

# 名古屋学芸大学大学院

## 論文要旨

2017 年度入学

栄養科学研究科 博士後期課程

栄養科学専攻

学籍番号 17201102

氏名 内藤宙大 印

### [論文題目]

牛乳加工食品中の主要アレルゲンの性状解析

(論文題目が外国語の場合は、和訳を付記すること。)

### [要旨]

#### 背景および目的

自然寛解が得られなかったアレルギーの遷延する患者においては経口免疫療法 (OIT) が行われている。牛乳アレルギーに対する OIT (CM-OIT) には、患者や保護者の負担を軽減するために牛乳加工食品も取り入れながら施行したいが、牛乳加工食品のアレルゲン性は明らかではない。そこで、CM-OIT を受ける重症牛乳アレルギー患者の主要アレルゲンを同定し、牛乳加工食品におけるそのアレルゲンの性状を解析した。

#### 研究 1

CM-OIT を施行した牛乳アレルギー患者 39 名を対象に、OIT 前後に経口負荷試験および採血を行った。血清中の  $\alpha$ -ラクトアルブミン ( $\alpha$ -LA)、および  $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -LG) 特異的 IgE 抗体価は ImmunoCAP® で測定した。 $\alpha$ <sub>S1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -カゼイン (CN) 特異的 IgE 抗体価は ELISA で測定した。経口負荷試験の結果、牛乳摂取可能量は CM-OIT に伴い有意に増加した。CM-OIT 開始前の特異的 IgE 抗体価は  $\alpha$ <sub>S1</sub>-および  $\beta$ -CN が高値を示し、CM-OIT に伴い有意に低下した。 $\alpha$ -LA、 $\beta$ -LG、および  $\kappa$ -CN 特異的 IgE 抗体価に有意な変化はみられなかった。また、 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN 特異的 IgE 抗体価が牛乳摂取可能量と最も強い相関を示した。さらに、牛乳アレルギー陰性のドナー由来の好塩基球を患者血清で受動感作し、好塩基球活性化試験を行った。活性化の指標として CD63 および CD203c を用い、それらの発現量の高い細胞 (high) の割合 (%) と平均蛍光強度 (MFI) を解析した。その結果、受動感作好塩基球は  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN 刺激により活性化し、CD63<sup>high</sup> および CD203c<sup>high</sup> の割合、並びに MFI は CM-OIT に伴って有意に低下した。以上の結果から、CM-OIT を受ける重症牛乳アレルギー患者にとって  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN が主要アレルゲンの一つであることが明らかとなった。そのため、研究 2 および 3 では牛乳加工食品中のタンパク質の性状を特に  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN に焦点を当て解析した。

#### 研究 2

牛乳加工食品である、市販ヨーグルト 2 種 (*Bifido. Longum*, ヨーグルト A; *Lb. bulgaricus* + *Str.*

*thermophilus*, ヨーグルト B) および市販チーズ 5 種 (セミハード、ハード、ホワイト、ブルー、およびフレッシュ) を試料に用いた。試料を凍結乾燥し、PBS、SDS+urea 溶液、2-ME 溶液を用いてタンパク質を抽出した。抽出した試料は SDS-PAGE、イムノブロット、および阻害 ELISA にて解析した。抗体には抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清と牛乳アレルギー患者血清を使用した。その結果、牛乳およびヨーグルト A・B 中のタンパク質は、PBS 抽出画分にて検出された。タンパク質組成の解析と IgE 抗体に認識されるタンパク質の検出を試みたが、いずれの解析方法においても牛乳およびヨーグルト A・B 間に違いはみられなかった。セミハードおよびハードタイプのチーズは、SDS-PAGE およびイムノブロットにおいてタンパク質の分解断片が検出された。さらに、セミハードおよびハードタイプのチーズ中の  $\alpha_{S1}$ -CN やその分解断片は不溶性画分で検出されたため、阻害 ELISA にて検出される可溶性の  $\alpha_{S1}$ -CN の総量 (抗原性) は牛乳よりも少なかった。一方で、ホワイトおよびブルータイプのチーズはイムノブロットにおいて分解断片まで検出されたが、ほとんどが可溶性画分で検出されたため、 $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性は牛乳よりも高かった。熟成期間を持たないフレッシュタイプのチーズは、未分解の  $\alpha_{S1}$ -CN は牛乳よりも多く検出されたが、そのほとんどが不溶性画分で検出されたために、 $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性は牛乳よりも低かった。ヒト IgE 抗体によって認識されるタンパク質は、セミハードおよびハードタイプのチーズでは全体的に減少していた。

### 研究 3

スキムミルク (SM) と副食材 (スターチ, S; グルテン, G) を混捏したもの (SM-NBM, S-NBM, または G-NBM) と、NBM をオープンにて焼成 (180°C, 10 分) したもの (SM-BM, S-BM, または G-BM) を試料に用いた。試料を凍結乾燥し、PBS、SDS+urea 溶液、2-ME 溶液を用いてタンパク質を抽出した。抽出した試料は SDS-PAGE、イムノブロット、および阻害 ELISA にて解析した。いずれの試料においても焼成することで、IgG 抗体およびヒト IgE 抗体を使用した阻害 ELISA にて検出される  $\alpha_{S1}$ -CN は減少した。その後、不溶性画分について SDS-PAGE およびイムノブロットにて解析した。S-BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN は 2-ME 溶液抽出画分で検出されなかったが、SM-BM および G-BM 中では 2-ME 溶液抽出画分から検出された。また、G-BM 中のグルテンの割合を増加させた結果、PBS 抽出画分の  $\alpha_{S1}$ -CN および牛乳タンパク質は減少した。以上の結果から、 $\alpha_{S1}$ -CN は焼成することで不溶化し、抗原性および IgE 抗体結合能が低下するが、特にグルテンと共に混捏・焼成することでより抗原性が低下することが示唆された。

### 結論

CM-OIT を受けるような重症牛乳アレルギー患者において、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価が最も牛乳摂取可能量を反映したことから、牛乳タンパク質の中でも  $\alpha_{S1}$ -CN が主要アレルゲンの一つであることが明らかとなった。そこで、牛乳加工食品中のタンパク質の性状を  $\alpha_{S1}$ -CN を中心に解析した。牛乳は加工することで、必ずしも IgE 抗体結合能が低下するということはなく、IgE 抗体に認識されるタンパク質の組成が牛乳とほとんど変わらないヨーグルトや、 $\alpha_{S1}$ -CN の割合が多くなっているホワイトおよびブルータイプのチーズは、CM-OIT の対象となるような重症牛乳アレルギー患者は注意して摂取する必要がある。一方で、セミハードおよびハードタイプのチーズ、ならびにグルテンと混捏・焼成した BM においては、 $\alpha_{S1}$ -CN の分解や不溶化が生じており、牛乳よりは安全に摂取できると考えられる。