

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33939

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02364

研究課題名（和文）加工方法の異なる小麦アレルゲンのアレルギー症状誘発能の変化

研究課題名（英文）Analysis of differences in allergenicity of wheat allergens processed by different processing methods

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・准教授

研究者番号：30351216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、加工方法の違いによる小麦アレルゲンの変化がアレルギー症状の誘発に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。リコンビナント ω -5グリアジンを用いてモノクローナル抗体を作製し、異なる条件で作製した小麦生地を純水で茹でたときの溶出アレルゲンを検出した。その結果、茹で時間が長いほど、茹で時の生地の表面積が大きいほどアレルゲン溶出量が増加した。さらに生地のpHを変化させると、アレルゲンの溶出量は酸添加生地 > アルカリ添加生地 > 水添加生地となった。また、in vitroでの ω -5グリアジン検出系の確立を目指して、リコンビナント ω -5グリアジンの消化・吸収性を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、不溶性タンパク質であるプロラミンに分類される ω -5グリアジンが、小麦生地を茹でる際に茹で汁中に溶出することを明らかにした。また、小麦生地に酸やアルカリを添加すると、 ω -5グリアジンの溶出量が増加した。 ω -5グリアジンはアミノ酸配列が明らかとなっており、システイン残基を持たないため、生地作製時に他のタンパク質とS-S結合を形成しない。そのため、茹でる操作で水中に溶出したのではないかと考えられる。その結果、うどんはわずかながら低アレルゲン化されており、同量的小麦粉を含むパンと比較すると症状が出にくいのではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the effects of changes in wheat allergens due to different processing methods on the induction of allergic symptoms, and to propose wheat processing methods that patients can safely consume. Using recombinant ω -5 gliadin, monoclonal antibodies were prepared to detect eluted allergens when wheat dough prepared under different conditions was boiled in pure water. As a result, the longer the boiling time and the larger the surface area of the dough during boiling, the more allergens eluted. Further, when the pH of the dough was changed, the amount of allergen elution was as follows: Acid-added dough > Alkali-added dough > Water-added dough.

In addition, we analyzed the digestion and absorption of recombinant ω -5 gliadin with the aim of establishing an in vitro detection system for ω -5 gliadin.

研究分野：食品科学

キーワード： ω -5グリアジン 食物アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 経口免疫療法を受けた小麦アレルギー患者の小麦加工品に対する症状

近年、食物アレルギーの治療法として経口免疫療法が注目されており、あいち小児保健医療総合センターでは、小麦アレルギー患者の治療にうどんが用いられている。ところが、治療によりうどんが 100g まで摂取できるようになった患者が、同等の小麦タンパク質を含む食パンを摂取すると症状が出てしまう例が見受けられた。このように、摂取した食品中のアレルゲン含量は等しいと思われても、加工方法の違いにより誘発症状が異なる場合があるが、その原因は明らかにされていない。

(2) 小麦加工品中のアレルゲンの存在状態と患者血清との反応性解析

この原因について我々は、うどんは小麦生地を茹でる工程があるため、水中にアレルゲンが溶出し、低アレルゲン化されているのではないかと、これに対してパンを焼く工程は「茹で」よりも高温かつ乾式加熱のため、アレルゲンの存在状態がうどんと異なっているのではないかと、という仮説を立てた。そこで市販のうどんとパンに含まれるタンパク質の存在状態の変化を解析し、小麦アレルギー患者血清を用いてアレルゲン性の比較を行った(田中賀治代ら アレルギー 2017)。しかし、小麦アレルギー患者血清との反応性に試料間で違いが認められず、臨床現場で観察されるアレルギー症状の差異の原因解明には至らなかった。その原因として、市販のうどんやパンに加えられている様々な添加物や加工処理の影響を考慮していなかったことが考えられた。これらの添加物や加工処理については、「おいしさ」に関するグルテン形成に対する効果を解析した報告は数多くみられるが、小麦アレルゲンがどのようにグルテンと相互作用し、変化しているのか明らかにした報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、加工方法の違いによる小麦アレルゲンの変化がアレルギー症状の誘発に及ぼす影響を明らかにし、患者が安全に摂取できる小麦加工方法を提案することを目的とした。そのために、小麦主要アレルゲンである ω -5 グリアジンを検出するための抗体を作製し、これを用いて小麦加工品中の ω -5 グリアジンの加工による変化を解析した。さらに、小麦加工品摂取時のアレルギー症状誘発能を解析するため、*in vitro* での ω -5 グリアジン検出系の確立を試み、予備試験としてリコンビナント ω -5 グリアジンの消化・吸収性を解析した。

3. 研究の方法

(1) 小麦加工品中の ω -5 グリアジンの状態変化の解析

ω -5 グリアジン検出抗体の作製

ω -5 グリアジンの検出を可能にするために、リコンビナント ω -5 グリアジンを調製後、京都女子大学の門間教授に依頼してマウスモノクローナル抗体を作製していただいた。この抗体を用いて、小麦粉から総タンパク質を抽出した試料中の ω -5 グリアジンを検出した。また、リコンビナント ω -5 グリアジンまたは小麦粉から精製した ω -5 グリアジンを固相した間接 ELISA で検出感度を確認した。

小麦加工品中の ω -5 グリアジンの状態変化の解析

作製したモノクローナル抗体を用いて、まず小麦加工品としてうどんを選択し、生地を茹でる際に溶出する ω -5 グリアジンを検出した。小麦粉に純水または 0.51M NaCl 溶液を加えて無塩生地、有塩生地を作製後、純水で茹でて継時的にゆで汁を回収し、 ω -5 グリアジン溶出における茹で時間の影響を解析した。また茹で時の生地の表面積の大きさの影響を比較するために、生地を 1 個、4 個、16 個の球状に分けて茹でたときの ω -5 グリアジン溶出の変化を解析した。さらに、純水生地および pH3~11 の緩衝溶液添加生地を作製後、純水で茹でてゆで汁を回収し、 ω -5 グリアジン溶出における生地 pH の影響を解析した。得られた回収試料溶液中のタンパク質量を Lowry 法で測定し、タンパク質組成を SDS-PAGE 法で解析した。さらに、イムノプロット法で各試料溶液中の ω -5 グリアジンを検出した。

(2) *in vitro* ω -5 グリアジン検出系の確立とリコンビナント ω -5 グリアジンの消化・吸収性解析

小麦加工品を摂取した際のアレルギー症状誘発能を解析する目的で、*in vitro* における ω -5 グリアジン検出系を確立するために、予備試験としてリコンビナント ω -5 グリアジンの消化・吸収性を解析した。B10.A マウスにリコンビナント ω -5 グリアジンまたはコントロールとして卵アレルゲンであるオボアルブミンをマウス一匹当たり 20mg 経口投与し、30 分および 60 分後に採血してその血清を試料とした。また、消化管を摘出し、胃・小腸・盲腸・大腸に分割した後、各組織を PBS で洗浄して内容を回収した。消化管内容物中の各アレルゲンは作製した抗 ω -5 グリアジンマウスモノクローナル抗体を用いたイムノプロット法で検出し、血清中の各アレルゲンは阻害 ELISA で定量するとともにイムノプロット法で存在状態を確認した。

4. 研究成果

(1) 小麦加工品中の ω -5 グリアジンの状態変化の解析

ω -5 グリアジン検出抗体の作製

京都女子大学の門間教授に作製していただいたマウスモノクローナル抗体を用いて、小麦粉から総タンパク質を抽出した試料中の ω -5 グリアジンをイムノプロット法で検出した。抗体はリコンビナント ω -5 グリアジン、小麦粉から精製した ω -5 グリアジンどちらにも反応し、還元状態よりも非還元状態の方が反応性が高かった。また、小麦粉中の ω -5 グリアジン以外のタンパク質と思われるバンドが複数検出された。これまでに明らかにされている他のグリアジンやグルテニンのアミノ酸配列をみると、 ω -5 グリアジンのリピート配列によく似た配列を持っている。今回得られた抗体は、この共通配列を認識するため、複数のバンドが検出されてしまったと考えられた。また、リコンビナント ω -5 グリアジンまたは小麦粉から精製した ω -5 グリアジンを固相した間接 ELISA を行った結果、リコンビナント ω -5 グリアジンの検出限界は $1\mu\text{g/ml}$ だったのに対して、小麦粉から精製した ω -5 グリアジンの検出限界は $0.1\mu\text{g/ml}$ であり、小麦粉から精製した ω -5 グリアジンの方が検出感度が高かった。

小麦加工品中の ω -5 グリアジンの状態変化の解析

作製した無塩生地、有塩生地を純水で茹でて継時的にゆで汁を回収し、 ω -5 グリアジン溶出における茹で時間および生地の表面積の大きさの影響を解析した。その結果、無塩生地、有塩生地でのタンパク質溶出量に差は見られず、経時的に茹で汁中への ω -5 グリアジン溶出量が増加した。また、表面積を大きくするほど ω -5 グリアジン溶出量が増加した。さらに、異なる pH の緩衝溶液で作製した生地を茹でた場合では、溶出タンパク質組成を比較すると、酸添加生地から溶出したタンパク質とアルカリ添加生地から溶出したタンパク質では組成が異なっていた。このとき ω -5 グリアジンの溶出量は、酸添加生地 > アルカリ添加生地 > 水添加生地となった。しかし、生地からのアレルゲン溶出量はわずかであり、ゆで生地からは残存 ω -5 グリアジンが検出された。

(2) *in vitro* ω -5 グリアジン検出系の確立とリコンビナント ω -5 グリアジンの消化・吸収性解析

ω -5 グリアジンの *in vivo* での消化・吸収性を明らかにするために、 ω -5 グリアジンまたは OVA を投与したマウスから投与 30 分および 60 分後に消化管内容物を回収し、各アレルゲンの消化性をイムノプロット法で解析した。その結果、OVA 投与群では、経口投与 30 分で胃から小腸にかけて未分解の OVA およびその分解断片のバンドが検出された。一方、 ω -5 グリアジンは経口投与 30 分では胃から未分解の ω -5 グリアジンのバンドのみが検出され、小腸からはほとんど検出されなかった。そこでさらに経口投与 60 分後の解析を行った結果、胃及び小腸から未分解の ω -5 グリアジンとその消化物が検出された。この時の得られた血清中の各アレルゲンを阻害 ELISA で定量したところ、OVA 投与群では、経口投与 30 分後の血清から OVA が平均 206.165ng/mL の濃度で検出され、体内への吸収が確認された。一方、 ω -5 グリアジン投与群では、経口投与 30 分、60 分ともに血清中からは検出されなかった。 ω -5 グリアジンの検出系については、さらに検討が必要だと考えられた。

本研究により、 ω -5 グリアジンはプロラミンに分類される不溶性タンパク質であるにもかかわらず、茹でることによって溶出することが明らかとなった。 ω -5 グリアジンはアミノ酸配列が明らかとなっており、システイン残基を持たないため、生地作製時に他のタンパク質と S-S 結合を形成しない。そのため、茹でる操作で水中に溶出したのではないかと考えられた。その結果、うどんはわずかながら低アレルゲン化されており、同量の小麦粉を含むパンと比較すると症状が出にくいのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山田千佳子, 野坂匠, 内藤宙大, 横大路智治, 松尾裕彰, 河合菜月, 門間敬子, 成田宏史, 和泉秀彦
2. 発表標題 小麦生地茹で時に溶出するタンパク質の解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田千佳子, 野坂匠, 内藤宙大, 横大路智治, 松尾裕彰, 岡本(河合)菜月, 平川由紀, 門間敬子, 成田宏史, 和泉秀彦
2. 発表標題 小麦生地茹で時における α -5グリアジンの挙動解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2022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
---------	---------