投与後に引き起こされる免疫応答との関連を明らかにするために、OVA または LY をマウスに経口投与後、抗体応答について解析した (図 4)。

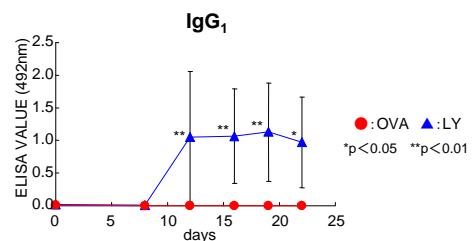


図4 抗原タンパク質を経口摂取後に誘導される抗体応答

その結果、OVA 投与群では抗体応答が見られなかったのに対して、LY 投与群では IgG1

の顕著な増加が認められ、OVA と LY では、投与後に誘導される抗体応答に違いが見られることが明らかとなった。

以上の結果を消化、吸収性の違いから考察すると、抗体応答が誘導された LY は消化管内に未分解の状態で残存しており (図 2-A)、小腸吸収部位から吸収されて門脈血中に移行するのは、未分解物のみであったため (図 3-A)、抗体応答を誘導しやすかったのではないかと考えられる。さらに、OVA よりも門脈血中に存在していた時間が長かったため (図 3-B)、免疫細胞を刺激する機会も増加し、抗体応答を誘導しやすかったのではないかと考えられる。これより、各アレルゲンの消化、吸収性の違いが免疫応答に大きく関与しており、経口摂取した場合、LY は OVA よりも免疫応答を誘導しやすいと考えられた。

なお、当初の研究目的にあった (3) 低アレルゲン化食品を用いたアレルギー抑制の検証については、時間の都合上、解析にはいたらなかった。

また、図に示した OVA および LY の結果は未投稿のデータであり、RA に関してはすでに投稿論文になっているため、省略した。

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 1 件)

- ① 山田千佳子、山下裕香理、関亮太郎、和泉秀彦、松田幹、加藤保子、Digestion and gastrointestinal absorption of the 14-16-kDa rice allergens、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、70・8、1890-1897、2006、査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山田千佳子、和泉秀彦、加藤保子、松田幹、米 14-16 kDa アレルゲンの消化性および腸管吸収性、日本栄養・食糧学会、2006.5.20、静岡県立大学
- ② 山田千佳子、加藤保子、松田幹、和泉秀彦、食餌性タンパク質抗原の消化性および腸管吸収性、日本栄養・食糧学会、2007.5.19、国立京都国際会館
- ③ 松田幹、松原毅、山田千佳子、食物アレルゲンの腸管での消化と吸収、日本栄養・食糧学会、2007.5.20、国立京都国際会館
- ④ 牧野仁美、山田千佳子、間崎剛、松田幹、和泉秀彦、卵白アレルゲンの小腸での分解とその吸収性との関連、日本栄養・食糧学会、2008.5.3、女子栄養大学
- ⑤ 山田千佳子、和泉秀彦、卵白アレルゲンの小腸における消化性および吸収性の比較、日本家政学会、2008.5.31、日本

女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 千佳子 (YAMADA CHIKAKO)

研究者番号 : 30351216

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：