

博士学位論文

牛乳加工食品中の主要アレルゲンの性状解析

2020年2月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

内藤 宙大

# 目次

第1章 緒論	1
第2章 重症牛乳アレルギー患者における主要アレルゲンの同定	11
2-1 目的	11
2-2 対象者および方法	12
2-3 結果	23
2-4 考察	29
第3章 市販乳製品中の主要アレルゲンの性状解析	32
3-1 目的	32
3-2 実験材料および方法	33
3-3 結果	39
3-4 考察	46
第4章 副食材を伴う焼成による主要アレルゲンの性状の変化	48
4-1 目的	48
4-2 実験材料および方法	49
4-3 結果	51
4-4 考察	56
第5章 総合考察	58
参考文献	61
謝辞	71

## 略語

ALP	alkaline phosphatase
ANOVA	analysis of variance, 分散分析
APC	allophycocyanin
BAT	basophil activation test, 好塩基球活性化試験
BM	baked milk, ベイクドミルク
BSA	bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
CBB	Coomassie <sup>®</sup> Brilliant blue R250
CD	cluster of differentiation
CN	casein
CRTH2	chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells
Cy	cyanin
Da	dalton
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸
FITC	fluorescein isothiocyanate
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IC50	half maximal (50%) inhibitory concentration
Ig	immunoglobulin, 免疫グロブリン
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -lactalbumin
$\beta$ -LG	$\beta$ -lactoglobulin
2-ME	2-mercaptoethanol
MFI	mean fluorescence intensity, 平均蛍光強度
NC	negative control, 陰性対照
OIT	oral immunotherapy, 経口免疫療法
OVA	ovalbumin
PAS	periodic acid-Schiff, 過ヨウ素酸シッフ
PBS	phosphate buffered saline

PBS-T	PBS + 0.05% Tween20
PC	positive control, 陽性対照
PC7	PE/Cy7
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PFBB	Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer
PFBB-T	PFBB + 0.05% Tween20
PNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphate, <i>p</i> -ニトロフェニルリン酸
POD	peroxidase
PVDF	polyvinylidene difluoride
QOL	quality of life, 生活の質
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE-HPLC	size exclusion-high performance liquid chromatography, サイズ排除（ゲル濾過）クロマトグラフィー
SM	skim milk
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	TBS + 0.1% Tween20
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Tris	[Tris(hydroxymethyl)aminomethane]

## 第1章 緒論

### 食物アレルギーとは

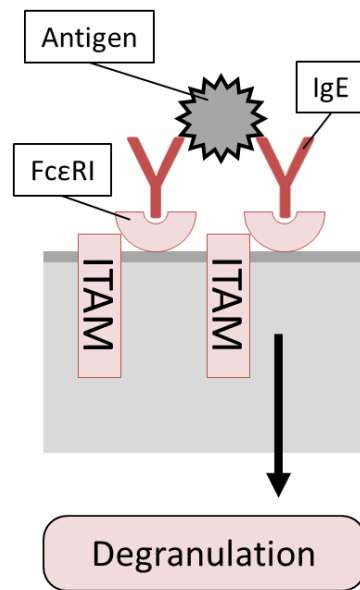
アレルギー反応は4型に分類され、食物アレルギーはI型アレルギーに分類される (Gell と Coombs, 1963)。食物アレルギーは、「原因食品を摂取した後に免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義されている (Boyce ら, 2010)。さらに、食物アレルギーはその臨床型によっても分類することができる (厚生労働科学研究班, 2015; Ebisawa ら, 2017) (Table 1)。最も典型的な食物アレルギーの臨床型が即時型であり、その機序はIgE依存性である。発症機序は、活性化したB細胞から産生されたIgE抗体と、肥満細胞もしくは好塩基球上のFcεレセプターI (FcεRI) が結合する (感作)。そして感作成立後、再びアレルゲンが侵入し、肥満細胞もしくは好塩基球上のIgE抗体に架橋結合することで細胞が脱顆粒し、ヒスタミンやロイコトリエンなどが放出され諸症状を引き起こす (Renz ら, 2018) (Fig. 1)。

原因となるアレルゲンのほとんどがタンパク質であり、これまでに様々な食品においてアレルゲンが同定されてきた。一般的に、アレルゲンは水・塩溶性であり (日本小児アレルギー学会, 2018)、ヒトのIgE抗体に認識されるアミノ酸配列 (エピトープ) を持つ。エピトープには、連続したアミノ酸配列を認識する連続性エピトープと、立体構造をとることで近接した不連続のアミノ酸を認識する構造的エピトープが存在する。これらの溶解性やエピトープとなるアミノ酸配列はアレルゲンとなるタンパク質によって異なる。

**Table 1.** Clinical type of food allergy

Clinical type	Age of onset	Common causative foods	Acquisition of tolerance (remission)	Possibility of anaphylactic shock	Mechanism of food allergy
Neonatal and infantile gastrointestinal allergy	Neonatal period Infancy	Cow's milk (baby formula)	Mostly remittable	(±)	Mainly non-IgE mediated type
Infantile atopic dermatitis associated with food allergy	Infancy	Hen's egg, cow's milk, wheat, soybean, etc.	Mostly remittable	(+)	Mainly IgE mediated type
Immediate-type food allergy (urticaria, anaphylaxis, etc.)	Infancy adulthood	Infancy to young child: Hen's egg, cow's milk, wheat, buckwheat, fish, peanut, etc. School-aged children to adults: Crustacean, fish, wheat, fruit, buckwheat, peanut, etc.	Hen's egg, cow's milk, wheat, soybean, etc. are mostly remittable. Other allergens are mostly less remittable	(++)	IgE-mediated type
Special type	School age adulthood	Wheat, Crustacean, etc.	Less remittable	(+++)	IgE-mediated type
Food-dependent-exercise induced anaphylaxis (FDEIA)	Infancy adulthood	Fruit, vegetable, etc.	Less remittable	(±)	IgE-mediated type
Oral allergy syndrome (OAS)					

Adapted from Ref. Ebisawa, et al. (2017).



**Figure 1. A schematic model of basophil activation by IgE**  
Abbreviation; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif.  
Adapted from Ref. Renz, et al. (2018).

## 牛乳タンパク質の特徴

牛乳中のタンパク質は、pH4.6付近で沈殿するカード(curd)とその上清のホエイ(whey)に大別される (Restani ら, 2009) (Table 2)。カードに含まれるカゼイン (CN) 画分は牛乳タンパク質の約 80%を占める。CN 画分は 4 つのコンポーネント ( $\alpha_{S1}$ -、 $\alpha_{S2}$ -、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN) からなり、牛乳中では 30~300nm の粒径を持つミセルとして存在する (Waugh ら, 1970; 小野, 2005)。これらのコンポーネントは全く異なるタンパク質であり、コンポーネント間の相同性は低く (Table 3)、それぞれのもつ特性は異なる。 $\alpha_{S1}$ -および  $\alpha_{S2}$ -CN は、0.4M 塩化カルシウムに対して不溶性の画分であり、0.4M 塩化カルシウムに対して可溶性の画分が  $\kappa$ -CN である。 $\beta$ -CN は 3.3M 尿素に可溶性であり、1.7M 尿素に不溶性の画分と定義される (仁木と有馬, 1984)。 $\alpha_{S1}$ -CN (Bos d 9) は、199 残基からなるタンパク質であり、8 残基のリン酸化 Ser を持つ (Ah-Leung ら, 2006) (Fig. 2A)。また、Cys を持たず Pro を 17 残基持つことから立体構造をとりにくいと考えられている (仁木と有馬, 1984)。 $\alpha_{S2}$ -CN (Bos d 10) は、207 残基からなるタンパク質であり、11 残基のリン酸化 Ser と 2 残基の Cys を持つ (Ah-Leung ら, 2006; König ら, 2017) (Fig. 2B)。 $\beta$ -CN (Bos d 11) は、209 残基からなるタンパク質であり、5 残基のリン酸化 Ser を持つ (Ah-Leung ら, 2006; Järvinen ら, 2012) (Fig. 2C)。また、 $\alpha_{S1}$ -CN と同様に Cys を持たず、さらに Pro を 35 残基持つことから立体構造をとりにくいと考えられている (仁木と有馬, 1984)。 $\kappa$ -CN (Bos d 12) は、169 残基からなるタンパク質であり、2 残基の Cys と糖鎖を持つ (Bai ら, 2011; Järvinen ら, 2012) (Fig. 2D)。 $\alpha_{S1}$ -、 $\alpha_{S2}$ -、および  $\beta$ -CN は 5mM 以上のカルシウムが存在すると凝集沈殿するが、 $\kappa$ -CN はこれらの凝集体を可溶化する働きを持ち、ミセルの外側を覆うように存在する。Ito ら (2012) は自然寛解に至らず、遷延する牛乳アレルギー患者は CN 特異的 IgE 抗体価が高いことを示した。また、これらのコンポーネントの IgE エピトープはこれまでに報告されてきた (Spuergin ら, 1996; Nakajima-Adachi ら, 1998; Chatchatee ら, 2001a; Chatchatee ら, 2001b; Busse ら, 2002; Cerecedo ら, 2008; Cong ら, 2013)。

牛乳タンパク質の約 20%がホエータンパク質であり、その約半分が  $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -LG)、約 20%が  $\alpha$ -ラクトアルブミン ( $\alpha$ -LA) である。 $\alpha$ -LA (Bos d 4) は、123 残基からなるタンパク質であり、分子内に 8 残基の Cys を持ち、それらが 4 組のジスルフィド (SS) 結合 (アミノ酸 6-120、28-111、61-77、73-91) を形成する (Hochwallner ら, 2010) (Fig. 2E)。 $\beta$ -LG (Bos d 5) は、162 残基からなるタンパク質であり、分子内に 5 残基の



Cys を持ち、そのうち 4 つが SS 結合（アミノ酸 66-160、106-119）を形成し立体構造をとる（Halliday ら, 1991）（Fig. 2F）。

**Table 2.** Cow's milk proteins

Protein name	IUIS name	Conc. (g/L)	AA length	MW (kDa)	pI
$\alpha$ -Lactalbumin	Bos d 4	1 - 1.5	123	14.2	4.8
$\beta$ -Lactoglobulin	Bos d 5	3 - 4	162	18.3	5.3
Serum albumin	Bos d 6	0.1 - 0.4	583	67	4.9 - 5.1
Immunoglobulin	Bos d 7	0.6 - 1.0	—	160	—
Caseins	Bos d 8	—	—	20 - 30	—
$\alpha_{S1}$ -Casein	Bos d 9	12 - 15	199	23.6	4.9 - 5.0
$\alpha_{S2}$ -Casein	Bos d 10	3 - 4	207	25.2	5.2 - 5.4
$\beta$ -Casein	Bos d 11	9 - 11	209	24	5.1 - 5.4
$\kappa$ -Casein	Bos d 12	3 - 4	169	19	5.4 - 5.6

Abbreviations; IUIS, International Union of Immunological Societies; Conc., concentration; AA, amino acid; MW, molecular weight; pI, isoelectric point.  
Adapted from Ref. Restani, et al. (2009).

**Table 3.** Sequence homology between bovine caseins (expressed as percentage)

	$\alpha_{S2}$ -Casein	$\beta$ -Casein	$\kappa$ -Casein
$\alpha_{S1}$ -Casein	7	4	4
$\alpha_{S2}$ -Casein	—	5	5
$\beta$ -Casein	—	—	7
$\kappa$ -Casein	—	—	—

performed by DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>).

(A)  $\alpha_{s1}$ -Casein

1 RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIG**SE**STE 50  
P P

DQAMEDIKQMEAE**SISSS**EEIVPN**S**VEQKHIQKEDVPSERYLGTLEQLLR 100  
P PPP P

LKKYKVPQLEIVPN**S**AEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELF 150  
P

RQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMLPW 199

(B)  $\alpha_{s2}$ -Casein

1 KNTMEHV**SSS**EE**SI**SQETYKQEKMAINPSKENL**C**ST**F**C**KE**VVRNANEE 50  
PPP P S S

EYSIG**SSS**EE**S**AEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQFYQKFPQYLQYLY 100  
PPP P

QGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQL**ST**SEENSKKTVDME**S**TEVF**T**KK 150  
P P P

TKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQAAMK**P**WIQ**P**KT**K**V 200

IPYVRYL 207

(C)  $\beta$ -Casein

1 RELEELNVPGEIVE**SLSSS**EE**S**ITRINKKIEKFQ**S**EEQQQTEDELQDKIH 50  
P PPP P

PFAQTQSLVYFPFGPIPN**S**LPQNI**P**PL**T**QTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKE 100

AMAPKHKEMPFPKYPVEPF**T**ESQSL**T**LDVENLHLPL**L**LQSWMHQ**P**HQ**P** 150

LPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQ**R**DM**P**IQA**F**LLYQ**E**PVLGP 200

VRGPFPIIV 209

### (D) $\kappa$ -Casein

```
1  QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVAL  50
      S
    INNQFLPYPYAKPAAVRSQAQILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMARHPH  100
      S
    PHLSEMAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSP  150
      ▲                               G G G                               P
    EVIESPPEINTVQVTSTAV  169
```

### (E) $\alpha$ -Lactalbumin

```
1  EQLTKCEVFRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFHSTSGYDTQAIVQNNDSTEY  50
      S                               S
    GLFQINNKIWCKDDQNPSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKKILDKVG  100
      S           S   S           S
    INYWLAKKALCSEKLDQWLCEKL  123
      S           S
```

### (F) $\beta$ -Lactoglobulin

```
1  LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTP  50
    EGDLEILLQKWENDECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYK  100
      S
    KYLLFCMENSAEPEQSLVCQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLS  150
      S           S   S
    FNPTQLEEQCHI  162
      S
```

A:Ala B:Asx C:Cys D:Asp E:Glu F:Phe G:Gly H:His I:Ile K:Lys  
L:Leu M:Met N:Asn P:Pro Q:Gln R:Arg S:Ser T:Thr V:Val W:Trp  
Y:Tyr Z:Glx  
P: phosphorylated S: sulfhydryl group G: glycosylated ▲: chymosin active site

### Figure 2. Amino acid sequences of major milk proteins

Amino acid sequences of  $\alpha$ <sub>1</sub>-casein (A),  $\alpha$ <sub>2</sub>-casein (B),  $\beta$ -casein (C),  $\kappa$ -casein (D),  $\alpha$ -lactalbumin (E), and  $\beta$ -lactoglobulin (F).

## 牛乳アレルギーの実態

世界的に、牛乳は乳幼児期における食物アレルギーの主要な原因食品の一つである (Skripak ら, 2007; Schoemaker ら, 2015)。

わが国における即時型食物アレルギーの実態調査は消費者庁 (2019) により行われている。平成 14 (2002) 年から 3 年ごとに実施され、経年評価のため調査の協力医師、調査対象および方法は変わらず行われている。最近では、平成 29 (2017) 年 1 月から 1 年間にわたって実施され、4851 名が解析対象となった。年齢別発症頻度は 0 歳が 1530 名で 31.5% を占め、1 歳が 18.0%、2 歳が 10.1% であり、加齢に伴い減少した。原因食物の割合は、鶏卵が 34.7% と最も多く、以下、牛乳が 22.0%、小麦が 10.6% と続いた。

症状が初発 (新規発症) によるものか、誤食によるものかの記入があった 4781 名について年齢群別解析も行われた。初発において、0 歳群では鶏卵が 55.6%、牛乳が 27.3%、小麦が 12.2% であった。1-2 歳群では牛乳が 8.7% で、原因食物の第 4 位であった。しかし、3-6 歳群以降の年齢群において、牛乳は 5 位以内に入ることがなかった。このように、牛乳アレルギーは乳幼児期に自然寛解しやすいことが分かる。一方で、牛乳の誤食によるものは 0 歳群で 31.1%、1-2 歳群で 37.7%、3-6 歳群で 29.9%、7-17 歳群で 21.4%、18 歳以上群で 6.7% であり、それぞれ原因食物の第 2 位、2 位、1 位、2 位、4 位であった。このように、誤食によるアレルギー発症の原因食品において牛乳の割合が高いことから、牛乳の食事管理は難しいことが明らかである。

## 食物アレルギーの管理と課題

食物アレルギーの管理は、原因食品を除去する食事管理が第一選択である。しかし、現状では、不必要な食物除去を行い患児の成長上の問題を引き起こし (柳田と箕浦, 2013)、患児やその保護者の QOL の低下を招くことが報告されている (長谷川ら, 2011)。牛乳アレルギーの食事管理も同様であり、牛乳はリン酸カルシウム含量が高いため (文部科学省, 2018)、牛乳を除去していたアレルギー患者において、身長への影響や骨密度の低下が報告されている (Mukaida ら, 2010; Nachshon ら, 2014; Jensen ら, 2004)。これらの問題を少しでも緩和するために、食物アレルギー診療ガイドラインでは栄養食事指導の原則として「必要最小限の除去」、「安全性の確保」、「栄養面への配慮」、「患者家族の QOL 維持」の 4 つのポイントが示されている (日本小児アレルギー学会, 2018)。さらに最近では、上記の問題を解決するために原因食品の除去ではなく、牛乳を摂取できるように治療する傾

向がある。

消費者庁による食物アレルギーの実態調査から、牛乳アレルギーは自然寛解しやすいことが分かる。一方で、自然寛解が得られずアレルギーが遷延する患者においては経口免疫療法 (oral immunotherapy、OIT) が行われている。OIT は「自然経過では早期に耐性獲得が期待できない症例に対して、事前の食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認した後に原因食物を医師の指導のもとで経口摂取させ、閾値上昇または脱感作状態とした上で、究極的には耐性獲得を目指す治療法」と定義される (日本小児アレルギー学会, 2018)。

OIT は、施行可能な病院にて入院治療し、その後は家庭での原因食品の摂取が継続される。摂取の継続には、患者やその保護者の負担を軽減するために加工食品を取り入れることもあり、原因食品中のタンパク質量が同等以下であればいずれの加工食品でも摂取できるとされている。しかし、タンパク質は加工に伴い酵素分解や構造変化を受け、その変化はタンパク質によって異なるため (Verhoeckx ら, 2015)、加工食品中のアレルゲン性はタンパク質量だけでは判断できないと考えられる。

牛乳タンパク質の化学的特徴は前述の通りそれぞれ異なり、加工による影響はタンパク質ごとに検討する必要がある。さらに、同じ食品でも病型や年齢といった患者背景によって感作しているアレルゲンが異なるため、そのアレルゲンを同定する必要がある。例えば、小麦アレルギーにおいて、パン職人喘息とされる病型の主要アレルゲンは  $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビターであり (Baur X と Posch A, 1998)、食物依存性運動誘発アナフィラキシーの病型の主要アレルゲンは  $\omega$ 5-グリアジンである (Morita ら, 2003; Yokooji ら, 2015)。このように、牛乳加工食品を牛乳アレルギーに対する OIT (OIT for cow's milk allergy、CM-OIT) に利用するためには、CM-OIT の治療効果のマーカーとなるアレルゲンと、そのアレルゲンの牛乳加工食品中における溶解性や構造などの性状を明らかにする必要がある。

また、Sato ら (2014) は、OIT の治療効果を評価するために鶏卵、牛乳、および小麦アレルギー患者において、同じ方法で OIT を実施した。その結果、治療開始 1 年後に耐性獲得に達した割合は鶏卵では約 40%、牛乳では約 11%、小麦では約 47%であり、治療開始 2 年後には鶏卵では約 61%、牛乳では約 27%、小麦では約 83%であった。このように、CM-OIT は鶏卵や小麦アレルギーに対する OIT と比べ治療成績が悪いことが示唆された。この原因として、鶏卵はゆで卵、小麦はうどんが OIT に用いられるのに対して、牛乳のみ液体であることや、未加工であることなど様々な要因が考えられ、牛乳そのものを治療に用

いるよりも牛乳加工食品を用いることで治療効果の向上が期待できると思われる。

そこで、本研究では CM-OIT を受ける重症牛乳アレルギー患者の牛乳摂取可能量のマーカーとなる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溶解性や構造などの性状を解析することを目的とした。さらに、牛乳加工食品が CM-OIT へ応用可能かどうか考察した。

## 第2章 重症牛乳アレルギー患者における主要アレルゲンの同定

### 2-1 目的

OIT は食物アレルギーの一般診療として世界的には一部推奨されているが (Nurmatov ら, 2017)、安全性に不安が残るため、わが国における食物アレルギー診療ガイドラインでは推奨されていない (日本小児アレルギー学会, 2018)。しかし、OIT による治療効果は期待でき、免疫応答の変化も解析されている。ピーナッツアレルギーおよび鶏卵アレルギーに対する OIT に伴う免疫応答の変化を解析した研究では、特異的 IgE 抗体は減少し、特異的 IgG4 抗体は増加することが報告された (Jones ら, 2009; Sugimoto ら, 2016)。同様に、CM-OIT を解析した研究も治療効果を示したとの報告がある (Keet ら, 2012; Elizur ら, 2016; Perezábad ら, 2017)。それらの報告における免疫応答の解析は、いずれも牛乳粗抗原、CN 画分、もしくはホエータンパク質に対して行われている。Ito ら (2012) が報告したように、重症牛乳アレルギー患者は主に CN 画分に感作していると予想される。一方で、CN 画分の構成成分 (CN コンポーネント) である  $\alpha_{S1}$ 、 $\alpha_{S2}$ 、 $\beta$ 、および  $\kappa$ -CN のアミノ酸配列、分子量、および溶解性などの化学的特徴は大きく異なり、牛乳加工食品中における性状も異なると予測される。しかし、各 CN コンポーネントに対する免疫学的変化に焦点を当てた研究はほとんどない。したがって、本章では、重症牛乳アレルギー患者の牛乳摂取可能量のマーカーとなるアレルゲンを同定することを目的とし、CM-OIT に伴う CN コンポーネント特異的 IgE 抗体価の変化を解析した。

さらに、この特異的 IgE 抗体価の変化が症状誘発に及ぼす影響について確認するために、特異的抗体産生後の免疫応答を解析した。免疫応答の解析にはヒスタミン遊離試験 (Histamine Release Test、HRT) や好塩基球活性化試験 (Basophil Activation Test、BAT) が行われている。細胞レベルや動物レベルでの評価には HRT がよく行われているが、臨床現場では BAT の方がアレルギー症状と高い相関を示したと報告されている (Nagao ら, 2008)。そこで、本研究では BAT を選択し抗原刺激による免疫応答を解析した。

## 2-2 対象者および方法

### 対象者

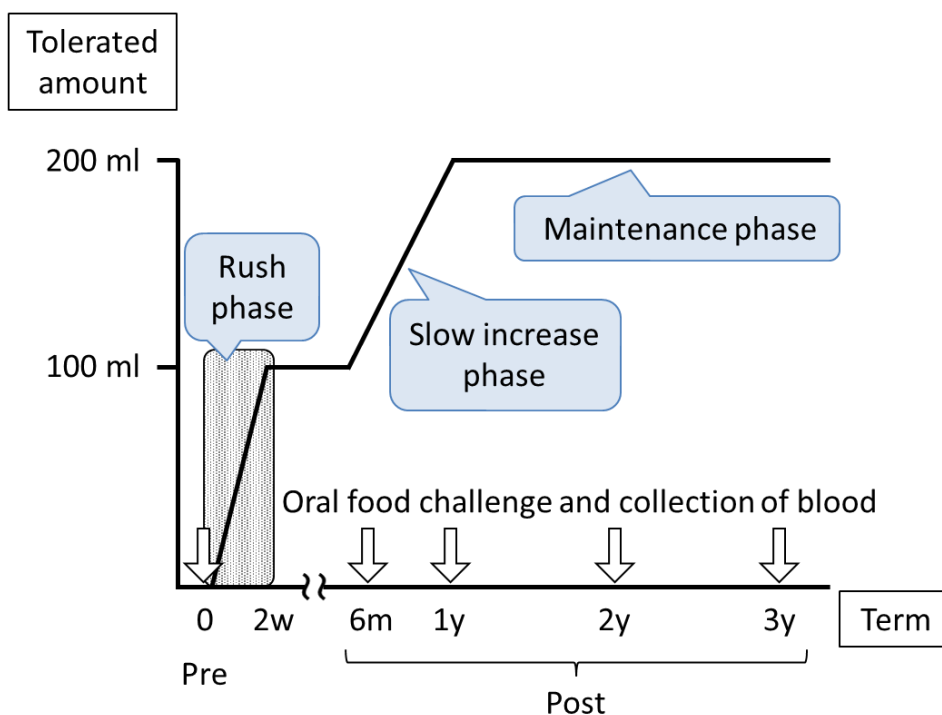
2011年4月から2017年3月までにあいち小児保健医療総合センターを受診した39名を対象とした。対象者背景をTable 4に示す。対象者は、自然経過にて牛乳アレルギーを寛解せず5歳を超えても牛乳アレルギーが残り、OIT開始前6ヵ月以内に、牛乳5ml以下を閾値とする明らかな即時型症状を認めた。以上の背景をもつ対象者を、本研究では重症牛乳アレルギー患者とした。

CM-OITはあいち小児保健医療総合センターで施行された。CM-OITは12日間の入院治療を行う急速期 (rush phase) と、自宅で行う緩徐増量期 (slow increase phase)、および維持期 (maintenance phase) から構成される (Fig. 3)。CM-OIT開始前 (pre) と、開始後6ヵ月 (6m)、1年 (1y)、2年 (2y)、および3年 (3y) 時点で食物経口負荷試験および採血を行った。総IgE、並びに牛乳粗抗原、CN、 $\alpha$ -LA、および $\beta$ -LG特異的IgE抗体価はImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) にて測定した。

**Table 4.** Participants' backgrounds (n = 39)

Gender (male), n (%)	25 (64.1%)
Median age at the start of OIT, years (range)	8 (6 - 10)
Median eliciting dose at CM oral challenge, ml (range)	2.0 (2.0 - 5.0)
Symptoms at CM oral challenge before OIT start	
Atopic dermatitis, n (%)	35 (89.7%)
Asthma, n (%)	24 (61.5%)
Anaphylaxis, n (%)	32 (82.1%)





**Figure 3. A schematic model of oral immunotherapy protocol for cow's milk allergy in Aichi Children's Health and Medical Center**

Arrow shows points of oral food challenge and collection of blood. Abbreviations: w, weeks; m, months; y, years.

## カゼインコンポーネントの精製

### i. $\alpha_{s1}$ -、 $\beta$ -、および $\kappa$ -カゼインの分離

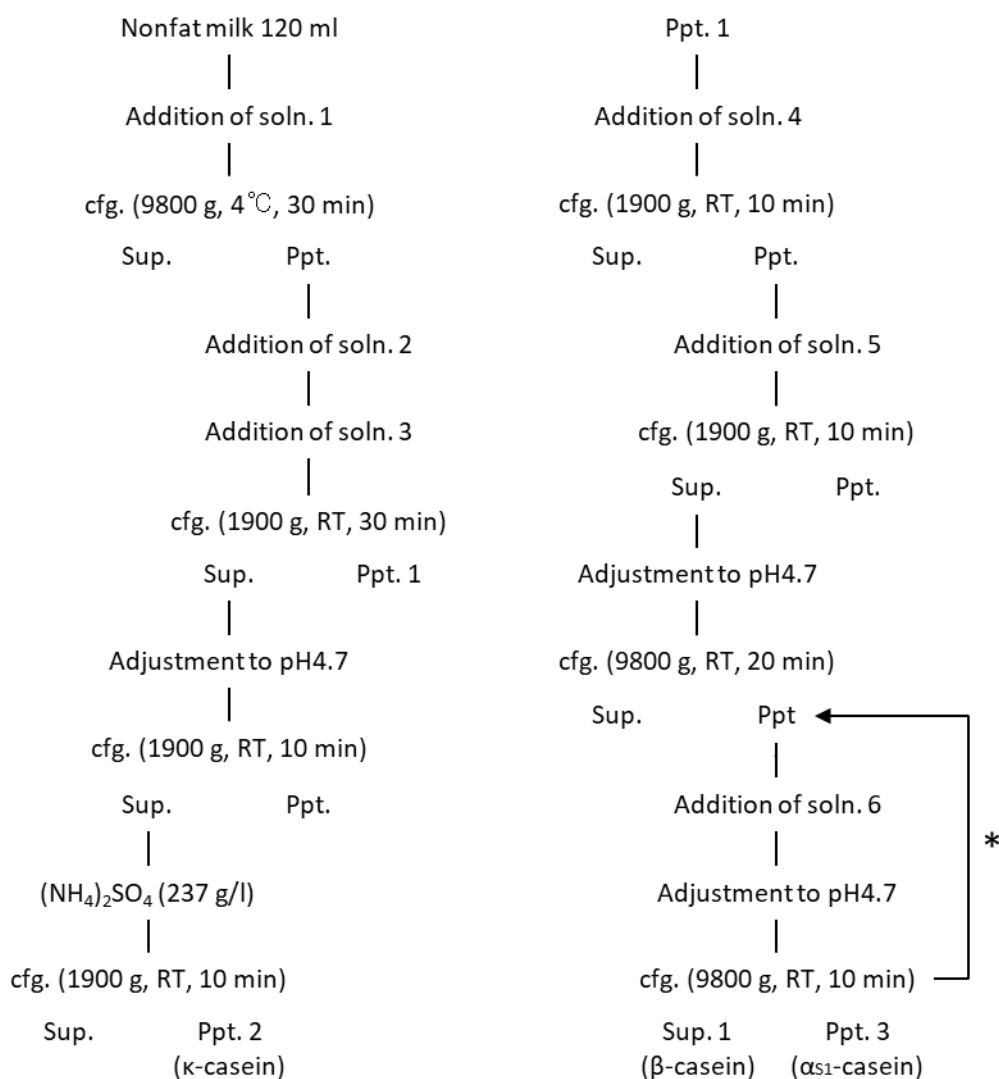
$\alpha_{s1}$ -、 $\beta$ -、および $\kappa$ -CNは無脂肪乳（森永のおいしい無脂肪乳、森永乳業）から精製した。精製方法は Igarashi (1999)の方法を一部改変し行った (Fig. 4)。初めに、無脂肪乳 120ml に 4M チオシアン酸ナトリウム 40ml、99.5% エタノール 160ml、および 0.75M 塩化カルシウム (50% エタノール) 80ml を加え、4°C で 30 分間攪拌後、遠心分離 (9,800×g、4°C、30 分) によって残渣を得た。その残渣を 4M 尿素および 0.04M 塩化ナトリウムを含む 0.03M EDTA (pH7.8) 200ml で溶解し、2-メルカプトエタノール (2-ME) を 2ml 添加し、室温で 1 時間攪拌した。その後、0.2M リン酸水素二ナトリウム 10ml および 2M 塩化カルシウム 2.5ml を交互に半量ずつ添加した後、遠心分離 (1,900×g、室温、30 分) によって上清と残渣 1 (Ppt. 1) に分離した。上清を 6N 塩酸にて pH 4.7 に調整し、遠心分離 (1,900×g、室温、10 分) 後の上清に硫酸アンモニウムを加えた。再び遠心分離 (1,900

×g、室温、10分) し残渣 2 (Ppt. 2 ;  $\kappa$ -CN) を回収し、4M 尿素を含む 0.1M リン酸二水素アンモニウム (pH7.8) 5ml で溶解した。残渣 1 (Ppt. 1) を、4M 尿素を含む 0.03M EDTA (pH7.8) 5ml および 3.2M 硫酸アンモニウム (pH4.7) 5ml で溶解し、遠心分離 (1,900×g、室温、10分) によって残渣を得た。残渣に純水 5ml 加え溶解した後、さらに 99.5% エタノール 5ml を加え、遠心分離 (1,900×g、室温、10分) によって上清を得た。その上清を 3N 塩酸で pH4.7 に調製し、遠心分離 (9,800×g、室温、20分) によって残渣を得た。その残渣を、4M 尿素を含む 0.1M リン酸二水素アンモニウム (pH7.8) 5ml で溶解した後、さらに純水 5ml を加えた。3N 塩酸で pH4.7 に調整し、遠心分離 (9,800×g、室温、10分) によって上清 1 (Sup. 1 ;  $\beta$ -CN) を回収した。残渣は再びこの操作を行い (Fig. 4、\*の操作)、得られた残渣 3 (Ppt. 3 ;  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN) を、4M 尿素を含む 0.1M リン酸二水素アンモニウム (pH7.8) 5ml で溶解した。回収した  $\alpha$ <sub>1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN は 3 日間の透析を行った。透析した溶液を凍結乾燥した後、phosphate buffered saline (PBS) で溶解し size exclusion-high performance liquid chromatography (SE-HPLC) により分画した。

SE-HPLC には SephadexG-50 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を充填したゲル濾過カラム (直径 : 2.3cm 全長 : 93cm) を用いた。溶出液はフラクションコレクター (株式会社東洋製作所) により試験管 100 本に 5ml/本で分取した後、波長 280nm の吸光度を分光光度計 UV-1200 (株式会社島津製作所) で測定した。分画分取した溶液を 3 日間透析したものを精製  $\alpha$ <sub>1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN とした。精製  $\alpha$ <sub>1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN は凍結乾燥させ試料に用いた。精製  $\alpha$ <sub>1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN の純度は Bradford 法、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)、およびイムノブロットにて評価した。

## ii. Bradford 法によるタンパク質の定量

Protein Assay Bradford Reagent (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて、その説明書に準じて行った。96 穴マイクロプレート (Nunc-Immuno™ Plate II, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) に標準溶液または試料を 150 $\mu$ l 入れ、その後 Protein Assay Bradford Reagent を 150 $\mu$ l 加え、室温で 10 分間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダー SH-1000 (コロナ電気株式会社) にて波長 595nm における吸光度を測定した。標準溶液は BSA (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いた。タンパク質の純度が 90%以上の  $\alpha$ <sub>1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN を本研究に用いた。



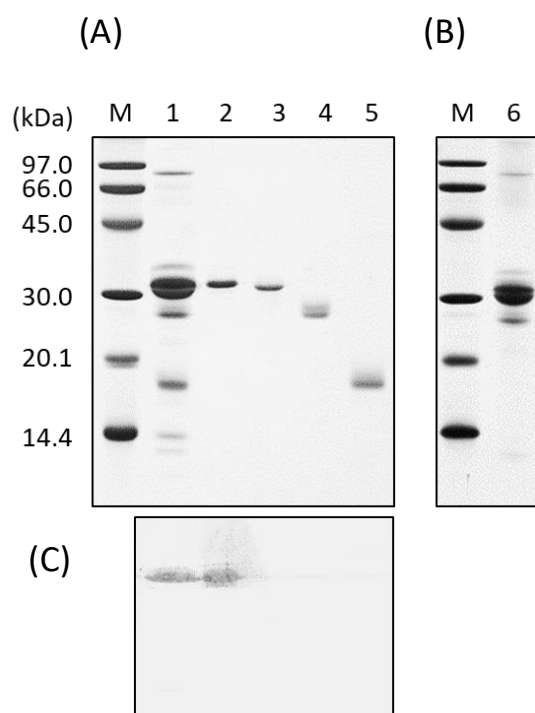
Soln. 1: Ethanol 160 ml, 4M NaSCN 40 ml, and 0.75M CaCl<sub>2</sub> (50% ethanol) 80 ml  
 Soln. 2: 4M urea, 0.04M NaCl, and 0.03M EDTA 200 ml  
 Soln. 3: 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 ml and 2M CaCl<sub>2</sub> 2.5 ml  
 Soln. 4: 4M urea and 0.03M EDTA 5 ml and 3.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 ml  
 Soln. 5: Water 5 ml and an equal volume of ethanol  
 Soln. 6: 4M urea and 0.1M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 ml

**Figure 4. Flowchart of method for separation of casein**

Ppt. 2, κ-casein; Sup. 1, β-casein; Ppt. 3, α<sub>s1</sub>-casein. Abbreviations: soln., solution; cfg., centrifugation; Sup., supernatant; Ppt., precipitate.

### iii. SDS-PAGE によるタンパク質組成の解析

SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に従って行った。各試料溶液と 5% 2-ME を含む SDS-PAGE sample buffer を 4:1 (v/v) の割合で混合したものを試料とした。牛乳粗抗原は 10 $\mu$ g、 $\alpha_{S1}$ -、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN、並びに  $\beta$ -LG は 1 $\mu$ g、CN は 6 $\mu$ g になるように供した。解析には、15%ポリアクリルアミドゲルを用い、Coomassie® Brilliant Blue R-250 (CBB) にてタンパク質を染色した (Fig. 5A および B)。



#### Figure 5. SDS-PAGE and immunoblotting of purified $\alpha_{S1}$ -, $\beta$ -, and $\kappa$ -caseins

Purity of the separated  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -caseins (A and C) and casein fraction (B) was confirmed by SDS-PAGE (A and B) and immunoblotting (C) with 15% polyacrylamide gel. Lane M, molecular weight marker; lane 1, cow's milk proteins; lane 2,  $\alpha_{S1}$ -casein; lane 3,  $\beta$ -casein; lane 4,  $\kappa$ -casein; lane 5,  $\beta$ -lactoglobulin; lane 6, casein fraction.

#### iv. イムノプロットによる $\alpha_{S1}$ -カゼインの検出

イムノプロットは Towbin ら (1992) の方法に従って行った。まず、SDS-PAGE 後のゲルからタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (アトー株式会社) に転写した。転写後の PVDF 膜は tris buffered saline (TBS) に 0.1% Tween20 を含む溶液 (TBS-T) にて洗浄し、1% BSA/TBS-T でインキュベート (室温、1 時間) することでブロッキングした。一次抗体として、anti- $\alpha_{S1}$ -CN monoclonal antibody (抗  $\alpha_{S1}$ -CN モノクローナル抗体、CH-007、コスモ・バイオ株式会社) を使用し、1% BSA/TBS-T にて希釈 (1:2000) した溶液中で反応 (4°C、一晩) させた。TBS-T にて 3 回洗浄した後、二次抗体として Peroxidase (POD) -conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Inc., West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA) を 1% BSA/TBS-T にて希釈 (1:10000) した溶液中で反応 (室温、1 時間) させた。TBS-T にて 2 回、TBS にて 2 回洗浄した後、発色試薬として Ez West Blue (アトー株式会社) を用いて  $\alpha_{S1}$ -CN を検出した (Fig. 5C)。

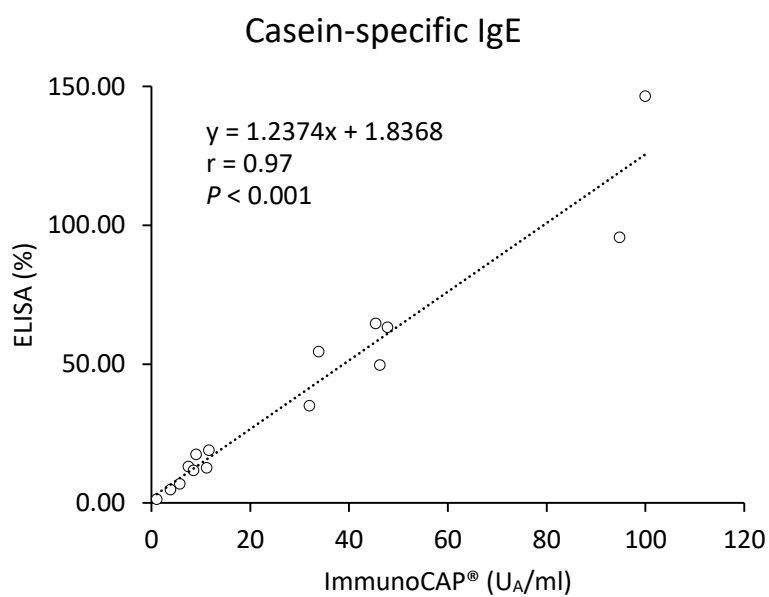
ゲルおよび PVDF 膜は、AE-6933FXES プリントグラフ (アトー株式会社) にて撮影した。

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) による特異的抗体価の測定

$\alpha_{S1}$ 、 $\beta$ 、および  $\kappa$ -CN 特異的 IgE 抗体価は ELISA 法にて測定した。初めに、固相抗原として  $\alpha_{S1}$ 、 $\beta$ 、および  $\kappa$ -CN (10  $\mu$ g/ml PBS) を 96 穴マイクロプレートにコーティングし (100  $\mu$ l/well)、4°C で一晩インキュベートした。プレートを 0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) で 3 回洗浄後、0.05% Tween 20 を含む Pierce™ Protein-Free Blocking Buffer (PFBB-T, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) でブロッキングし (200  $\mu$ l/well)、4°C で 8 時間インキュベートした。患者血清は PFBB-T を用いて 1:10 になるように希釈し、100 $\mu$ l/well 加え 4°C で一晩反応させた。ネガティブコントロール (NC) には PFBB-T を使用した。PBS-T で 3 回洗浄後、二次抗体として alkaline phosphatase (ALP) -conjugated goat anti-human IgE (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) を用い PFBB-T にて 1:1000 になるように希釈し、100 $\mu$ l/well 加え 37°C で 2 時間反応させた。PBS-T で 2 回、PBS で 2 回洗浄後、発色基質である *p*-ニトロフェニルリン酸 (PNPP, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を 100 $\mu$ l/well 加え、15 分反応させた。1N 水酸化ナトリウムを用いて 100 $\mu$ l/well 加えることで反応を停止し、マイクロプレートリーダー SH1000 にて波長 405nm の吸光度を測定した。抗体価は、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE の吸光度が

高値の検体 (subject no. 2、pre) を基準 (100%) とし、それぞれの検体の吸光度を相対値として算定した。各検体の測定は2連で、全て同時に行った。

ELISA の妥当性を評価するために CN 特異的 IgE 抗体価も同様の方法で測定し、ImmunoCAP®で測定された CN 特異的 IgE 抗体価と比較した (Fig. 6)。その結果、強い相関がみられた ( $r = 0.97$ )。



**Figure 6. Comparison of casein-specific IgE levels between ImmunoCAP® and ELISA** Casein-specific IgE levels in available sera ( $n = 15$ ) were plotted.

## 受動感作好塩基球を用いた活性化試験

### i. 免疫グロブリンの剥離

細胞表面上の免疫グロブリンの剥離は、Santos ら (2015a) の報告に準じて行った (Fig. 7A)。牛乳アレルギーのない成人男性由来全血を EDTA-2Na 採血管に採取した。全血 2ml に対し、HA buffer [0.3% ヒト血清アルブミン、10mM HEPES、140mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム (pH7.4)] を 13ml 加え懸濁し、遠心分離 (1500rpm、4°C、7 分) 後に上清を吸引除去した。得られた血球成分に乳酸バッファー [27.8mM 乳酸、140mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム (pH3.9)] を 13ml 加え再懸濁し、静置 (4°C、5 分) することで免疫グロブリンを剥離した。剥離血球は、HA buffer で 2 回洗浄した。

細胞表面上の IgE 抗体の剥離は、細胞表面上の IgE 抗体が減少し、FcεRI の IgE 抗体結合部位が増加していることにより確認した (Fig. 8)。方法は iii に記す。

### ii. 受動感作

剥離血球に対し、その 1/2 量 (v/v) の対象患者血清および 1/2 量 (v/v) の PBS を加えて、37°C で 1 時間培養した後、4°C で一晩培養することで受動感作した。

### iii. 細胞表面抗原の評価

細胞表面上の IgE 抗体の剥離を確認するために、細胞表面上の IgE 抗体および FcεRI (IgE 抗体結合部位および非結合部位) をフローサイトメーター (Gallios; Beckman Coulter) にて検出した。また、T 細胞に発現する CD3、並びに Th2 リンパ球、好塩基球、および好酸球に発現する CRTH2 も検出した。

細胞表面上の IgE 抗体、FcεRI、CD3、および CRTH2 を検出するために、anti-human IgE-PE (BioLegend、San Diego、CA、USA) 2.5μl、FcεRI の IgE 抗体非結合部位と結合する anti-human FcεRIα-PE/Cy7 (Biolegend、San Diego、CA、USA) 2.5μl、FcεRI の IgE 抗体結合部位と結合する anti-human FcεRIα-FITC (バイオアカデミア株式会社) 1μl、anti-human CD3-APC/Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter) 2.5μl、および anti-human CRTH2-PerCP/Cy5.5 (BioLegend) 2.5μl を加え、氷上で 30 分間反応させた。その後の処理は、Allergenecity kit (Beckman Coulter) の説明書に準じて行い、目的抗原をフローサイトメーターにて検出し、その解析には Kaluza ソフトウェア (Beckman Coulter) を使用した。好塩基球は front scatter (FS)<sup>low</sup>、side scatter (SS)<sup>low</sup>、CD3<sup>low</sup>、

CRTH2<sup>high</sup>にてゲーティングした (Fig. 9A、B、および C)。

#### iv. 抗原刺激およびフローサイトメトリー

受動感作血球に対する BAT は、Allergenecity kit (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) および Anti-Hu CD63 APC (CD63-APC, EXBIO, Praha, Vestec, Czech Republic) を用いて、その説明書に準じて行った (Fig. 7B)。まず、受動感作血球 50 $\mu$ l に対し、活性化バッファー50 $\mu$ l、細胞表面抗体 (CD3-PC7/CRTH2-FITC/CD203c-PE および CD63-APC を 2:1 で混和した抗体) 15 $\mu$ l、および  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN (1mg/ml PBS) 10 $\mu$ l を混和し遮光下で反応 (37°C、15 分) させた。 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN に替わって、ポジティブコントロール (PC) として付属の anti-IgE 抗体、または NC として PBS を用いた。Stop solution を 50 $\mu$ l 添加し反応を停止後、Fix and Lyse Solution を 1ml 加え、赤血球の溶血および細胞の固定を行った。PBS にて洗浄した後、0.1% ホルムアルデヒドを含む PBS 溶液で再懸濁した。

細胞表面上の、CD3、CRTH2、CD63、および CD203c は、フローサイトメーターにて検出した。好塩基球の活性化は CD63 もしくは CD203c の発現 (蛍光強度) を指標に用いた (Santos ら, 2015b; Sugiura ら, 2013)。指標は、NC の好塩基球における蛍光強度の上位 5%以上をゲーティングし (CD63<sup>high</sup> および CD203c<sup>high</sup>)、 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN (もしくは PC) で刺激したときにそのゲートに含まれる細胞数 (%) で評価した (Fig. 9D および E)。また、蛍光強度の平均値 (mean fluorescence intensity, MFI) も指標に用いた。

#### 統計処理

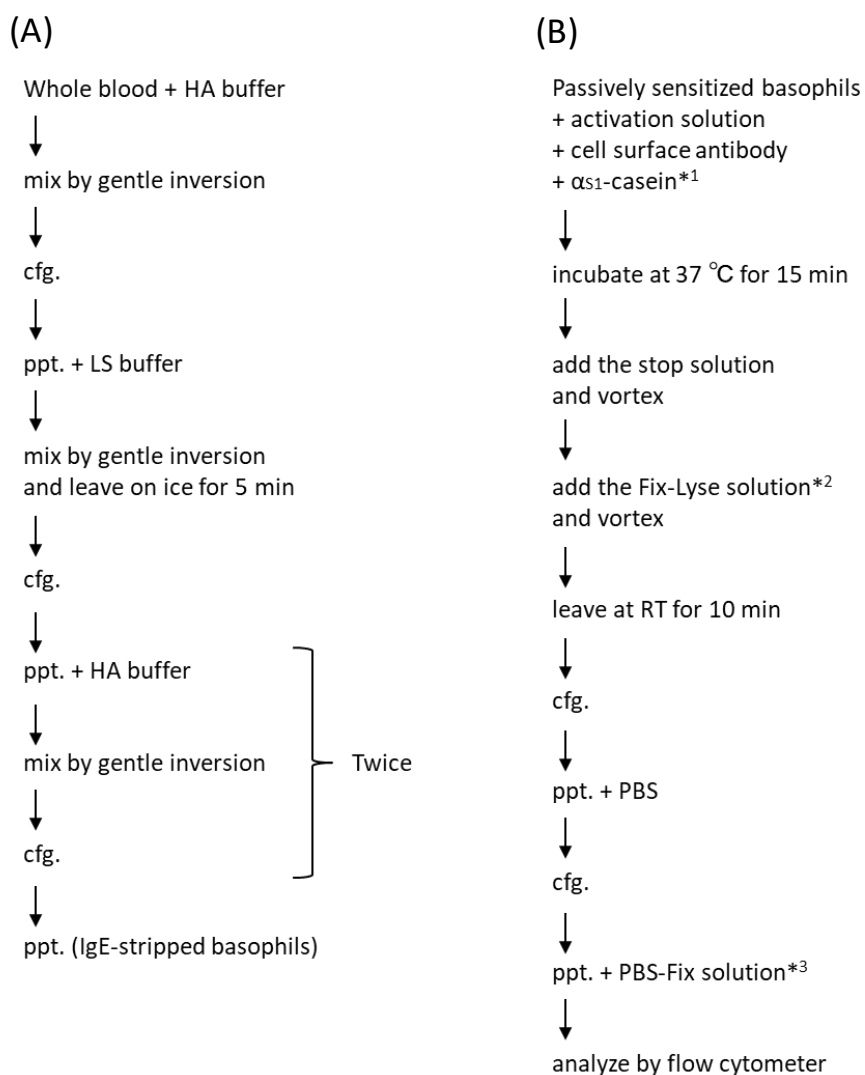
測定値は平均値  $\pm$  標準偏差で示した。全ての統計解析は EZR を使用した (Kanda, 2013)。特異的抗体価の差の検定には一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) を行い、その後の Post-hoc 検定は pre を対照として Dunnett の検定を行った。抗体価と牛乳摂取可能量、抗体価と好塩基球の活性化、および好塩基球の活性化と牛乳摂取可能量の相関係数の検定には Pearson の積率相関係数を用いた。 $P < 0.05$  のものを統計的に有意とした。

#### 倫理的配慮

本研究はヘルシンキ宣言に従って実施した。研究の対象患者には十分に研究の説明を行い、患者と保護者から書面で同意を得た。CM-OIT の実施についてはあいち小児保健医療



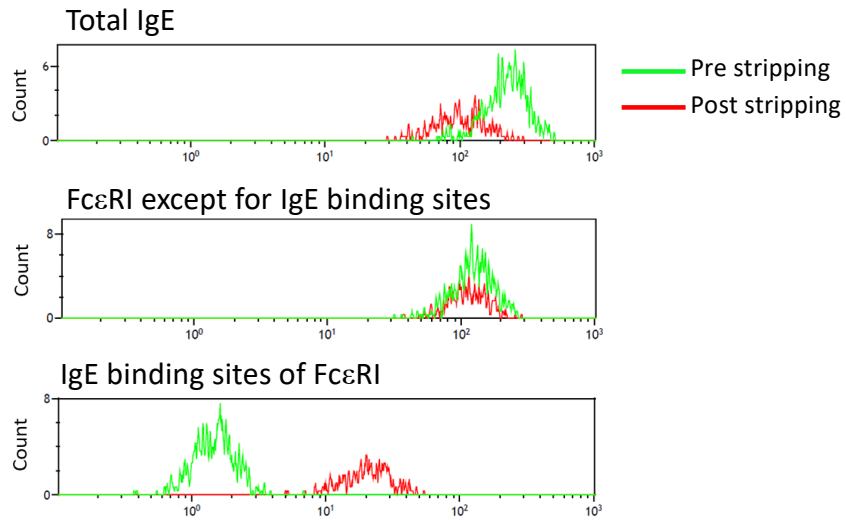
総合センターの倫理委員会の承認を得た（承認番号 201336 および 201614）。血清の使用についてはあいち小児保健医療総合センター（承認番号 201669）、名古屋学芸大学（承認番号 200）、および藤田医科大学（承認番号 HM17-425）の倫理委員会の承認を得た。



**Figure 7. Flowchart of methods for passively sensitized basophil activation test**

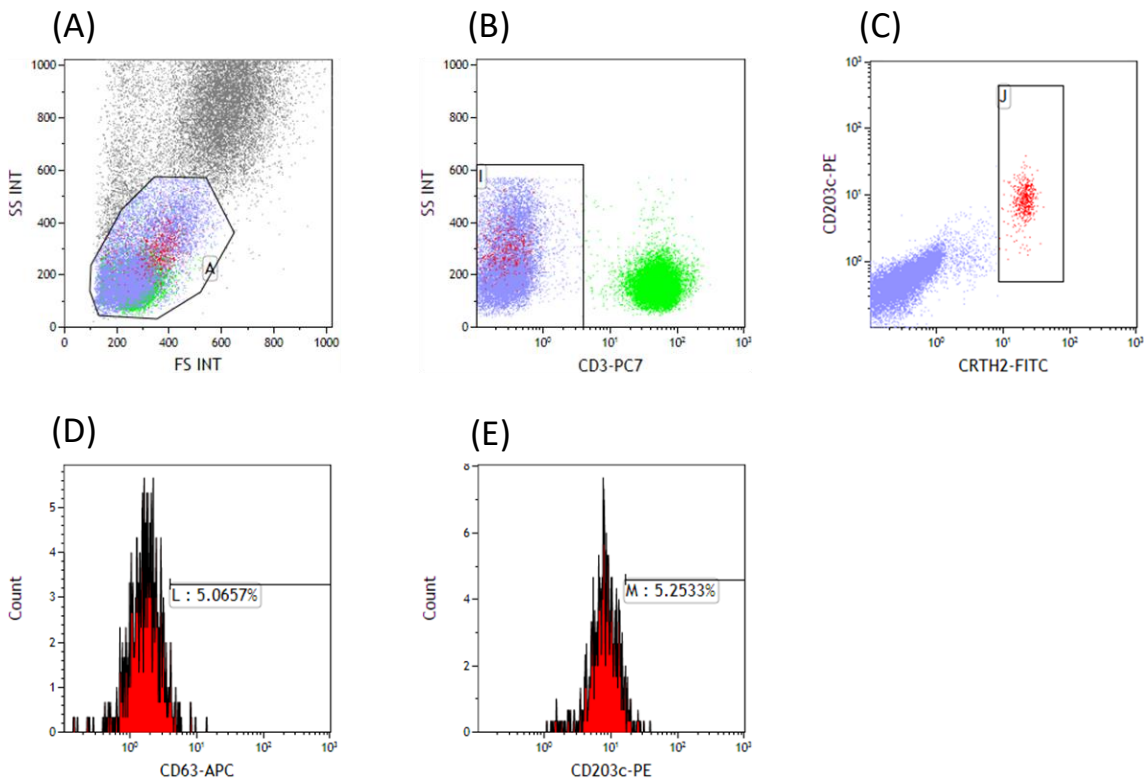
Immunoglobulins were stripped from the surface of basophils (A) and basophil was passively sensitized using the serum of a patient with cow's milk allergy. Subsequently, basophil activation test was performed (B).

1. anti-IgE antibody for the positive control or PBS for the negative control were added instead of  $\alpha_{S1}$ -casein.
2. Fixative solution and Lysis solution in the kit in a ratio of 1:40.
3. PBS and Fixative solution in the kit at a ratio of 80:1 (PBS containing 0.1% formaldehyde).



**Figure 8. IgE stripping from basophils**

The mean fluorescence intensity of total IgE, FcεRI except for IgE binding sites, and IgE binding sites of FcεRI were measured.



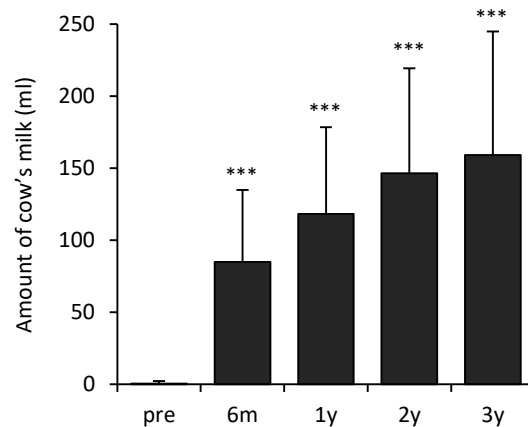
**Figure 9. Gating of activated basophils**

Leukocytes were gated by front scatter and side scatter (A). T lymphocytes were excluded by CD3 positivity (B). Basophils were gated using CRTH2-positive cells (C). The antigen-stimulated activation of basophils using the same number of cells included in the top 5% gate of the high expression of activation markers CD63 (D) and CD203c (E) using an antigen non-stimulated negative control.

## 2-3 結果

### 経口免疫療法の臨床経過

あいち小児保健医療総合センターにて食物経口負荷試験を実施したところ、牛乳摂取可能量は CM-OIT に伴い徐々に増加し、6m で  $84.8 \pm 49.2\text{ml}$ 、1y で  $121 \pm 59.8\text{ml}$ 、2y で  $150 \pm 69.5\text{ml}$ 、3y で  $159 \pm 82.8\text{ml}$  と pre ( $0.517 \pm 1.63\text{ml}$ ) と比較して有意に増加した (いずれも  $P < 0.001$ ) (Fig. 10)。この結果から、CM-OIT の治療効果が得られたと考えられる。



**Figure 10. Change of tolerated amount of cow's milk during CM-OIT**

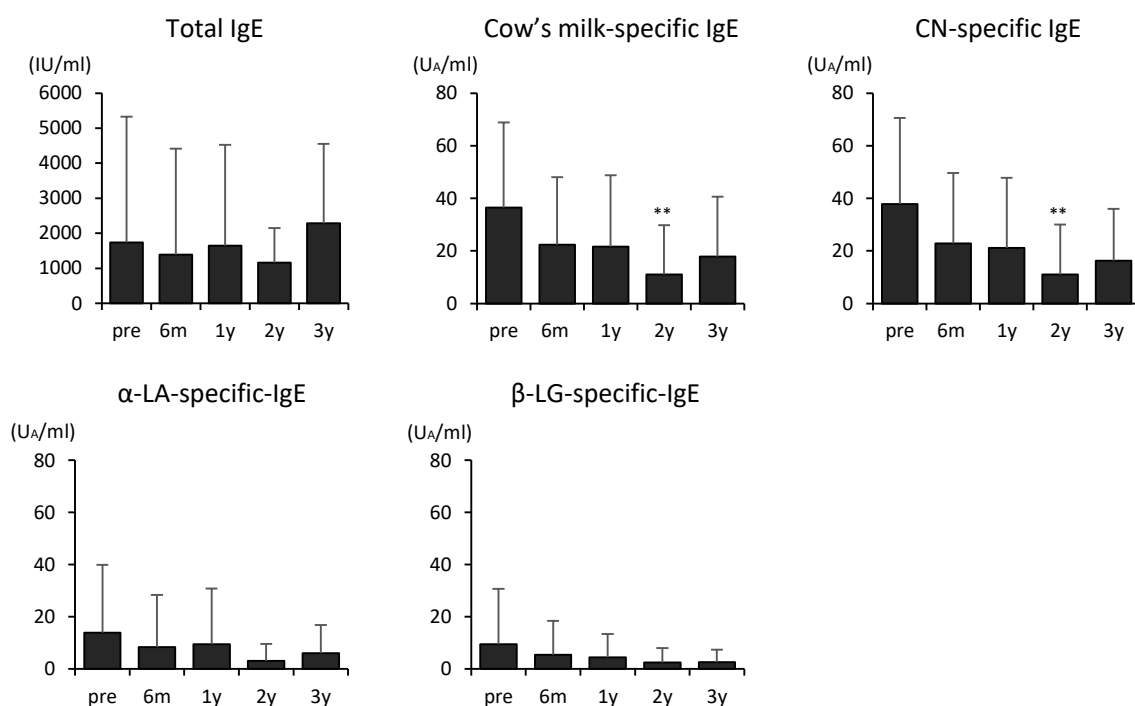
Data are shown as mean  $\pm$  SD. Pre (n = 39), before OIT; 6m (n = 36), 1y (n = 29), 2y (n = 17) and 3y (n = 14) correspond to 6 months, 1, 2, and 3 years after OIT, respectively. Dunnett tests compared to pre were applied. \*\*\* $P < 0.001$ .

### 経口免疫療法に伴う IgE 抗体価の変化

あいち小児保健医療総合センターにて保険適用の範囲内で ImmunoCAP®にて測定された総 IgE 抗体価および牛乳粗抗原、CN、 $\alpha$ -LA、および  $\beta$ -LG 特異的 IgE 抗体価を Fig. 11 に示す。Pre の総 IgE 抗体価は  $1740 \pm 3584$  IU/ml であった。牛乳粗抗原特異的 IgE 抗体価は  $36.56 \pm 32.40$  U<sub>A</sub>/ml、CN 特異的 IgE 抗体価は  $37.27 \pm 31.80$  U<sub>A</sub>/ml、 $\alpha$ -LA 特異的 IgE 抗体価は  $13.94 \pm 25.61$  U<sub>A</sub>/ml、 $\beta$ -LG 特異的 IgE 抗体価は  $9.48 \pm 20.96$  U<sub>A</sub>/ml であった。次に、CN 画分中の  $\alpha$ <sub>S1</sub>-、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN に対するそれぞれの特異的 IgE 抗体価を ELISA にて測定した (Fig. 12)。Pre の  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN 特異的 IgE 抗体価は  $39.01 \pm 27.44\%$ 、 $\beta$ -

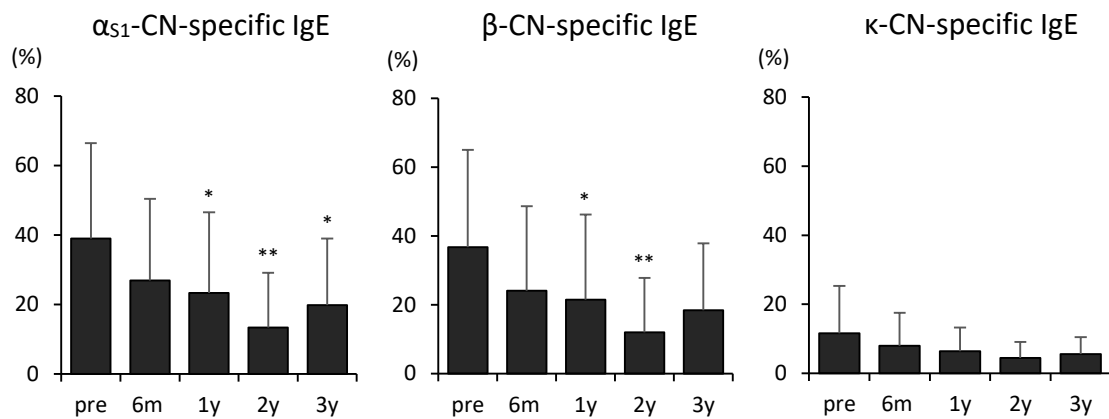
CN 特異的 IgE 抗体価は  $36.70 \pm 28.35\%$  であり、 $\kappa$ -CN 特異的 IgE 抗体価 ( $11.56 \pm 13.73\%$ ) よりも有意に高値を示した (いずれも  $P < 0.001$ )。牛乳粗抗原のコンポーネントである  $\alpha$ -LA、 $\beta$ -LG、 $\alpha_{S1}$ -CN、 $\beta$ -CN、および  $\kappa$ -CN 特異的 IgE 抗体価の結果から、重症牛乳アレルギー患者は  $\alpha_{S1}$ -および  $\beta$ -CN 特異的 IgE 抗体価が高値を示すことが明らかとなった。

次に、CM-OIT のマーカーとなるアレルゲンを同定するために、CM-OIT に伴う IgE 抗体価の変化を解析し、IgE 抗体価と治療効果の指標である牛乳摂取可能量との相関を解析した。まず、IgE 抗体価の変化を解析した結果、総 IgE 抗体価は、CM-OIT に伴う有意な変化がみられなかった (Fig. 11)。牛乳粗抗原および CN 特異的 IgE 抗体価は、pre と比較して 2y で有意に減少した ( $P < 0.01$ )。  $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価は、pre と比較して 1y ( $P < 0.05$ )、2y ( $P < 0.01$ )、および 3y ( $P < 0.05$ ) で有意に減少した (Fig. 12)。  $\beta$ -CN 特異的 IgE 抗体価は、pre と比較して 1y ( $P < 0.05$ ) および 2y ( $P < 0.01$ ) で有意に減少した。一方で、 $\alpha$ -LA、 $\beta$ -LG、および  $\kappa$ -CN 特異的 IgE 抗体価は CM-OIT 前後で低値を維持し、有意な減少はみられなかった。



**Figure 11. Changes of IgEs during CM-OIT**

Changes in levels of total IgE and cow's milk-, CN-,  $\alpha$ -LA-, and  $\beta$ -LG-specific IgE during OIT were measured by ImmunoCAP®. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Pre (n = 39), before OIT; 6m (n = 36), 1y (n = 29), 2y (n = 17) and 3y (n = 14) correspond to 6 months, 1, 2, and 3 years after OIT, respectively. Dunnett tests compared to pre were applied. \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 12. Changes of IgEs to casein components during CM-OIT**

Changes in levels of  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein-specific IgE during CM-OIT were measured by ELISA. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Pre (n = 39), before OIT; 6m (n = 36), 1y (n = 29), 2y (n = 17) and 3y (n = 14) correspond to 6 months, 1, 2, and 3 years after OIT, respectively. Dunnett tests compared to pre were applied. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

上記の IgE 抗体価と牛乳摂取可能量の相関係数を解析した (Table 5)。その結果、総 IgE 値は牛乳摂取可能量とほとんど相関がみられなかったが、牛乳粗抗原および CN 特異的 IgE 抗体価は、牛乳摂取可能量と負の相関を示した (それぞれ  $r = -0.43$  および  $-0.45$ )。  $\alpha_{S1}$ -および  $\beta$ -CN 特異的 IgE 抗体価は、牛乳摂取可能量と負の相関を示した (それぞれ  $r = -0.47$  および  $-0.43$ )。一方で、ホエータンパク質である  $\alpha$ -LA および  $\beta$ -LG に対する特異的 IgE 抗体価は、弱い負の相関を示した (それぞれ  $r = -0.25$  および  $-0.22$ )。

以上の結果から、 $\alpha_{S1}$ -および  $\beta$ -CN 特異的 IgE 抗体価は CM-OIT に伴い有意に低下したため、CM-OIT のマーカーとなる主要アレルゲンの可能性として  $\alpha_{S1}$ -および  $\beta$ -CN が挙げられた。特に  $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価が牛乳摂取可能量と最も強く相関した。そこで、実際に血清中の  $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価の減少が症状誘発の抑制に関与していることを確認するために、特異的抗体産生後の免疫応答を解析した。

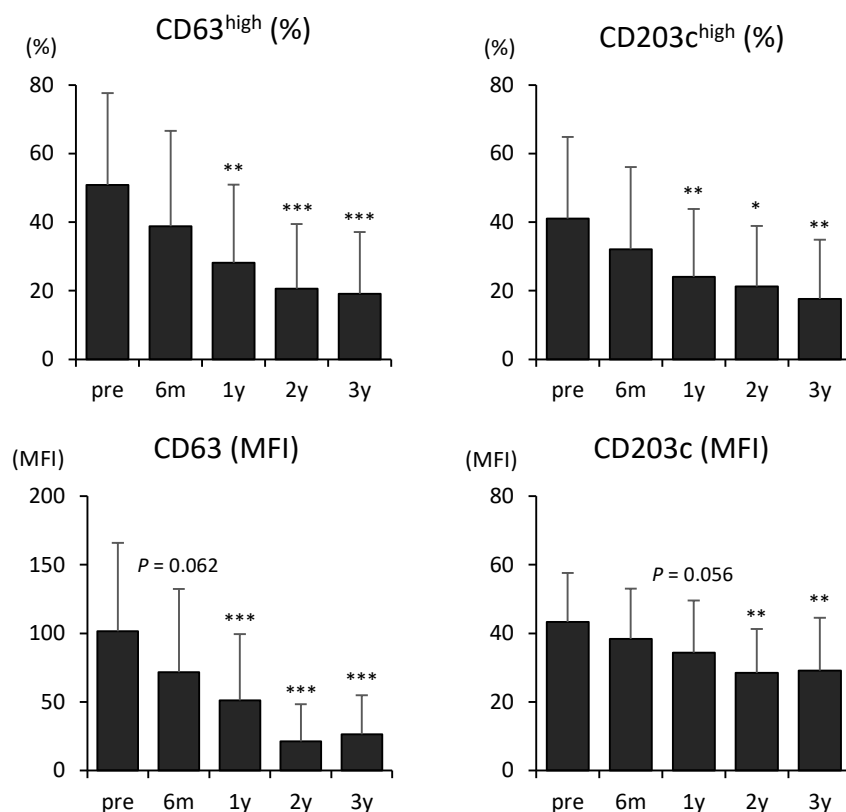
**Table 5.** Correlations between IgEs and tolerated amount of cow's milk consumption during CM-OIT

	r	95% CI	P value
Total IgE	0.00	-0.17 - 0.17	0.981
CM-specific IgE	-0.43	-0.56 - -0.28	< 0.001
CN-specific IgE	-0.45	-0.57 - -0.30	< 0.001
$\alpha$ -LA-specific IgE	-0.25	-0.42 - -0.07	0.007
$\beta$ -LG-specific IgE	-0.22	-0.22 - -0.04	0.018
$\alpha_{S1}$ -CN-specific IgE	-0.47	-0.59 - -0.32	< 0.001
$\beta$ -CN-specific IgE	-0.43	-0.56 - -0.28	< 0.001
$\kappa$ -CN-specific IgE	-0.32	-0.46 - -0.16	< 0.001

performed by Pearson's product-moment correlations

#### 経口免疫療法に伴う受動感作好塩基球の変化

受動感作好塩基球の活性化を評価するために、 $\alpha_{S1}$ -CN で刺激後の CD63 および CD203c を検出した。CD63 および CD203c は好塩基球の脱顆粒に伴って細胞表面に発現するタンパク質であり、好塩基球活性化の指標としてよく使用される (Santos ら, 2015b; Sugiura ら, 2013)。Pre 血清で受動感作した好塩基球の  $\alpha_{S1}$ -CN により活性化した割合は、CD63<sup>high</sup> が  $50.8 \pm 26.8\%$ 、CD203c<sup>high</sup> が  $41.0 \pm 23.8\%$ であった (Fig. 13)。CD63<sup>high</sup> および CD203c<sup>high</sup> の割合は 1y、2y、および 3y で有意に減少した。CD63 および CD203c の MFI も OIT に伴って有意に低下した。以上より、CD63 および CD203c の発現量と、その高発現細胞数ともに CM-OIT に伴い減少したことから、受動感作好塩基球の活性化は CM-OIT に伴い低下することが明らかとなった。



**Figure 13. Changes of basophil activation stimulated by  $\alpha_{S1}$ -casein during CM-OIT**

Basophil activation was analyzed using the percentages of high expression and mean fluorescence intensity (MFI) of CD63 and CD203c. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Pre (n = 39), before OIT; 6m (n = 36), 1y (n = 29), 2y (n = 17) and 3y (n = 14) correspond to 6 months, 1, 2, and 3 years after OIT, respectively. Dunnett tests compared to pre were applied. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

また、血清中の  $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価の減少が症状誘発の抑制に関与していることを確認するために、まず、受動感作好塩基球の活性化と牛乳摂取可能量の相関係数を解析した (Table 6)。CD63<sup>high</sup> および CD203c<sup>high</sup> の割合は、牛乳摂取可能量と負の相関を示した (それぞれ  $r = -0.51$  および  $-0.45$ )。また、CD63 および CD203c の MFI も同様に負の相関を示した (それぞれ  $r = -0.58$  および  $-0.49$ )。次に、受動感作好塩基球の活性化と  $\alpha_{S1}$ -CN 特異的抗体価の相関係数を解析した (Table 7)。CD63<sup>high</sup> および CD203c<sup>high</sup> の割合は、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価と正の相関を示した (それぞれ  $r = 0.54$  および  $0.48$ )。また、CD63 および CD203c の MFI も同様に、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価と正の相関を示した (それぞれ  $r = 0.65$  および  $0.58$ )。これらの結果から、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価の減少が受動感作好塩基球の活性化を低下させることで、牛乳摂取可能量を増加させることが明らかとなり、重症牛乳アレルギー患者において  $\alpha_{S1}$ -CN を主要アレルゲンの一つとして同定

した。

**Table 6.** Correlations between basophil activation and amount of cow's milk consumption during CM-OIT

	r	95% CI	P value
CD63 <sup>high</sup> (%)	-0.51	-0.63 - -0.37	<0.001
CD203c <sup>high</sup> (%)	-0.45	-0.57 - -0.30	<0.001
CD63 (MFI)	-0.58	-0.68 - -0.46	<0.001
CD203c (MFI)	-0.49	-0.61 - -0.35	<0.001

performed by Pearson's product-moment correlations

**Table 7.** Correlations between basophil activation and  $\alpha$ <sub>S1</sub>-casein specific IgE during CM-OIT

	r	95% CI	P value
CD63 <sup>high</sup> (%)	0.54	0.41 - 0.65	<0.001
CD203c <sup>high</sup> (%)	0.48	0.33 - 0.60	<0.001
CD63 (MFI)	0.65	0.54 - 0.74	<0.001
CD203c (MFI)	0.58	0.45 - 0.68	<0.001

performed by Pearson's product-moment correlations.

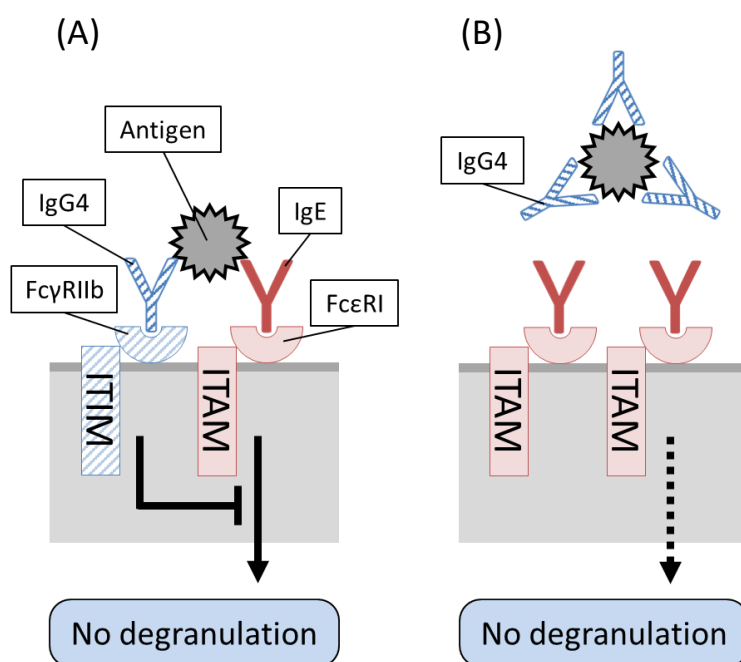


## 2-4 考察

本研究では、OITの対象となるような重症牛乳アレルギー患者が実際にどのタンパク質に反応しているのか明らかにした上で、牛乳加工食品中におけるそのタンパク質の性状を解析し、OITへの応用について考察することを目的とした。その第一段階として、本章では、重症牛乳アレルギー患者における特異的IgE抗体価のCM-OITによる変化と牛乳摂取可能量との関係からマーカーとなるアレルゲンを同定した。その結果、 $\alpha$ <sub>1</sub>-CN特異的IgE抗体価が牛乳摂取可能量と最も相関性が高く、 $\alpha$ <sub>1</sub>-CNがCM-OITのマーカーとなるアレルゲンの一つであることが明らかとなった。

食物アレルギーの診断には、特異的IgE抗体価が用いられる。ロジスティック回帰法から算出された特異的IgE抗体価と症状誘発の可能性のプロバビリティカーブが報告され、特異的IgE抗体価が高値であるほど症状誘発の可能性は高くなることが明らかとなった (Komata ら, 2007; Komata ら, 2009; Ebisawa ら, 2012; Ebisawa ら, 2015)。さらに、特異的IgE抗体価が高値であるほど、アナフィラキシー様の重症症状のリスクは高くなる (Nomura ら, 2014; Yoneyama ら, 2015; Yanagida ら, 2018)。これらのことから、特異的IgE抗体価はアレルギー症状を反映し、特異的IgE抗体価が低下すれば、アレルギー症状が緩和されると考えられる。一方で、OITによって原因食品が摂取できるようになった患者の特異的IgE抗体価が、OIT後も変わらず高いままという症例も存在する。したがって、OITによるアレルギー症状の抑制機序にはIgE抗体以外の因子が関与していると考えられ、近年、その因子としてIgG4抗体が注目されている。Igクラスの中でIgG抗体は、ヒト血清中に最も多く存在するが、そのサブクラスであるIgG4抗体はIgGクラスの約4%に満たない。また、IgG4抗体の正確な役割は未だ明らかにされていない。そのIgG4抗体によるアレルギー症状の抑制には2つの機序が考えられており、肥満細胞や好塩基球上のFc $\gamma$ レセプターII (Fc $\gamma$ RII) にIgG4抗体が結合し、そこにアレルゲンが結合することで、Fc $\epsilon$ RIからの脱顆粒の活性化を抑制する機序 (Fig. 14A) と、肥満細胞や好塩基球上のIgE抗体にアレルゲンが結合する前に、阻害的にIgG4がアレルゲンと結合する機序 (Fig. 14B) が挙げられる (Renz ら, 2018)。このように、特異的IgG4抗体は、一般的に中和抗体の働きを持ち (Burton ら, 2018)、Jones ら (2009) はOITの効果を示すマーカーとして特異的IgE抗体価よりも有効だと報告した。また、特異的IgG4/IgE比は、ピーナッツアレルギーに対するOITの効果的なバイオマーカーであると報告された (Santos ら, 2015a)。

本研究においても血清中の  $\alpha_{S1}$ -、 $\beta$ -、および  $\kappa$ -CN 特異的 IgG4 抗体価を ELISA にて測定したが、CM-OIT に伴う有意な増加はみられなかった（データ示さず）。また、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgG4/IgE 比を算出した結果、CM-OIT に伴って有意に増加したが IgG4/IgE 比は IgE 抗体価に依存し、牛乳摂取可能量と相関を示したが ( $r = 0.42$ )、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価 ( $r = -0.47$ ) を超える相関はみられず、CM-OIT のマーカーとして  $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価が有益だと考えられた。



**Figure 14. Schematic models of suppression of basophil activation by IgG4**

Abbreviations; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif.

Adapted from Ref. Renz, et al. (2018).

この特異的 IgE 抗体価の変化が症状誘発に影響を及ぼすのか、IgG4 抗体やその他の血清中の因子がアレルギー症状の誘発や抑制に関与しているのか確認するために、受動感作好塩基球の活性化を解析した。好塩基球の活性化の指標に用いた CD63 は、好塩基球内の顆粒を含む小胞に存在する膜貫通タンパク質であり、脱顆粒に伴って細胞表面に発現する。また、CD203c は、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs) ファミリーに属する膜貫通タンパク質であり (Bühning ら, 2004)、ATP を分解する膜型酵

素である。好塩基球の活性化に伴い脱顆粒と同時に ATP が分泌され、ATP がさらに好塩基球の活性化を促進させるが、ATP による過剰な活性化を抑制するために CD203c が発現すると考えられている (Tsai ら, 2015)。したがって、CD63 および CD203c の発現は好塩基球の活性化に伴う脱顆粒を反映している。本研究の結果として、CM-OIT に伴って  $\alpha$ S1-CN で刺激した時の受動感作好塩基球の活性化は有意に低下し、それに伴って牛乳摂取可能量が増加した。また、 $\alpha$ S1-CN は好塩基球を活性化させ、症状を誘発することが示唆された。一方で、受動感作好塩基球の活性化の IgG4 抗体を介した抑制機序 (Fig. 14) を検討したが (データ示さず)、 $\alpha$ S1-CN 特異的 IgG4 抗体の関与は限定的であり、サイトカインやヒスタミン遊離因子 (histamine-releasing factor) などの IgG4 抗体とは別の因子も関与している可能性が考えられた。これらの結果から、CM-OIT によるアレルギー症状の抑制機序は特異的 IgE 抗体の減少が中心的な機序であることが示唆され、CM-OIT のマーカーとなるアレルゲンは特異的 IgE 抗体価に基づいて選定できると考え、特異的 IgE 抗体価が有意に低下した  $\alpha$ S1-CN を主要アレルゲンの一つとして同定した。

本研究の限界として、血清量に制限があったため、 $\alpha$ S1-CN 以外のコンポーネントを用いて BAT を行うことができなかった。また、 $\alpha$ S2-CN を精製することが困難であり、特異的 IgE 抗体価を解析することができなかった。 $\alpha$ S2-CN は  $\alpha$ S1-CN と共に  $\alpha$ -CN と解析される研究も多いが、今後は  $\alpha$ S2-CN 特異的抗体価も解析する必要がある。

本章において、重症牛乳アレルギー患者は牛乳タンパク質 ( $\alpha$ -LA、 $\beta$ -LG、 $\alpha$ S1-CN、 $\beta$ -CN、および  $\kappa$ -CN) のうち  $\alpha$ S1-および  $\beta$ -CN の特異的 IgE 抗体価が高値を示し、これらの特異的 IgE 抗体価は CM-OIT に伴い有意に低下した。また、 $\alpha$ S1-CN 特異的 IgE 抗体価が牛乳摂取可能量と最も強く相関した。さらに、 $\alpha$ S1-CN で刺激した時の受動感作好塩基球の活性化も CM-OIT に伴い低下し、特異的 IgE 抗体価と受動感作好塩基球の活性化、受動感作好塩基球の活性化と牛乳摂取可能量は相関が認められた。これらの結果から、 $\alpha$ S1-CN は免疫応答を介すタンパク質であり、CM-OIT を受けるような重症牛乳アレルギー患者における主要アレルゲンの一つであることが示された。そこで、以降の牛乳加工食品中の牛乳タンパク質の性状解析では、特に  $\alpha$ S1-CN に着目した。

## 第3章 市販乳製品中の主要アレルゲンの性状解析

### 3-1 目的

牛乳加工食品中のタンパク質は加工処理を受けることによって、溶解性や構造などの性状が変化し、それに伴いタンパク質の抗原性やアレルゲン性が変化している可能性がある。そこで、CM-OIT への利用に先立ち市販乳製品中のタンパク質の組成および  $\alpha_{S1}$ -CN の性状を解析した。

乳製品として世界的にヨーグルトやチーズが喫食されている。ヨーグルトの製造方法は牛乳に乳酸菌種を添加することから始まる。乳酸菌が乳糖を分解することで乳酸を生成し、pH が低下することで牛乳タンパク質が沈殿する。これがヨーグルトの原型である。日本では厚生労働省にて、ヨーグルトを「はっ酵乳」と位置づけられ、「乳またはこれと同等以上の無脂乳固形分を含む乳等を乳酸菌または酵母ではっ酵させ、糊（のり）状または液状にしたもの、またこれらを凍結したもの」と定義づけられている。国際連合食糧農業機関（Food and Agriculture Organization）および世界保健機関（World Health Organization）によって定められたヨーグルトの国際規格は *Lactobacillus bulgaricus* および *Streptococcus thermophilus* の発酵によって得られたものとされる。

チーズの製造には牛乳タンパク質のうち主に CN 画分が関与する。牛乳中の CN はコロイドのミセルとして存在する。その外側を覆う  $\kappa$ -CN の Phe<sub>105</sub> と Met<sub>106</sub> が凝乳酵素（レンネット）中のキモシンによって分解されることで疎水度が増し沈殿する（Ono ら, 2017）（Fig. 2D）。さらに、乳酸発酵による酸変性を利用しカードを得る。このカードがチーズの原型である。チーズは製造方法によっていくつかの種類に分類される（三浦と阿久澤, 2011）。カード形成の際に、上清中の凝乳酵素を排出したものがフレッシュタイプのチーズである。その後、圧搾して熟成したものがセミハードまたはハードタイプのチーズである。一方で凝乳酵素を排出後、カビ付けして熟成したものがホワイトおよびブルータイプのチーズである。日本では主にこの 5 種類がよく喫食されている。

牛乳から作られるヨーグルトやチーズ中のタンパク質は、発酵もしくは熟成により凝集もしくは分解などが生じ性状が変化している可能性がある。しかし、ヨーグルトおよびチーズ中のタンパク質の性状やアレルゲン性は意外にもほとんど報告されていない。Yao ら

(2015)は *Lactobacillus casei* 1134 を使用して牛乳タンパク質を経時的に発酵した結果、 $\alpha$ -CN のアレルゲン性は経時的に低下すると報告した。チーズにおいては、Alessandri ら (2012) が、ハードタイプであるパルミジャーノ・レッジャーノのアレルゲン性を解析し、熟成期間が長くなるほど  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN を中心に CN 画分のアレルゲン性が低下することを報告した。これらのように、発酵や熟成に伴う牛乳タンパク質の変化は温度、時間、または菌種により差がある可能性はあるが、いずれにおいてもアレルゲン性は経時的に概ね低下すると予測できる。しかし、様々な条件（温度、時間、または菌種など）で作製された市販のヨーグルトやチーズのタンパク質組成や  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の性状は明らかではない。

そこで本研究では、市販のヨーグルトおよびチーズ中のタンパク質組成および  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の性状を明らかにするために、阻害 ELISA、SDS-PAGE、およびイムノブロットを行った。さらに、牛乳アレルギー患者血清を用いて市販のヨーグルトおよびチーズ中のタンパク質と IgE 抗体の反応性を解析した。

## 3-2 実験材料および方法

### 材料

牛乳は、市販の成分無調整乳（明治おいしい牛乳、株式会社明治）を使用した。ヨーグルトは乳酸菌種の異なる市販のプレーンヨーグルトを 2 種類使用した。乳酸菌種として *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 が使用されているヨーグルト（ビヒダスプレーンヨーグルト、森永乳業）をヨーグルト A、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 および *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 1131 が使用されているヨーグルト（明治ブルガリアヨーグルト、株式会社明治）をヨーグルト B とした。ヨーグルトは上澄みも含めて攪拌し試料にした。チーズは 5 種類のタイプのナチュラルチーズを使用した。セミハードタイプとしてゴータチーズ（株式会社エヌ・シー・エル）、ハードタイプとしてチェダーチーズ（株式会社エヌ・シー・エル）、白カビタイプとしてカマンベールチーズ（雪印メグミルク）、青カビタイプとしてゴルゴンゾーラチーズ（チエスコ株式会社）、フレッシュタイプとしてモッツァレラチーズ（北海道日高乳業株式会社）を使用した。試料は凍結乾燥した。

## Kjeldahl 法による粗タンパク質の定量

凍結乾燥後の試料中の粗タンパク質は Kjeldahl 法にて定量した (Table 8)。窒素-タンパク質換算係数は 6.38 とした。牛乳やヨーグルトは、時期によってタンパク質含有量が異なるため、Kjeldahl 法により得られたタンパク質量をもとに、タンパク質抽出に用いる試料の量を決定した。

**Table 8.** Amounts of protein in milk and dairy products (g/100g)

Milk and Dairy products	Table* <sup>1</sup>	Labeling* <sup>2</sup>	Measured value* <sup>3</sup>
Cow's milk	3.3	3.4	3.17
Yogurt			
A	3.6	3.7	3.68
B	3.6	3.4	3.61
Cheese			
Semi-hard	25.8	—	20.8
Hard	25.7	—	20.6
White	19.1	—	17.4
Blue	18.8	—	16.0
Fresh	18.4	—	20.2

1. Standards Tables of Food Composition in Japan

2. Nutrition facts

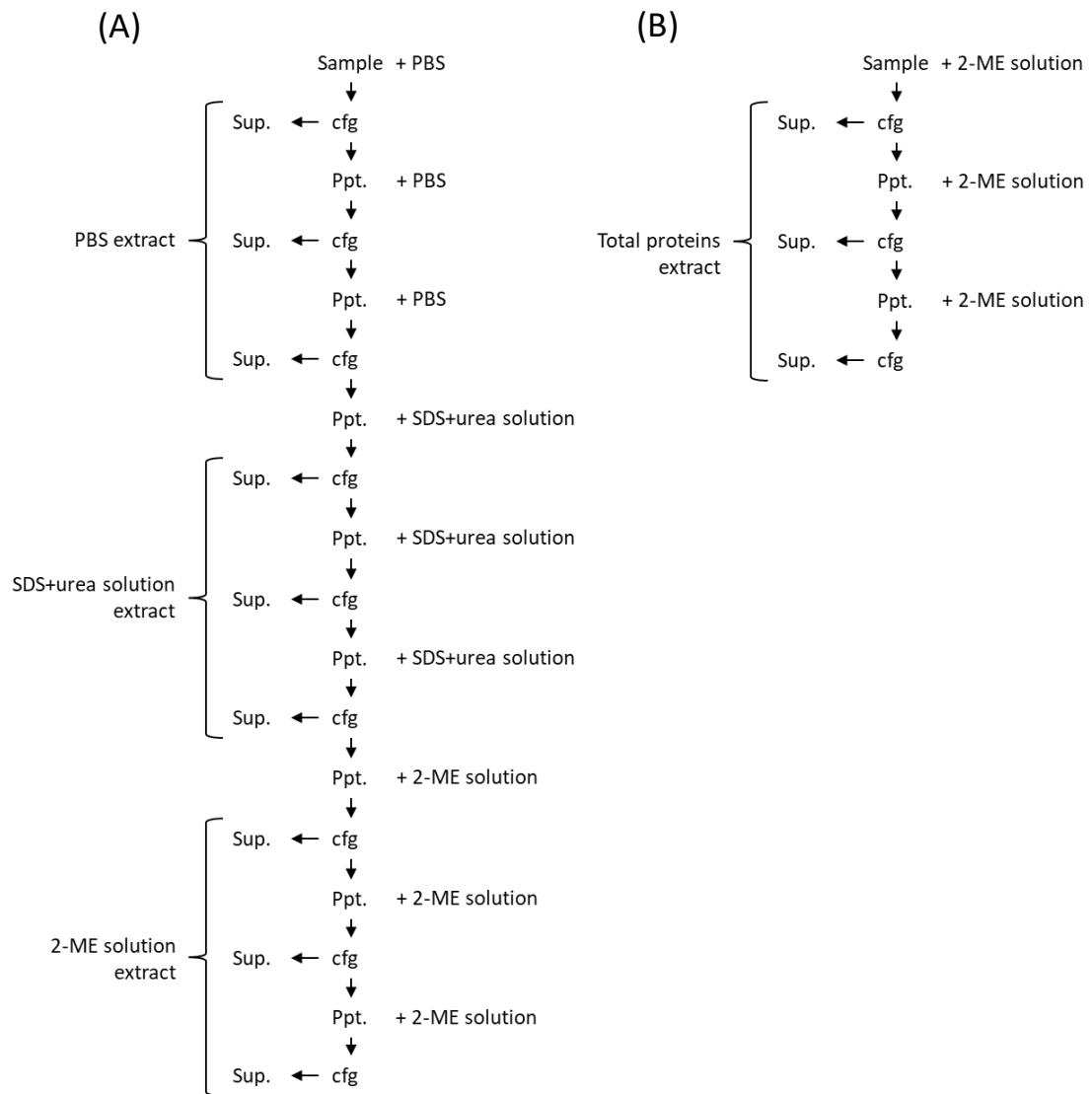
3. Kjeldahl method

## 患者血清

第2章で解析した牛乳アレルギー患者のうち5人のプール血清（ヒトIgE抗体）を使用した。牛乳粗抗原、CN、 $\alpha$ -LA、および $\beta$ -LG特異的IgE抗体価の平均値はそれぞれ86.1、79.4、35.0、および15.9 U<sub>A</sub>/mlであり、経口負荷試験による牛乳摂取可能量は0.0mlであった。

## タンパク質の抽出

凍結乾燥後の試料から溶解性の異なるタンパク質を抽出した（Fig. 15A）。初めに、試料中の牛乳タンパク質量が0.3gになるように計り取り、PBSを10ml加え、4℃、2時間振とうすることで水・塩溶性タンパク質を抽出した。振とう後、遠心分離（9100×g、4℃、10分）し上清を回収した。残渣にPBSを10ml加え、再懸濁した後に振とうした。この振とうおよび上清回収の操作を合計3回行い、3回目の上清回収後の残渣には、4% SDSと6M尿素を含むTris-HCl（pH 6.8）緩衝液（SDS+urea溶液）を10ml加え振とう（4℃、2時間）することで不溶性タンパク質を抽出した。SDS+urea溶液による振とうおよび上清回収の操作も合計3回行い、その後5% 2-MEを含むSDS+urea溶液（2-ME溶液）でも同様に3回の振とうおよび上清回収の操作を行った。得られた上清はタンパク質抽出液ごとに混和し、最終量が30mlになるよう各タンパク質抽出液で調整した。さらに、試料中のタンパク質を全て抽出するために、最初から2-ME溶液で抽出し、調整したものを準備した（Fig. 15B）。





## 阻害 ELISA による抗原性の解析

96 穴マイクロプレートに  $\alpha_{S1}$ -CN (10  $\mu\text{g/ml}$  PBS) を 100 $\mu\text{l/well}$  加え、インキュベート (4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晚) することでコーティングした。各試料からの PBS 抽出物を PBS にて 10 倍希釈系列を作製し、それらに rabbit anti- $\alpha_{S1}$ -CN antisera (抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清、シグマアルドリッチジャパン合同会社) を 1% BSA/PBS-T で希釈 (1:5000) したものを等量混和し、プレインキュベート (4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晚) した。次に、コーティング後のマイクロプレートを PBS-T にて 3 回洗浄し、1% BSA/PBS-T (200  $\mu\text{l/well}$ ) を用いてブロッキング (4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間) した。その後、一次抗体としてプレインキュベートした抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清 (100  $\mu\text{l/well}$ ) を加えインキュベート (4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間) した。PBS-T による洗浄後、1% BSA/PBS-T にて horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) を 1:10000 になるように希釈して、100 $\mu\text{l/well}$  加えインキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間) した。発色基質に 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (KPL SureBlue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate, SeraCare Inc., Milford, MA, USA) を 100 $\mu\text{l/well}$  加え反応させ、1N 塩酸を用いて 100 $\mu\text{l/well}$  加えることで反応を停止した。その後、マイクロプレートリーダー SH1000 にて波長 450nm の吸光度を測定した。測定は 2 連で、全て同時に行った。PC として、一次抗体を PBS 抽出物の代わりに PBS と混和させたものを使用した。結果は、それぞれの試料の吸光度を PC に対する相対吸光度として示した。

## SDS-PAGE によるタンパク質組成の解析とイムノブロットによるアレルゲンの検出

SDS-PAGE は第 2 章と同様の方法で行った。試料は各抽出物を各タンパク質抽出液にて 4 倍希釈し、4:1 (v/v) となるように SDS-PAGE sample buffer と混和したものを、5 $\mu\text{l}$  を供した。

イムノブロットは第 2 章と同様の方法で行った。本章では、一次抗体として抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清または抗  $\alpha_{S1}$ -CN モノクローナル抗体を、1% BSA/TBS-T にてどちらも 1:2000 になるように希釈した溶液中で反応 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晚) させた。TBS-T にて 3 回洗浄した後、二次抗体として HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) および POD-conjugated anti-mouse IgG (1:10000) を 1% BSA/TBS-T にて希釈した溶液中で反応 (室温、1 時間) させた。TBS-T にて 2 回、TBS にて 2 回洗浄した後、発色試薬として Ez West Blue を用いて  $\alpha_{S1}$ -CN を検出した。

また、ヒト IgE 抗体反応性タンパク質を検出するために、一次抗体としてヒト IgE 抗体を使用した。ブロッキング溶液として Western BLoT Blocking Buffer (Fish Gelatin、タカラバイオ株式会社) を用いた。一次抗体としてヒト IgE 抗体を用いブロッキング溶液にて希釈し (1:10)、4°C で一晩反応させた。二次抗体として ALP- conjugated anti-human IgE を用いブロッキング溶液にて希釈し (1:1000)、室温で 1 時間反応させた。TBS-T にて 2 回、TBS にて 2 回洗浄した後、発色基質として 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸/ニトロブルーテトラゾリウム (BCIP®/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes alkaline phosphatase substrate、シグマアルドリッチジャパン合同会社) を用いてヒト IgE 抗体反応性タンパク質を検出した。

#### 未分解の $\alpha_{S1}$ -カゼインの輝度解析

それぞれのチーズ中の未分解の  $\alpha_{S1}$ -CN の相対量は輝度解析にて比較した。抗  $\alpha_{S1}$ -CN モノクローナル抗体を使用したプロット膜の画像は、CS Analyzer ver. 3.0 for Windows に取り込み、検出されたバンドの輝度を測定した。牛乳中の  $\alpha_{S1}$ -CN の輝度を対照 (100%) とし、それぞれのチーズ中の未分解の  $\alpha_{S1}$ -CN の相対輝度 (%) を測定結果として示した。また、各試料の輝度は PBS および SDS+urea 溶液画分の輝度を合算した。

### 3-3 結果

#### ヨーグルト中のタンパク質の組成

牛乳とヨーグルト中のタンパク質組成を比較するために、試料中の全タンパク質を 2-ME 溶液にて抽出して SDS-PAGE により解析した。その結果、牛乳とヨーグルト A・B のタンパク質の組成に大きな違いは見られなかった (Fig. 16)。さらに、本研究で用いたヨーグルトにおいては乳酸菌種による違いも見られなかった。

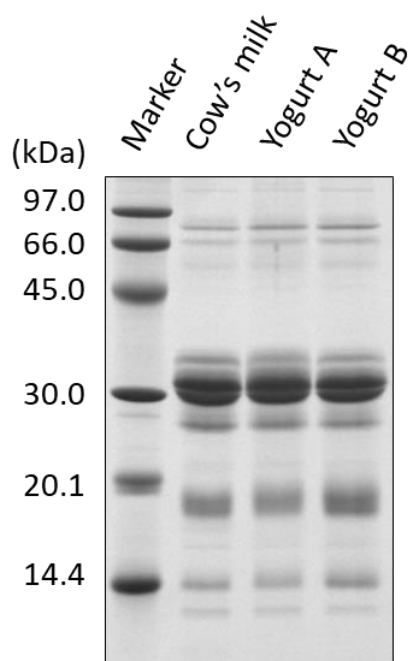
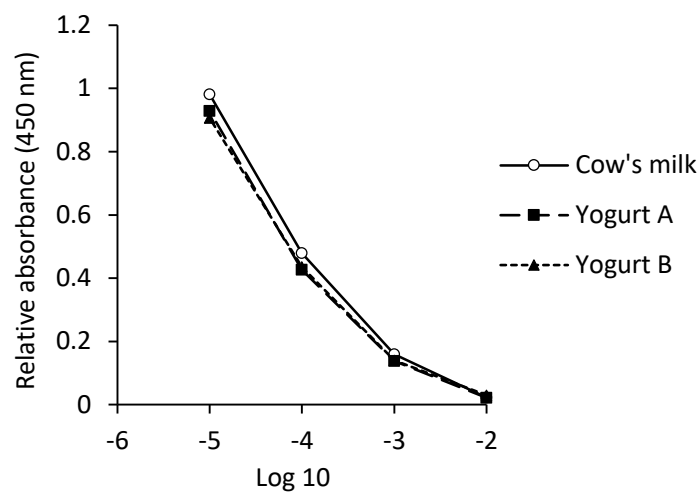


Figure 16. Protein composition of yogurts

#### ヨーグルト中の $\alpha_{S1}$ -カゼインの性状

続いて、 $\alpha_{S1}$ -CN の性状を解析した。まず、PBS を用いて各試料からタンパク質を抽出し、抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清を使用して阻害 ELISA にて  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性を解析した。その結果、 $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性は牛乳およびヨーグルト間で変わらない結果を示した (Fig. 17)。また、ヨーグルト A・B 間に差はみられなかった。

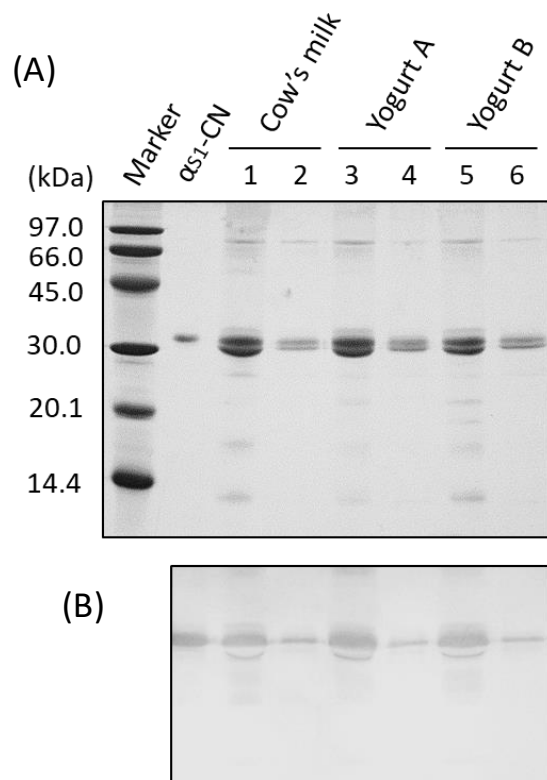


**Figure 17. Antigenicity of  $\alpha_{S1}$ -casein in yogurt**  
 $\alpha_{S1}$ -Casein in yogurts was detected by competitive ELISA using anti- $\alpha_{S1}$ -CN antisera.

次に、PBS 抽出後の試料から SDS+urea 溶液および 2-ME 溶液にてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびイムノブロットにて  $\alpha_{S1}$ -CN の溶解性を解析した。まず、タンパク質の組成を SDS-PAGE にて確認した。なお、2-ME 溶液抽出画分からはタンパク質が検出されなかった（データ示さず）。牛乳（lane 1）と比較してヨーグルト A（lane 3）および B（lane 5）には 20-30kDa 付近にバンドがみられた（Fig. 18A）。一方で、抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清を使用したイムノブロットの結果では、牛乳およびヨーグルト A・B 間で差はみられなかった（Fig. 18B）。以上の結果から、ヨーグルトの製造過程で牛乳タンパク質が pH の低下に伴い等電点沈殿をしたとしても、 $\alpha_{S1}$ -CN の性状（抗原性および溶解性）は変化しないと考えられた。

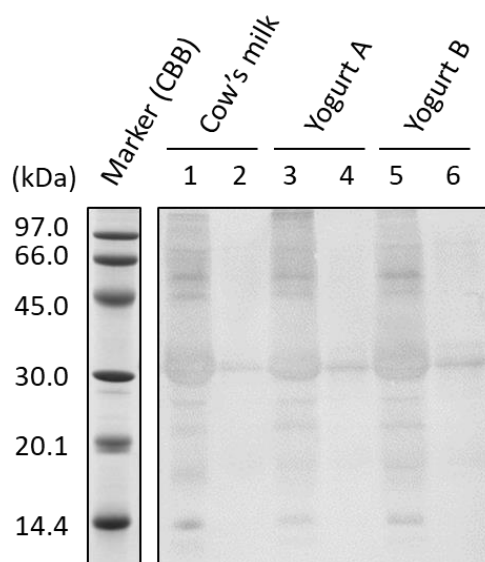
#### ヨーグルト中のタンパク質に対するヒト IgE 抗体反応性

牛乳アレルギー患者血清を用いてヒト IgE 抗体に認識されるタンパク質を検出した結果、バンドパターンは牛乳とヨーグルト A・B 間でほとんど差はみられなかった（Fig. 19）。この結果から、市販ヨーグルトのヒト IgE 抗体反応性タンパク質は牛乳中と変わらないことが示唆された。



**Figure 18. Solubility of  $\alpha_{S1}$ -casein and other proteins in yogurts**

Proteins in yogurts were detected by CBB (A) and  $\alpha_{S1}$ -casein in yogurts was detected by immunoblotting (B). Immunoblotting was performed using anti- $\alpha_{S1}$ -CN antisera. Lane 1, 3, and 5, the fraction extracted with PBS; lane 2, 4, and 6, the fraction extracted with SDS+urea solution.



**Figure 19. Human IgE binding ability of proteins in yogurts**

IgE binding proteins in yogurts were detected by immunoblotting using pooled sera of patients with cow's milk allergy. Lane 1, 3, and 5, the fraction extracted with PBS; lane 2, 4, and 6, the fraction extracted with SDS+urea solution.

### チーズ中のタンパク質の組成

牛乳とチーズ中のタンパク質組成を比較するために、チーズ中の全タンパク質を 2-ME 溶液にて抽出し、SDS-PAGE を行った。その結果、チーズの種類によって異なるタンパク質組成を示した (Fig. 20)。牛乳中では 18kDa 付近にみられる  $\beta$ -LG のバンドは、本研究で解析したチーズからは検出されなかった。セミハードおよびハードタイプのチーズは、バンドの染色の濃淡に差はあるが類似したタンパク質組成を示し、14kDa および 20–30kDa 付近に複数のバンドが検出された。一方、ホワイトおよびブルータイプのチーズも、バンドの染色の濃淡に差はあるが類似したタンパク質組成を示した。このタイプのチーズからも 14kDa 付近のバンドが複数検出された。フレッシュタイプのチーズは 18kDa 付近の  $\beta$ -LG のバンドを除いて牛乳とよく似たバンドパターンを示した。

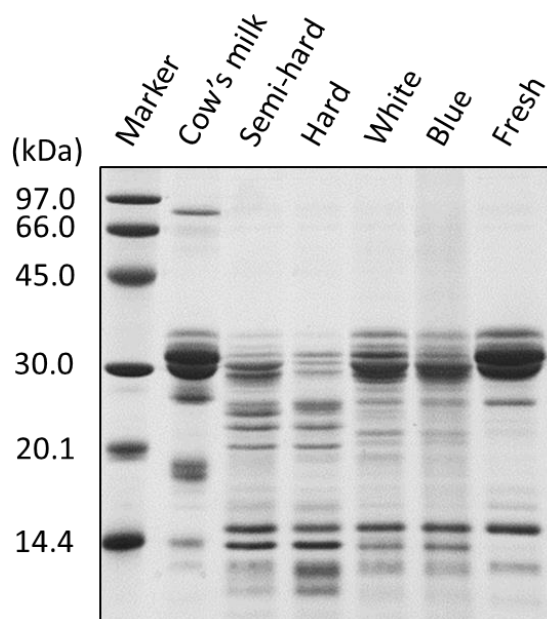


Figure 20. Protein composition of cheeses

### チーズ中の $\alpha$ <sub>S1</sub>-カゼインの性状

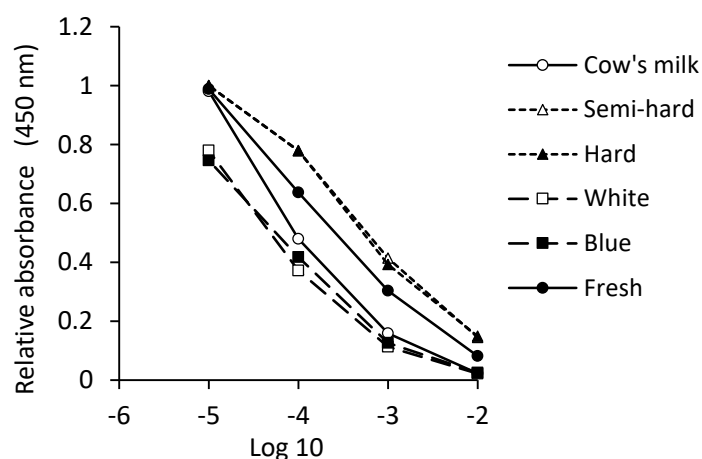
チーズの製造には凝乳酵素を取り除く工程として乳清排出がある。そこで、ホエータンパク質である  $\beta$ -LG の性状を解析した。その結果、全てのチーズ中の  $\beta$ -LG の量は牛乳中と比較して少なかった (データ示さず)。このことから、チーズ中のタンパク質は  $\beta$ -LG (ホ

エータンパク質)が減少した分、 $\alpha_{S1}$ -CNを含むCN画分は相対的に増加していると考えられる。

続いて、 $\alpha_{S1}$ -CNの性状を解析した。まず、PBSを用いて各試料からタンパク質を抽出し、抗 $\alpha_{S1}$ -CN抗血清を使用して阻害ELISAにて $\alpha_{S1}$ -CNの抗原性を解析した。その結果、セミハード、ハード、およびフレッシュタイプのチーズ中の $\alpha_{S1}$ -CNの抗原性は牛乳よりも低かった。ホワイトおよびブルータイプのチーズ中の $\alpha_{S1}$ -CNの抗原性は牛乳よりも高かった(Fig. 21)。以上の結果から、 $\alpha_{S1}$ -CNの抗原性はチーズの製造方法によって異なり、製造過程でチーズ中のタンパク質組成が変化したことが示唆された。

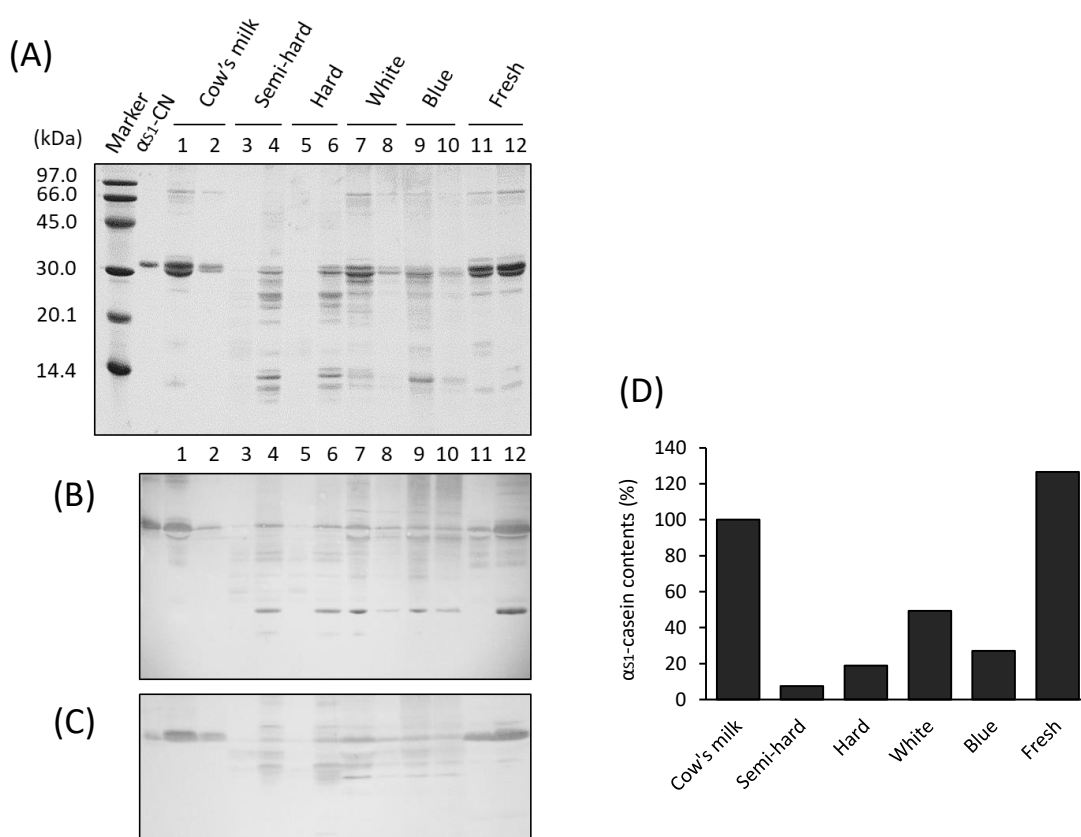
そこで、PBS抽出後の試料からSDS+urea溶液および2-ME溶液にてタンパク質を抽出し、SDS-PAGEおよびイムノブロットにて $\alpha_{S1}$ -CNの溶解性を解析した。まず、タンパク質の組成をSDS-PAGEにて確認した。その結果、チーズの種類によってタンパク質のバンドパターンと抽出画分が異なった(Fig. 22A)。なお、2-ME溶液抽出画分からはタンパク質が検出されなかった(データ示さず)。次に、抗 $\alpha_{S1}$ -CN抗血清を用いてイムノブロットを行った。その結果、セミハードおよびハードタイプのチーズのバンドパターンは類似した(Fig. 22B)。また、 $\alpha_{S1}$ -CNはほとんど分解されたことに加え、その大部分がSDS+urea溶液抽出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くなったと考えられる(Fig. 21)。ホワイトおよびブルータイプのチーズのバンドパターンは類似し、低分子領域に濃いバンドが検出された。さらに、SDS+urea溶液抽出画分よりPBS抽出画分の方が濃く検出された(Fig. 22B)。したがって、ホワイトおよびブルータイプのチーズ中の $\alpha_{S1}$ -CNは分解しているものの、その分解断片も含めてPBS抽出画分で検出されたため、 $\alpha_{S1}$ -CNの抗原性は牛乳中よりも高くなったと考えられる(Fig. 21)。

次に、分解されずに残った未分解の $\alpha_{S1}$ -CNを確認するために、抗 $\alpha_{S1}$ -CNモノクローナル抗体を使用してイムノブロットを行った。その結果、牛乳およびフレッシュタイプからは $\alpha_{S1}$ -CNが検出され、それ以外のタイプのチーズからは低分子領域に複数のバンドが検出された(Fig. 22C)。さらに、未分解の $\alpha_{S1}$ -CNの輝度を解析した結果、フレッシュタイプのチーズ中の $\alpha_{S1}$ -CNは牛乳中よりも高値を示した(Fig. 22D)。以上の結果から、フレッシュタイプを除くチーズ中の $\alpha_{S1}$ -CNは分解され、未分解の状態に残っている $\alpha_{S1}$ -CNは少ないことが明らかとなった。



**Figure 21. Antigenicity of  $\alpha_1$ -casein in cheese**

$\alpha_1$ -Casein in cheeses was detected by competitive ELISA using anti- $\alpha_1$ -CN antisera.



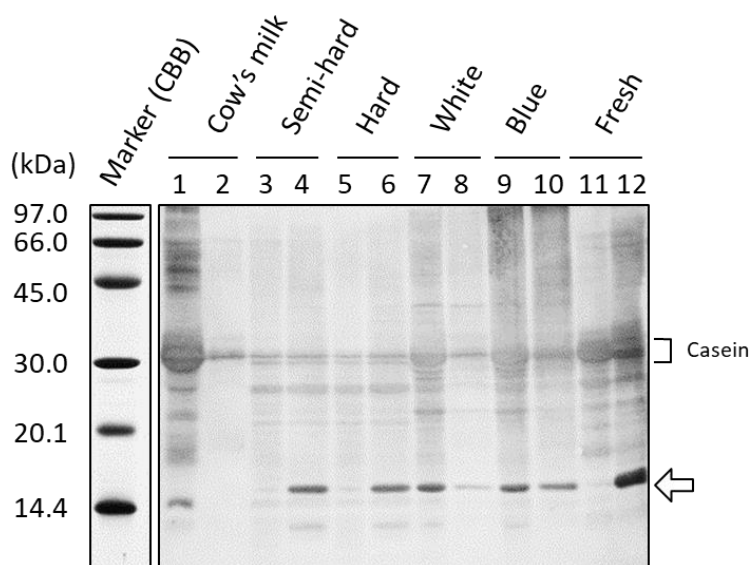
**Figure 22. Solubility of  $\alpha_1$ -casein and other proteins in cheeses**

Proteins in cheeses were detected by CBB (A) and  $\alpha_1$ -casein in cheeses was detected by immunoblotting (B and C). Immunoblotting were performed using anti- $\alpha_1$ -CN antisera (B) and anti- $\alpha_1$ -CN monoclonal antibody (C). Intact  $\alpha_1$ -casein was measured by densitometric analysis (D). Lane 1, 3, 5, 7, 9, and 11, the fraction extracted with PBS; lane 2, 4, 6, 8, 10, and 12, the fraction extracted with SDS+urea solution.



### チーズ中のタンパク質に対するヒト IgE 抗体反応性

牛乳アレルギー患者血清を用いてヒト IgE 抗体に認識されるタンパク質を検出した (Fig. 23)。検出されたバンドパターンはチーズの種類によって異なったが、全てのチーズで CN 画分だと推測される 30kDa 付近の位置にバンドが検出された。セミハードおよびハードタイプのチーズは全体的に薄く、検出されるバンドも少なかった。このことから、製造過程においてアレルゲンが分解もしくは除去されたと考えられる。また、 $\alpha_{S1}$ -CN の分解断片とは断定できないが、抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清を使用したイムノブロットで検出されたバンドと同じ位置に濃いバンドが検出された (矢印で示す)。このことから、たとえタンパク質の分解が進んだとしても、分解の程度によってはその分解断片もヒト IgE 抗体反応性タンパク質になりうるということが示唆された。



**Figure 23. Human IgE binding ability of proteins in cheeses**

IgE binding proteins in cheeses were detected by immunoblotting using pooled sera of patients with cow's milk allergy. Lane 1, 3, 5, 7, 9 and 11, the fraction extracted with PBS; lane 2, 4, 6, 8, 10, and 12, the fraction extracted with SDS+urea solution. Arrow indicates the putative proteolytic fragments of  $\alpha_{S1}$ -casein.

### 3-4 考察

本章では、市販ヨーグルトのタンパク質組成とその溶解性の解析、およびヒト IgE 抗体反応性タンパク質の検出を試みたが、牛乳およびヨーグルト A・B 間に違いはみられなかった。下橋と寺田 (2001) は、*Lactobacillus bulgaricus* および *Streptococcus thermophilus* の乳酸菌種を使用して発酵時間を変えたヨーグルトを作製し、 $\alpha_{S1}$ -CN (23.6kDa) を SDS-PAGE のみで評価した。その結果、 $\alpha_{S1}$ -CN は経時的に減少したと報告した。しかし、 $\alpha_{S1}$ -CN を特異的に検出しておらず、おそらく  $\kappa$ -CN と推測されるタンパク質を評価している可能性がある。

Yao ら (2015) は *Lactobacillus casei* 1134 を使用し、経時的に牛乳タンパク質を発酵させた結果、発酵時間が 24 時間を超えると  $\alpha$ -および  $\beta$ -CN の特異的 IgE 抗体の結合能 (ELISA) が約半分にまで低下したことを明らかにした。しかし、SDS-PAGE でタンパク質組成を確認したところ、 $\alpha$ -および  $\beta$ -CN のバンドパターンにほとんど変化がみられなかったと報告している。これらの結果は、発酵に伴う経時的な pH の低下が ELISA の評価に影響を及ぼしたと考えられ、実際には  $\alpha$ -および  $\beta$ -CN の量や IgE 抗体の結合能は乳酸発酵では変化しないと推測された。

そこで、本研究では牛乳およびヨーグルト A・B から PBS にてタンパク質を抽出し、特異的抗体を用いて  $\alpha_{S1}$ -CN の性状を解析した。本研究に使用した市販ヨーグルトに添加されていた乳酸菌は *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 または、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 および *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 1131 であり、これらの菌ではタンパク質組成の変化は確認できなかった。乳酸菌の種類や原料である牛乳の組成、発酵温度など様々な条件により牛乳タンパク質の組成が変化する可能性があるが、多くの場合、タンパク質が分解されてアレルゲン量が減少する前に「ヨーグルト」としての完成を迎えてしまうため、市販のヨーグルトでは低アレルゲン化は期待できないと考えられた。

チーズは、製造方法や水分含量によって分類され、セミハード、ハード、ホワイト、ブルー、フレッシュ、ウォッシュ、およびシェーブルタイプの 7 種類に大別される。本研究では、その中でも主に日本でよく喫食される、セミハード、ハード、ホワイト、ブルー、およびフレッシュタイプを試料に用いた。チーズの製造には凝乳酵素を取り除く工程として乳清排出があるため、チーズ中のホエータンパク質は牛乳中と比較して低下する。実際

に、ホエータンパク質である  $\beta$ -LG の量は牛乳中と比較して少なかった。そのため、相対的にタンパク質に占める CN 画分の割合は高くなると考えられる。

牛乳とチーズ中のタンパク質組成を比較した結果 (Fig. 22)、製造過程に熟成期間を持つチーズはタンパク質の分解が進み、熟成期間を持たないフレッシュタイプのチーズは、 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の分解断片はみられるものの、その他のタイプのチーズほどタンパク質の分解が進まなかったことが示された。Alessandri ら (2012) はハードタイプであるパルミジャーノ・レッジャーノにおいては、熟成期間が長くなるほど CN 画分のアレルゲン性が低下し、牛乳アレルギー患者の 58% が 3 年間熟成したパルミジャーノ・レッジャーノに対して寛容であったと報告している。凝乳酵素にはキモシン以外に僅かながらペプシンが含まれるが、チーズの製造におけるタンパク質の分解は熟成期間中に進行し、その主な原因は乳清排出の工程で完全には排出されずに残ったペプシンのプロテアーゼ活性によるものであると考えられた。そのため、Fig. 22 に示すように熟成期間をもつチーズは分解断片が検出され、未分解の  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN は牛乳中よりも低値を示したと考えられる。

また、ホワイトおよびブルータイプのチーズ中の抗  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN 抗血清に認識される  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の量 (IC<sub>50</sub>) は、セミハードおよびハードタイプのチーズよりも約 10 倍多かった (Fig. 21)。さらに、チーズの種類によってヒト IgE 抗体に認識されるタンパク質のバンドパターンが異なったため、牛乳アレルギー患者はタンパク質量だけでは判断せず注意して摂取する必要がある。

結論として、ヨーグルト中のタンパク質の組成および  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の性状、さらにヒト IgE 抗体反応性タンパク質は牛乳とほとんど変わらないが、チーズは種類によってはヒト IgE 抗体反応性タンパク質の含有量が異なることが示唆された。さらに、チーズ中のタンパク質の組成および  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の性状を解析した結果、セミハードおよびハードタイプのチーズ中の  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN は分解され、分解断片も含めてほとんどが不溶化していた。ホワイトおよびブルータイプのチーズ中の  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN は分解されていたが、分解断片を含めると抗  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN 抗血清に認識されるタンパク質は牛乳中よりも多かった。フレッシュタイプのチーズは牛乳とほとんど変わらないタンパク質組成を示したが、そのほとんどが不溶化していた。そのため、主に  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN に感作されるような重症牛乳アレルギー患者は、 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN を牛乳と同程度含むヨーグルトや、牛乳よりも多く含む可能性のあるホワイトおよびブルータイプのチーズの摂取には注意が必要である。一方で、セミハードおよびハードタイプのチーズは牛乳そのものよりも比較的安全に摂取できる可能性が示唆された。

## 第4章 副食材を伴う焼成による主要アレルゲンの性状の変化

### 4-1 目的

第3章では牛乳のみを加工した食品中のタンパク質の組成および $\alpha_{S1}$ -CNの性状を解析したが、牛乳を使用した加工食品には、様々な副食材を伴ったものも多い。その1つとして、パンやマフィン、ワッフルといった加工食品がある。これらの加工食品をここではベイクドミルク(BM)と呼ぶ。BMは牛乳と小麦粉を混捏し、加熱したものを指す。既製品では牛乳の代わりに脱脂粉乳(スキムミルク、SM)が使用されることが多い。臨床現場において、未加熱の牛乳の摂取ができない牛乳アレルギー患者でも、等量のタンパク質量を含むBMであれば摂取できるという症例が報告されている(Kimら, 2011)。この要因として、アレルゲンと小麦タンパク質間のSS結合による相互作用が関与していると考えられている。

タンパク質は加熱によって他のタンパク質と様々な相互作用を示す。その一つに、タンパク質中のCysが加熱によって他のタンパク質のCysとSS結合を形成することが挙げられる(Katoら, 2000; Luoら, 2016; Lambrechtら, 2017)。そのSS結合によるタンパク質間の相互作用の代表例が、小麦タンパク質のグルテンである(Shewryら, 2002)。グルテンは、小麦粉を水と共に混捏・加熱することで、グルテニン同士がSS結合して多量体を形成し、グリアジンが非共有結合する不溶性の複合体である。また、小麦粉と他の食品を共に混捏し加熱することで、グルテン形成時に他の食品中のタンパク質もSS結合を介して複合体を形成する。Katoら(2001)とShinら(2013)は、小麦粉と鶏卵を混捏し焼成することで、鶏卵の主要アレルゲンであるオボムコイドがグルテンとSS結合を形成することで不溶化し、アレルゲン性が低下すると報告した。

牛乳タンパク質においても加熱によるSS結合が報告されている(加藤, 2004; JangとSwaisgood, 1990; Anema, 2008)。加藤(2004)は、 $\beta$ -LGとグルテンは加熱により分子間でSS結合を形成し、 $\beta$ -LGの溶解性(抗原性)が低下することを報告した。一方で、牛乳と小麦粉を混捏・焼成したときの $\alpha_{S1}$ -CNの溶解性を含む性状は明らかにされていない。そのため、BMをCM-OITに取り入れるには安全性の根拠がない。

$\alpha_{S1}$ -CNはCysを持たないことから、グルテンとSS結合を形成することはないと思わ

れる。一方で、 $\alpha$ S1-CN はその会合性が pH やイオン強度に影響を受けることから、イオン結合を形成する可能性や、両親媒性構造のため疎水結合を形成する可能性がある（仁木と有馬, 1984）。そのため、 $\alpha$ S1-CN もグリアジンと同様に小麦タンパク質と非共有結合を起こす可能性が考えられた。そこで本章では、牛乳タンパク質とグルテンを混捏・焼成したときの、 $\alpha$ S1-CN の性状を解析することを目的とした。

## 4-2 実験材料および方法

### 材料

脱脂粉乳（skim milk、SM、雪印メグミルク株式会社）および片栗粉（スターチ、株式会社扇カネ安食品本舗）は市販のものを使用した。グルテンは富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。

### ベイクドミルクの作製

SM とグルテンは 1:0.25 (w/w) となるように混ぜた。その混合物 30g に純水 17ml を加え 2 分間混捏した後、オーブンで焼成（180℃、10 分）した。グルテンとの比較食材としてタンパク質を含まないスターチを選択し、同様に SM と混捏・焼成した。また、SM、副食材（スターチまたはグルテン）、および純水を混捏した後、焼成していないもの（non-baked milk、NBM）も用意した。SM のみで混捏したもの、SM とスターチを混捏したもの、および SM とグルテンを混捏したものを、それぞれ SM-NBM、S-NBM、および G-NBM と示す。これらを焼成したものを、それぞれ SM-BM、S-BM、および G-BM と示す。本研究では、小麦タンパク質が含まれていない試料も NBM もしくは BM と表記する。

さらに、SM と副食材の割合を 1:0.5、1:1、および 1:2 (w/w) となるように混捏し、NBM および BM を作製した。混捏する生地はいずれも粉末試料 30g に対して純水 17ml を加えて混捏した。

### Kjeldahl 法による粗タンパク質の定量

スターチおよびグルテン中のタンパク質量は Kjeldahl 法により定量した結果、粉末 100g 中にそれぞれ 0.1g および 76.9g であった。凍結乾燥後の NBM および BM 中の粗タ

ンパク質量も定量し、窒素-タンパク質換算係数は 6.38 とした。NBM および BM 中の牛乳タンパク質量は、混捏した割合から得られる理論値より算出した。

### 患者血清

第 2 章で解析した牛乳アレルギー患者のうち牛乳アレルギー患者 4 人のプール血清（ヒト IgE 抗体）を使用した。牛乳粗抗原、CN、 $\alpha$ -LA、および  $\beta$ -LG 特異的 IgE 抗体価の平均値はそれぞれ 91.4、91.1、54.7、および 37.9 U<sub>A</sub>/ml であり、牛乳負荷試験は 0.0ml であった。また、小麦アレルギー陰性であり、小麦粗抗原および  $\omega$ 5-グリアジン特異的抗体価の平均値はそれぞれ 2.42 および 0.31 U<sub>A</sub>/ml であった。

### タンパク質の抽出

第 3 章と同様の方法でタンパク質の抽出を行った。

### 阻害 ELISA による抗原性とヒト IgE 抗体結合能の解析

第 3 章と同様の方法で試料中の  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN の抗原性を阻害 ELISA にて解析した。

さらに、試料中のタンパク質の IgE 抗体結合能を解析するために、ヒト IgE 抗体を用いて阻害 ELISA を行った。固相抗原には  $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN および牛乳粗抗原（10 $\mu$ g/ml PBS）を用いた。ブロッキング溶液には PFBB-T を用いた。一次抗体として牛乳アレルギー患者血清、二次抗体として ALP-conjugated anti-human IgE を使用し、PFBB-T でそれぞれ 1:10 および 1:1000 に希釈した。発色基質には PNPP を用い、1N 水酸化ナトリウムにて反応を停止した。マイクロプレートリーダー-SH-1000 にて波長 405nm の吸光度を測定した。

### SDS-PAGE によるタンパク質組成の解析とイムノブロットによる $\alpha$ <sub>S1</sub>-カゼインの検出

第 3 章と同様の方法で SDS-PAGE およびイムノブロットを行った。

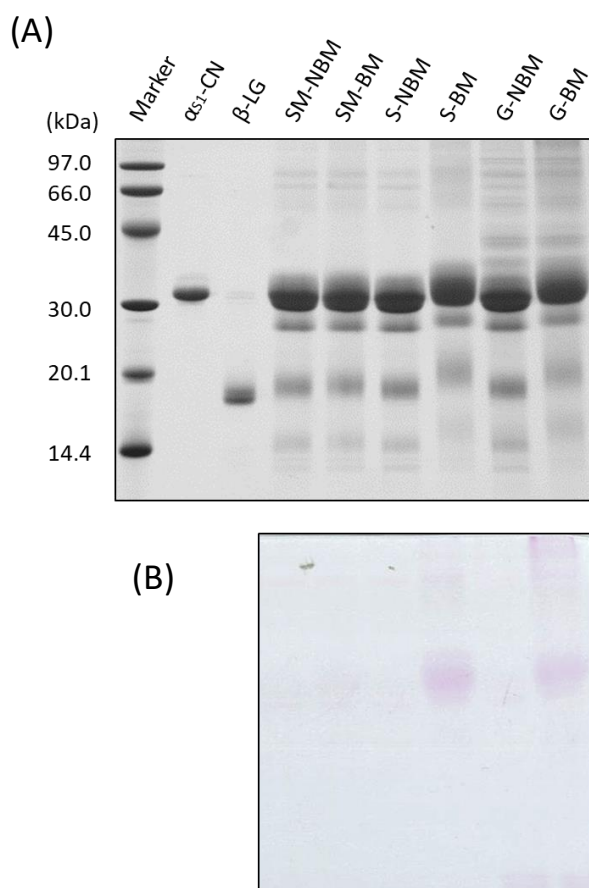
### Periodic acid-Schiff (PAS) 染色による糖の検出

タンパク質は加熱により糖が付加（グリケーション）する可能性があるため（新本ら, 2013）、SDS-PAGE 後のゲルを用いて PAS 染色にて糖を検出した。PAS 染色は、GlycoGel Stain Kit (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) を用いて、その説明書に準じて行った。

## 4-3 結果

### 副食材の存在と焼成による牛乳タンパク質の性状の変化

試料中の全タンパク質を 2-ME 溶液を用いて抽出し、そのタンパク質組成を SDS-PAGE にて解析した。その結果、S-BM および G-BM 中の牛乳タンパク質のバンドは、シフトアップし、さらにスメアになった (Fig. 24A)。この原因を明らかにするために、同じ試料を用いて PAS 染色を行った。その結果、S-BM および G-BM 中のバンドが検出された (Fig. 24B)。これらの結果から、焼成により S-BM および G-BM 中の牛乳タンパク質と糖との間にメイラード反応が生じ、グリケーションしたと考えられる。



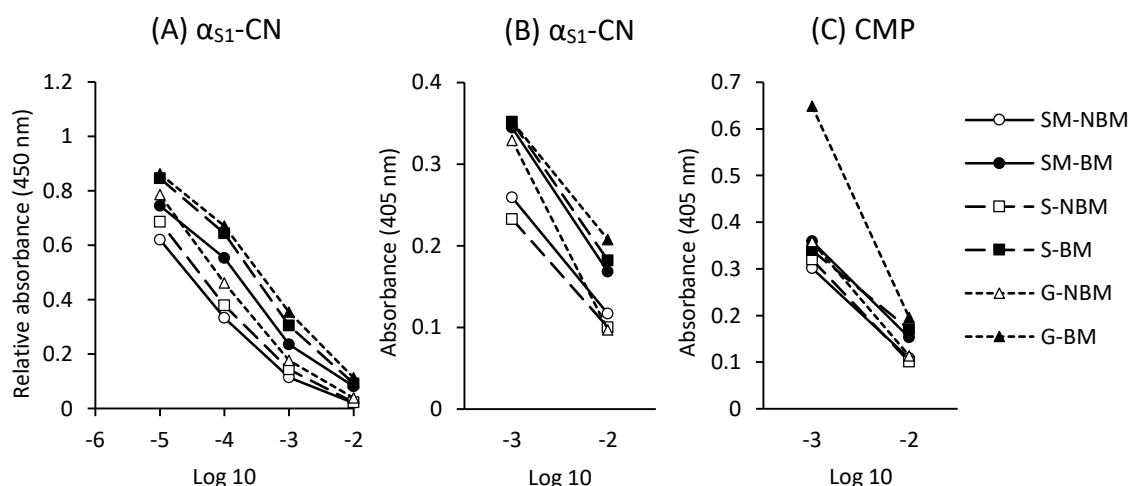
**Figure 24. Protein composition of non-baked and baked milk**

Proteins were detected by CBB (A) and glycoproteins were detected by PAS (B). Abbreviations; SM, skim milk; S, starch; G, gluten; NBM, non-baked milk; BM, baked milk.

### $\alpha_{S1}$ -カゼインの抗原性およびヒト IgE 抗体結合能の変化

S-BM および G-BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN のアミノ酸の一部 (Lys、Arg、Trp など) がグリケーションしたことで、抗体に認識されにくくなる (抗原性または IgE 抗体結合能が低下する) ことが考えられた。抗体は、その種類によって同一抗原を認識するエピトープとなるアミノ酸配列が異なる。そこで、各試料中の  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性および IgE 抗体結合能について、抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清 (rabbit) 中の IgG 抗体および牛乳アレルギー患者血清中の IgE 抗体をそれぞれ使用した阻害 ELISA にて解析した。まず、PBS を用いて各試料からタンパク質を抽出し、 $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性を解析した (Fig. 25A)。その結果、BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性は NBM と比較して低下した。また、S-BM および G-BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性は SM-BM と比較して僅かに低下した。また、S-BM および G-BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性 (IC<sub>50</sub>) は、SM と比較して約 1/10 に低下したことが明らかとなった。次に、 $\alpha_{S1}$ -CN の IgE 抗体結合能を解析した (Fig. 25B)。その結果、全ての試料においてヒト IgE 抗体に認識される  $\alpha_{S1}$ -CN は焼成によって減少したが、副食材による差は僅かであった。

また、加工によって  $\alpha_{S1}$ -CN 以外のタンパク質のヒト IgE 抗体結合能が変化していることも考えられるため、 $\alpha_{S1}$ -CN を含む全牛乳タンパク質のヒト IgE 抗体結合能も同様に解析した (Fig. 25C)。その結果、全牛乳タンパク質の IgE 抗体結合能は焼成後、特に G-BM において減少した。



**Figure 25. Antigenicity and IgE binding ability of  $\alpha_{S1}$ -casein and CMP**

$\alpha_{S1}$ -Casein (A and B) and CMP (C) in NBM and BM were detected by competitive ELISA using anti- $\alpha_{S1}$ -CN antisera (A) and pooled sera of patients with cow's milk allergy (B and C). Abbreviations; CMP, cow's milk protein; SM, skim milk; S, starch; G, gluten; NBM, non-baked milk; BM, baked-milk.

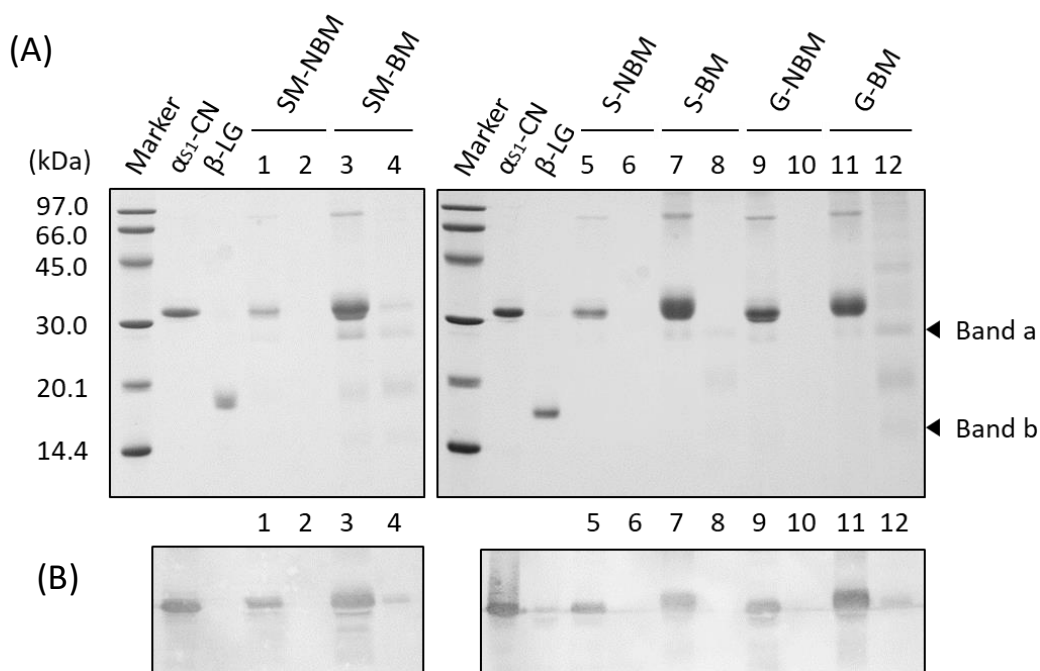


### $\alpha_{S1}$ -カゼインの溶解性の変化

$\alpha_{S1}$ -CN の抗原性および IgE 抗体結合能を解析した結果、SM をスターチもしくはグルテンと混捏・焼成することによって低下したが、グリケーションがみられなかった SM-NBM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN も焼成することで低下した。したがって、 $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性およびアレルギー性が低下した原因の一つに、焼成による凝集・不溶化が考えられた。そこで、PBS 抽出後の試料から SDS+urea 溶液および 2-ME 溶液にてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびイムノブロットにて解析した。まず、タンパク質の組成を SDS-PAGE にて確認した。その結果、BM 中の CBB 染色されたタンパク質バンドは NBM と比較して濃く検出された (Fig. 26A)。また、 $\kappa$ -CN (band a) と  $\alpha$ -LA (band b) だと推定されるバンドは、SM-BM および G-BM の 2-ME 溶液抽出画分 (lane 4 および 12) において検出された。さらに、抗  $\beta$ -LG 抗血清を使用してイムノブロットを行った結果 (データ示さず)、2-ME 溶液抽出画分から検出され、加藤 (2004) が報告した結果と同じことが確認された。また、CBB 染色で検出された  $\kappa$ -CN や  $\alpha$ -LA は、Cys を持つことからグルテンと SS 結合を形成することが示唆された。

$\kappa$ -CN は CN ミセルの外側に  $\alpha_{S1}$ -、 $\alpha_{S2}$ -、および  $\beta$ -CN を覆うように存在する。 $\alpha_{S1}$ -CN は Cys 残基を持たず SS 結合を形成しないが、 $\kappa$ -CN がグルテンと SS 結合を形成しグルテン中に取り込まれる結果、CN ミセル中に存在する  $\alpha_{S1}$ -CN も不溶化する可能性が考えられた。そこで、抗  $\alpha_{S1}$ -CN 抗血清を使用したイムノブロットを行った (Fig. 26B)。まず、NBM と BM を比較した結果、NBM および BM 共に SDS+urea 溶液抽出画分から  $\alpha_{S1}$ -CN が検出されたが、特に BM の方が濃く検出された。このことから、 $\alpha_{S1}$ -CN は純水と混捏するだけで、PBS では完全に抽出されず、加えて焼成によりさらに不溶化することが明らかとなった。次に、SS 結合を形成していると考えられる 2-ME 溶液抽出画分を比較した結果、 $\alpha_{S1}$ -CN は Cys を持たないにも関わらず、G-BM において非常に薄いバンドが検出された。このことから、 $\alpha_{S1}$ -CN は SM とグルテンを混捏・焼成することで、グルテン中に取り込まれ SS 結合を切断しないと抽出されない状態に不溶化したことが示唆された。しかし、バンドは SDS+urea 溶液抽出画分より 2-ME 溶液抽出画分の方が薄かったことから、CN ミセル全てが  $\kappa$ -CN を介してグルテンと SS 結合を形成し不溶化することは考えにくい。小麦加工食品中では、非共有結合でグルテンを形成するグリアジンも 2-ME 溶液抽出画分で検出されることから (田中ら, 2017)、一部の  $\alpha_{S1}$ -CN がグリアジンと同様に非共有結合によりグルテンに取り込まれることで、SDS+urea 溶液では抽出しきれなかったと推測され

た。一方で、SM-BM においても 2-ME 溶液抽出画分から検出された。これらの結果から、 $\alpha_{S1}$ -CN はグルテンだけでなく他の牛乳タンパク質と非共有結合を形成することで、複雑に凝集し不溶化することが示唆された。S-BM の 2-ME 溶液抽出画分で  $\alpha_{S1}$ -CN が検出されなかったのは、スターチにタンパク質がほとんど含まれないためタンパク質の割合が SM-BM および G-BM 中と比較して低く、タンパク質同士の凝集が起こりにくいためだと考えられた。このように、 $\alpha_{S1}$ -CN は試料中のタンパク質量に依存して複雑に凝集し不溶化すると考えられた。

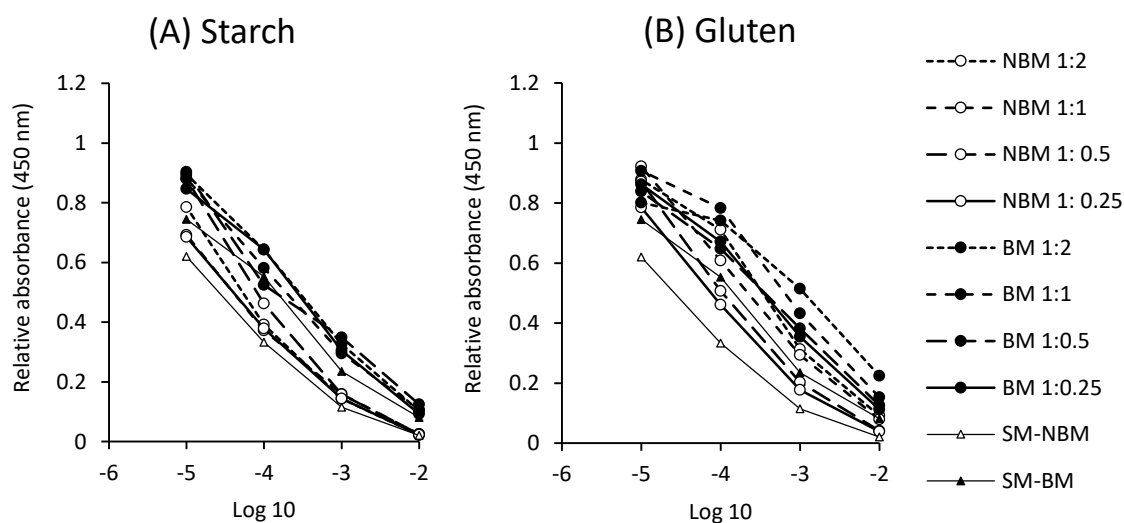


**Figure 26. Solubility of  $\alpha_{S1}$ -casein and other proteins in each baked milk sample**

Proteins were stained by CBB (A).  $\alpha_{S1}$ -Casein was detected from each sample using anti- $\alpha_{S1}$ -CN antisera (B). Band (a) and (b) indicate the putative  $\kappa$ -casein (a) and  $\alpha$ -lactalbumin (b). Lane 1, 3, 5, 7, 9, and, 11, the fraction extracted with SDS+urea solution. Lane 2, 4, 6, 8, 10, and 12, the fraction extracted with 2-ME solution. Abbreviations; SM, skim milk; S, starch; G, gluten; NBM, non-baked milk; BM, baked-milk.

## 牛乳タンパク質と副食材の割合変化による $\alpha_{S1}$ -カゼインの抗原性に及ぼす影響

$\alpha_{S1}$ -CN の凝集・不溶化には他のタンパク質との相互作用が大きく影響しており、試料中のタンパク質量および  $\alpha_{S1}$ -CN と他のタンパク質の存在比率が重要な因子ではないかと考えられた。そこで、SM と副食材の割合が異なる場合の抗原性の変化を評価した。これまでは、SM と副食材の割合が 1:0.25 となるように作製したが、この実験では 1:0.5、1:1、1:2 となるように作製し、試料中の PBS 抽出画分の  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性を阻害 ELISA にて解析した (Fig. 27)。副食材にグルテンを用いた場合、試料に占めるグルテンの割合が高くなるほど、 $\alpha_{S1}$ -CN は減少した。副食材にスターチを用いた場合、試料に占めるスターチの割合が高くなっても  $\alpha_{S1}$ -CN の量にほとんど変化がみられなかった。このことから、SM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN は焼成により不溶化するが、その不溶化の程度はグルテンの存在下で増加することが示唆された。



**Figure 27. Antigenicity of  $\alpha_{S1}$ -casein in samples with varying ratios of SM to food ingredients**

A and B show inhibition curves of  $\alpha_{S1}$ -casein upon varying the ratio of SM to food matrix. The dry weight ratios of SM:food ingredients are shown as 1:2, 1:1, 1:0.5, and 1:0.25. Abbreviations; SM, skim milk; NBM, non-baked milk; BM, baked-milk.

#### 4-4 考察

本章では、牛乳タンパク質と副食材（スターチまたはグルテン）を混捏・焼成したときの、 $\alpha_{S1}$ -CN の性状を溶解性の点で解析した。その結果、 $\alpha_{S1}$ -CN は焼成によって抗原性およびアレルギー性が低下し、それは溶解性が低下（不溶化）することに起因した。また、不溶化はグルテンの存在下でより促進することが明らかとなった。

牛乳アレルギーの加工による溶解性や構造などの状態の変化においては、これまでに  $\beta$ -LG について検討した結果が報告されている。 $\beta$ -LG は分子内に 5 残基の Cys を持ち、そのうち 4 残基が 2 組の SS 結合を形成し立体構造をとる。牛乳において温度の異なる加熱殺菌処理を行ったところ、 $\beta$ -LG の消化性が異なった（坂井ら, 1998）。これは、加熱による構造変化が消化性に影響を及ぼしたと考えられる。また、牛乳中の  $\beta$ -LG は 70°C で変性し、74°C を超える温度で IgE 抗体結合能が低下する（Ehn ら, 2004）。このように、立体構造をとるタンパク質は、変性することで構造的エпитープが消失し、アレルギー性が低下する可能性がある。一方で、 $\alpha_{S1}$ -CN は立体構造をとらず、加熱による構造または抗原性およびアレルギー性の変化は報告されていない。そのため、 $\alpha_{S1}$ -CN の低アレルギー化においては、消化酵素による IgE エピトープの分解、グリケーションによる IgE エピトープの消失、もしくは不溶化することが有効だと考えられる。

坂井ら（1998）は、全ての加熱殺菌牛乳において、 $\beta$ -LG の消化性に差はみられたが溶解性に差はみられなかったと報告した。一方で、本研究で用いた全ての試料は焼成により牛乳タンパク質（ $\alpha_{S1}$ -CN および  $\beta$ -LG）が不溶化した。これらの結果から、牛乳タンパク質が不溶化するためには焼成する必要があるとあり、 $\alpha_{S1}$ -CN は特にグルテンと共に混捏・焼成することでより不溶化し、アレルギー性が低下すると考えられる。

SM を副食材とともに混捏・焼成したときの牛乳タンパク質の組成を解析した結果、牛乳タンパク質は、スターチまたはグルテンと混捏し、オープンにて焼成（180°C、10 分）することでグリケーションすることが明らかとなった。Yang ら（2018）はオボアルブミン（OVA）がグリケーションした時の IgG 抗体結合能（抗原性）および IgE 抗体結合能を解析し、グリケーションした OVA は IgG 抗体および IgE 抗体結合能が低下することを示した。本研究では、焼成後 IgE 抗体の結合能は低下し、グリケーションがみられなかった SM-BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN と、グリケーションがみられた S-BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN の IgE 抗体結合能の差は僅かであった。したがって、 $\alpha_{S1}$ -CN の IgE 抗体結合能の低下は不溶化によると

考えられた。以上のことから、グリケーションは  $\alpha_{S1}$ -CN の不溶化に伴う IgE 抗体結合能の低下にほとんど影響を与えないことが示唆された。

本研究では牛乳タンパク質とグルテンの割合を変えて、BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性を検討した。その結果、1:0.25 と圧倒的に牛乳タンパク質の割合がグルテンより高くても、焼成することで  $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性は低下し不溶化していた。さらに、グルテンの割合が増加するほど抗原性は低下した。一般的な BM (パンやマフィン) の牛乳タンパク質とグルテンの割合は 1:2 である。したがって、市販の BM 中の牛乳タンパク質とグルテンの割合が 1:2 からたとえ僅かに異なったとしても、市販の BM 中の  $\alpha_{S1}$ -CN は不溶化し抗原性は低下していると考えられる。

結論として、 $\alpha_{S1}$ -CN の抗原性および IgE 抗体結合能は焼成することで減少し、それはタンパク質同士による凝集・不溶化に起因していた。また、 $\alpha_{S1}$ -CN はグルテンの割合が高いほど不溶化することが示唆された。また、 $\kappa$ -CN、 $\beta$ -LG、および  $\alpha$ -LA を含む牛乳粗抗原は、G-BM 中では顕著に不溶化した。これらの結果から、 $\alpha_{S1}$ -CN を含む牛乳タンパク質は、グルテンを含む副食材と混捏・焼成することで不溶化し、低アレルギー化につながることを示唆された。

したがって、主に  $\beta$ -LG に感作された牛乳アレルギー患者に限らず、主に  $\alpha_{S1}$ -CN に感作されるような重症牛乳アレルギー患者においても、BM は牛乳そのものよりは安全に摂取できると考えられる。

## 第5章 総合考察

本研究は CM-OIT の対象となる重症牛乳アレルギー患者が牛乳加工食品を利用しやすくなるためのエビデンスを確立するために、CM-OIT を受ける重症牛乳アレルギー患者の牛乳摂取可能量のマーカーとなるアレルゲンを同定し、そのタンパク質の牛乳加工食品中における性状を解析した。

第 2 章では、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体価が最も高値を示すことが明らかとなった。さらに、 $\alpha_{S1}$ -CN 特異的 IgE 抗体が好塩基球を活性化させ、免疫応答を介し症状を誘発することが示唆された。これらのことから、CM-OIT のマーカーとなる主要アレルゲンの一つとして  $\alpha_{S1}$ -CN を同定した。そこで、第 3 章および第 4 章では、牛乳加工食品中のタンパク質の性状を、特に  $\alpha_{S1}$ -CN に焦点を当てて解析した。

一般的に、アレルゲンは水・塩溶性である（日本小児アレルギー学会, 2018）。また、アレルゲンは IgE 抗体に認識されるエピトープを持つ。エピトープには、連続したアミノ酸配列を認識する連続性エピトープと、立体構造をとることで近接した不連続のアミノ酸を認識する構造的エピトープが存在する。構造的エピトープは、タンパク質の変性によって立体構造が変化することで、IgE 抗体に認識されなくなる可能性がある。 $\alpha_{S1}$ -CN は立体構造をとりにくいタンパク質であり、加熱や酸による構造変化は報告されていない。そのため、 $\alpha_{S1}$ -CN に対する IgE 抗体結合能が低下するには、酵素分解による連続性エピトープの消失、もしくは凝集・凝固による不溶化以外に考えにくい。

牛乳に乳酸菌を接種してつくられるヨーグルトは、 $\alpha_{S1}$ -CN を含むタンパク質の組成や溶解性、さらには IgE 抗体結合能といった性状も牛乳と変わらなかった。そのため、ヨーグルトのアレルゲン性は牛乳と変わらない可能性が示唆された。チーズは凝乳酵素を使用することと、その凝乳酵素を排出（乳清排出）することで牛乳のタンパク質組成とは大きく異なった。全てのチーズにおいて、乳清排出することでタンパク質に占める CN 画分の割合が増加することが考えられた。また、熟成によりタンパク質の分解が生じたり、製造工程によっては不溶化したりするため、セミハードおよびハードタイプのチーズ中の IgE 抗体に認識されるタンパク質は牛乳と比較して減少していた。一方で、ホワイトおよびブルータイプのチーズはタンパク質が分解していたが、その分解断片も特異的抗体に認識される可能性がある。牛乳を副食材と混捏・焼成した BM においては、Cys をもたない  $\alpha_{S1}$ -CN

も不溶化した。さらに、 $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN を含む牛乳粗抗原の IgE 抗体結合能は、グルテンとともに混捏・焼成することで著しく減少した。

以上の結果より、牛乳は加工することで、必ずしもアレルギー性が低下するということではなく、加工食品によっては牛乳とほとんど変わらないヨーグルトや、 $\alpha$ s<sub>1</sub>-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、 $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN の分解や不溶化が生じており、牛乳そのものよりは安全に摂取できると考えられる。

最近では OIT 導入前の食事管理として原因食品の完全除去ではなく、微量抗原を含む食事を積極的に取り入れることで早期に耐性獲得を誘導することができると報告されてきた (Okada ら, 2015; Okada ら, 2016)。さらに Yanagida ら (2015) は、早期の耐性獲得は目標とせず安全性を確保できる微量経口免疫療法でも、治療効果が得られると報告した。これらの研究結果から、OIT による耐性獲得にはアレルギーの量よりも、アレルギーによって免疫系が刺激されることが重要だと考えられる。

さらに、鶏卵や小麦アレルギーに対する OIT と比較して CM-OIT の治療効果は低いことが報告された (Sato ら, 2014)。この原因は未だ明らかではないが、牛乳のみ液体であることや、未加工であることなどが考えられた。鶏卵や小麦を OIT に使用する際は、固ゆで卵白やうどんを使用する。本研究室では、固ゆで卵白やうどん中のほとんどの水・塩溶性タンパク質は不溶化していることを見出している。本研究において BM 中の  $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN は不溶化していることが明らかとなった。さらに、最近では牛乳アレルギー患者の食事に BM を早期に取り入れることで、未加熱の牛乳に対して耐性獲得しやすくなったと報告された (Lambert ら, 2017; Nowak-Węgrzyn ら, 2018; Esmaeilzadeh ら, 2018)。このように、BM は CM-OIT の治療効果を向上させる可能性がある。不溶化したタンパク質は吸収量が低下すると推測されるが、少なからず耐性獲得に働くほどの抗原 (アレルギー) 量が吸収されているのではないかと考えられる。BM 以外にもセミハードおよびハードタイプのチーズ中の  $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN も抗原性が低いが、乳清排出やタンパク質の分解によりタンパク質の組成が牛乳そのもののタンパク質組成と異なる。この点において、BM 中の  $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN を含むタンパク質は不溶化するもののタンパク質の組成は変わらず、タンパク質の組成が異なるセミハードおよびハードタイプのチーズが CM-OIT の治療効果を向上させるかどうかは不明である。一方で、OIT の治療効果の向上が、アレルギーの不溶化、もしくはアレルギー

ンの吸収量の低下に起因するかどうかは明らかではなく、今後の検討課題である。この BM 中のタンパク質の不溶化と、CM-OIT の治療効果の向上の関係を明らかにすることができれば、他の食物アレルギーの治療や食品加工に応用することができると思う。

また、一部の牛乳アレルギー患者においては少量の牛乳でも口腔内違和感をもつことから、そもそも OIT を施行することが困難な症例が多い。しかし、最近では口腔内違和感を軽減させるために BM を使用する施設が増えてきた。この口腔内違和感も食品中のアレルギーの溶解性が起因しているのではないかと推測される。この口腔内違和感を軽減できる点においても、BM が CM-OIT に有効だと考える。

本研究は牛乳加工食品中の主要アレルギーの性状を解析した。牛乳アレルギーは自然寛解が得られやすい食物アレルギーであるものの、一部には重症度が高く遷延する患者が存在する。そのような患者に対しては OIT で治療し、厳密な食事管理で対応する。本研究の成果は、そのような牛乳アレルギー患者に対する加工食品の利用において一助となると考える。



## 参考文献

- 小野伴忠. 乳タンパク質におけるカルシウム動態とその応用. ミルクサイエンス. 54: 53-62 (2005).
- 加藤保子. スキムミルク添加パンの調製時における  $\beta$ -ラクトグロブリンの不溶化：可溶性タンパク質画分における抗原性の低減化とペプシン消化による非再可溶化の検証. ミルクサイエンス. 53: 141-147 (2004).
- 厚生労働科学研究班. 食物アレルギーの診療の手引き 2014. (2015).
- 坂井堅太郎, 中尾友宣, 真鍋祐之. 市販加熱殺菌牛乳に含まれる  $\beta$ -ラクトグロブリンのペプシンおよびパンクレアチンによる消化性と消化後の抗原性の変化. 日本小児アレルギー学会誌. 12: 72-79 (1998).
- 下橋淳子, 寺田和子. 発酵によるアレルギー性乳たんぱく質の減少について. 日本食生活学会誌. 12: 62-67 (2001).
- 消費者庁. 平成 30 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書. (2019).
- 新本洋士, 市川由佳里, 永田沙織, 三浦愛美, 長縄康範, 石川祐子. 牛乳アレルギータンパク質のステンレストレー上での加熱反応生成物. 日本食品科学工学会誌. 60: 233-236 (2013).
- 田中賀治代, 蟹江悠紀, 内藤宙大, 鈴木美沙, 榎村春江, 田上和憲, 酒井一徳, 古田朋子, 山田千佳子, 和泉秀彦, 横大路智治, 松尾裕彰, 伊藤浩明. 加工食品における小麦タンパク質の不溶化とアレルギー性の変化について. アレルギー. 66: 222-230 (2017).
- 仁木良哉, 有馬俊六郎. 牛乳カゼイン—その構造的特徴を中心として. 化学と生物. 22: 219-227 (1984).
- 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会. 食物アレルギー診療ガイドライン 2016 《2018年改正版》. 協和企画. (2018).
- 長谷川実穂, 今井孝成, 林典子, 柳田紀之, 小俣貴嗣, 佐藤さくら, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏. 不適切な食物除去が食物アレルギー患児と保護者に与える影響. 日本小児アレルギー学会誌. 25: 163-173 (2011).

- 三浦孝之, 阿久澤良造. 乳酸菌がチーズの製造と品質に及ぼす影響. 日本乳酸菌学会誌. 22: 93-99 (2011).
- 文部科学省. 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) . (2018).
- 柳田紀之, 箕浦貴則. 多品目の食物除去が身長に及ぼす影響. 日本小児アレルギー学会誌. 27: 721-724 (2013).
- Ah-Leung S, Bernard H, Bidat E, Paty E, Rancé F, Scheinmann P, Wal JM. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy*. 61: 1358-1365 (2006).
- Alessandri C, Sforza S, Palazzo P, Lambertini F, Paoletta S, Zennaro D, Rafaianni C, Ferrara R, Bernardi ML, Santoro M, Zuzzi S, Giangrieco I, Dossena A, Mari A. Tolerability of a fully matured cheese in cow's milk allergic children: biochemical, immunochemical, and clinical aspects. *PLoS One*. 7: e40945 (2012).
- Anema SG. On heating milk, the dissociation of kappa-casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. *J Dairy Res*. 75: 415-421 (2008).
- Bai WL, Yin RH, Dou QL, Jiang WQ, Zhao SJ, Ma ZJ, Luo GB, Zhao ZH. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a yak (*Bos grunniens*)  $\kappa$ -casein cDNA from lactating mammary gland. *Mol Biol Rep*. 38: 2711-2718 (2011).
- Baur X, Posch A. Characterized allergens causing bakers' asthma. *Allergy*. 53: 562-566 (1998).
- Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo CA Jr, Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FE, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM; NIAID-Sponsored Expert Panel. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *J Allergy Clin Immunol*. 126: 1105-1118 (2010).
- Bühring HJ, Streble A, Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 133: 317-329 (2004).

- Burton OT, Tamayo JM, Stranks AJ, Koleoglou KJ, Oettgen HC.** Allergen-specific IgG antibody signaling through FcγRIIb promotes food tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 141: 189-201.e3 (2018).
- Busse PJ, Järvinen KM, Vila L, Beyer K, Sampson HA.** Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 129: 93-96 (2002).
- Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, Lin J, Bardina L, Dieguez MC, Wang J, Muriel A, de la Hoz B, Sampson HA.** Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol.* 122: 589-594 (2008).
- Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA.** Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 107: 379-383 (2001a).
- Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA.** Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 31: 1256-1262 (2001b).
- Cong Y, Yi H, Qing Y, Li L.** Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes on αs1-casein by alanine scanning analysis. *J Dairy Sci.* 96: 6870-6876 (2013).
- Ebisawa M, Shibata R, Sato S, Borres MP, Ito K.** Clinical utility of IgE antibodies to ω-5 gliadin in the diagnosis of wheat allergy: a pediatric multicenter challenge study. *Int Arch Allergy Immunol.* 158: 71-76 (2012).
- Ebisawa M, Movérare R, Sato S, Borres MP, Ito K.** The predictive relationship between peanut- and Ara h 2-specific serum IgE concentrations and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 3: 131-132.e1 (2015).
- Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T; Committee for Japanese Pediatric Guideline for Food Allergy, The Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology, The Japanese Society of Allergology.** Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergol Int.* 66: 248-264 (2017).

- Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S.** Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *J Agric Food Chem.* 52: 1398-1403 (2004).
- Elizur A, Appel MY, Goldberg MR, Yichie T, Levy MB, Nachshon L, Katz Y.** Clinical and laboratory 2-year outcome of oral immunotherapy in patients with cow's milk allergy. *Allergy.* 71: 275-278 (2016).
- Esmaeilzadeh H, Alyasin S, Haghghat M, Nabavizadeh H, Esmaeilzadeh E, Mosavat F.** The effect of baked milk on accelerating unheated cow's milk tolerance: A control randomized clinical trial. *Pediatr Allergy Immunol.* 29: 747-753 (2018).
- Gell PGH, Coombs RRA.** The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology.* 317-337 (1963).
- Halliday JA, Bell K, Shaw DC.** The complete amino acid sequence of feline beta-lactoglobulin II and a partial revision of the equine beta-lactoglobulin II sequence. *Biochim Biophys Acta.* 1077: 25-30 (1991).
- Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Civaj V, Balic N, Nystrand M, Härlin A, Thalhamer J, Scheiblhofer S, Keller W, Pavkov T, Zafred D, Niggemann B, Quirce S, Mari A, Pauli G, Ebner C, Papadopoulos NG, Herz U, van Tol EA, Valenta R, Spitzauer S.** Visualization of clustered IgE epitopes on alpha-lactalbumin. *J Allergy Clin Immunol.* 125: 1279-1285.e9 (2010).
- Igarashi Y.** Separation of caseins by chemical procedures. *Int Dairy J.* 9: 377-378 (1999).
- Ito K, Futamura M, Movérare R, Tanaka A, Kawabe T, Sakamoto T, Borres MP.** The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clin Mol Allergy.* 10: 1 (2012).
- Jang HD, Swaisgood HE.** Disulfide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein in casein micelles. *J dairy Sci.* 73: 900-904 (1990).
- Järvinen KM, Geller L, Bencharitiwong R, Sampson HA.** Presence of functional, autoreactive human milk-specific IgE in infants with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy.* 42: 238-247 (2012).
- Jensen VB, Jørgensen IM, Rasmussen KB, Mølgaard C, Prahl P.** Bone mineral status in children with cow milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 15: 562-565 (2004).

- Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, Shreffler WG, Steele P, Henry KA, Adair M, Francis JM, Durham S, Vickery BP, Zhong X, Burks AW.** Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 124: 292-300.e1-97 (2009).
- Kanda Y.** Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48: 452-458 (2013).
- Kato Y, Watanabe H, Matsuda T.** Ovomuroid rendered insoluble by heating with wheat gluten but not with milk casein. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 198-201 (2000).
- Kato Y, Oozawa E, Matsuda T.** Decrease in antigenic and allergenic potentials of ovomucoid by heating in the presence of wheat flour: dependence on wheat variety and intermolecular disulfide bridges. *J Agric Food Chem.* 49: 3661-3665 (2001).
- Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, Steele P, Driggers S, Burks AW, Wood RA.** The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 129: 448-455.e1-5 (2012).
- Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson HA.** Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol.* 128: 125-131.e2 (2011).
- Komata T, Söderström L, Borres MP, Tachimoto H, Ebisawa M.** The predictive relationship of food-specific serum IgE concentrations to challenge outcomes for egg and milk varies by patient age. *J Allergy Clin Immunol.* 119: 1272-1274 (2007).
- Komata T, Söderström L, Borres MP, Tachimoto H, Ebisawa M.** Usefulness of wheat and soybean specific IgE antibody titers for the diagnosis of food allergy. *Allergol Int.* 58: 599-603 (2009).
- König S, Altendorfer I, Saenger T, Bleck E, Vordenbäumen S, Schneider M, Jose J.** Ser71 of  $\alpha$ S1-casein is phosphorylated in breast milk-Evidence from targeted mass analysis. *Mol Nutr Food Res.* 61: 1700496 (2017).
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685 (1970).
- Lambert R, Grimshaw KEC, Ellis B, Jaitly J, Roberts G.** Evidence that eating baked egg or milk influences egg or milk allergy resolution: a systematic review. *Clin Exp Allergy*. 47: 829-837 (2017).
- Lambrecht MA, Rombouts I, De Ketelaere B, Delcour JA.** Prediction of heat-induced polymerization of different globular food proteins in mixtures with wheat gluten. *Food Chem*. 221: 1158-1167 (2017).
- Luo Y, Li M, Zhu KX, Guo XN, Peng W, Zhou HM.** Heat-induced interaction between egg white protein and wheat gluten. *Food Chem*. 197: 699-708 (2016).
- Morita E, Matsuo H, Mihara S, Morimoto K, Savage AW, Tatham AS.** Fast omega-gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci*. 33: 99-104 (2003).
- Mukaida K, Kusunoki T, Morimoto T, Yasumi T, Nishikomori R, Heike T, Fujii T, Nakahata T.** The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. *Allergol Int*. 59: 369-374 (2010).
- Nachshon L, Goldberg MR, Schwartz N, Sinai T, Amitzur-Levy R, Elizur A, Eisenberg E, Katz Y.** Decreased bone mineral density in young adult IgE-mediated cow's milk-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 134: 1108-1113.e3 (2014).
- Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui T, Masuda S, Yamaguchi M, Fujisawa T.** Allergen-induced basophil CD203c expression as a biomarker for rush immunotherapy in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 146 Suppl 1: 47-53 (2008).
- Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Ise W, Honma K, Nishiwaki S, Hirota M, Shimojo N, Katsuki T, Ametani A, Kohno Y, Kaminogawa S.** Determinant analysis of IgE and IgG4 antibodies and T cells specific for bovine alpha(s)1-casein from the same patients allergic to cow's milk: existence of alpha(s)1-casein-specific B cells and T cells characteristic in cow's-milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 101: 660-671 (1998).
- Nomura T, Kanda Y, Kato T, Sobajima T, Morishita T, Sugiura S, Suda Y, Wakatsuki J, Nakano M, Kamioka N, Terada A, Saitoh S.** Probability curves focusing on

- symptom severity during an oral food challenge. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 112: 556-557.e2 (2014).
- Nowak-Węgrzyn A, Lawson K, Masilamani M, Kattan J, Bahnson HT, Sampson HA.** Increased Tolerance to Less Extensively Heat-Denatured (Baked) Milk Products in Milk-Allergic Children. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 6: 486-495.e5 (2018).
- Nurmatov U, Dhimi S, Arasi S, Pajno GB, Fernandez-Rivas M, Muraro A, Roberts G, Akdis C, Alvaro-Lozano M, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Burks W, du Toit G, Ebisawa M, Eigenmann P, Knol E, Makela M, Nadeau KC, O'Mahony L, Papadopoulos N, Poulsen LK, Sackesen C, Sampson H, Santos AF, van Ree R, Timmermans F, Sheikh A.** Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 72: 1133-1147 (2017).
- Okada Y, Yanagida N, Sato S, Ebisawa M.** Better management of cow's milk allergy using a very low dose food challenge test: a retrospective study. *Allergol Int*. 64: 272-276 (2015).
- Okada Y, Yanagida N, Sato S, Ebisawa M.** Better management of wheat allergy using a very low-dose food challenge: A retrospective study. *Allergol Int*. 65: 82-87 (2016).
- Ono W, Oka D, Hamakawa A, Noguchi T, Takano K.** Effects of  $\kappa$ -casein dissociation from casein micelles on cheese curd formation. *Food Sci Technol Res*. 23: 743-748 (2017).
- Perezábad L, Reche M, Valbuena T, López-Fandiño R, Molina E, López-Expósito I.** Oral food desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy: immunological changes underlying desensitization. *Allergy Asthma Immunol Res*. 9: 35-42 (2017).
- Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, Sampson HA, Lack G, Beyer K, Oettgen HC.** Food allergy. *Nat Rev Dis Primers*. 4: 17098 (2018).
- Restani P, Ballabio C, Di Lorenzo C, Tripodi S, Fiocchi A.** Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Anal Bioanal Chem*. 395: 47-56 (2009).
- Santos AF, James LK, Bahnson HT, Shamji MH, Couto-Francisco NC, Islam S, Houghton S, Clark AT, Stephens A, Turcanu V, Durham SR, Gould HJ, Lack G.** IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-

- tolerant children sensitized to peanut major allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 135: 1249-1256 (2015a).
- Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, Lack G.** Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol.* 135: 179-186 (2015b).
- Sato S, Yanagida N, Ogura K, Imai T, Utsunomiya T, Iikura K, Goto M, Asaumi T, Okada Y, Koike Y, Syukuya A, Ebisawa M.** Clinical studies in oral allergen-specific immunotherapy: differences among allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 164: 1-9 (2014).
- Schoemaker AA, Sprickelman AB, Grimshaw KE, Roberts G, Grabenhenrich L, Rosenfeld L, Siegert S, Dubakiene R, Rudzeviciene O, Reche M, Fiandor A, Papadopoulos NG, Malamitsi-Puchner A, Fiocchi A, Dahdah L, Sigurdardottir ST, Clausen M, Stańczyk-Przyłuska A, Zeman K, Mills EN, McBride D, Keil T, Beyer K.** Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children--EuroPrevall birth cohort. *Allergy.* 70: 963-972 (2015).
- Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS.** The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond.* 357: 133-142 (2002).
- Shin M, Lee J, Ahn K, Lee SI, Han Y.** The influence of the presence of wheat flour on the antigenic activities of egg white proteins. *Allergy Asthma Immunol Res.* 5: 42-47 (2013).
- Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA.** The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 120: 1172-1177 (2007).
- Spuergin P, Mueller H, Walter M, Schiltz E, Forster J.** Allergenic epitopes of bovine alpha S1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy.* 51: 306-312 (1996).
- Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, Kido H.** Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol.* 27: 276-282 (2016).
- Sugiura S, Kondo Y, Ito K, Hashiguchi A, Takeuchi M, Koyama N.** A case of anaphylaxis to erythritol diagnosed by CD203c expression-based basophil activation test. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 111: 222-223 (2013).



- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 24: 145-149 (1992).
- Tsai SH, Kinoshita M, Kusu T, Kayama H, Okumura R, Ikeda K, Shimada Y, Takeda A, Yoshikawa S, Obata-Ninomiya K, Kurashima Y, Sato S, Umemoto E, Kiyono H, Karasuyama H, Takeda K.** The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity*. 42: 279-293 (2015).
- Verhoeckx KCM, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, Herouet-Guicheney C, Holzhauser T, Shimojo R, van der Bolt N, Wichers H, Kimber I.** Food processing and allergenicity. *Food Chem Toxicol*. 80: 223-240 (2015).
- Waugh DF, Creamer LK, Slattery CW, Dresdner GW.** Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*. 9: 786-795 (1970).
- Yanagida N, Sato S, Asaumi T, Okada Y, Ogura K, Ebisawa M.** A single-center, case-control study of low-dose-induction oral immunotherapy with cow's milk. *Int Arch Allergy Immunol*. 168: 131-137 (2015).
- Yanagida N, Sato S, Takahashi K, Nagakura KI, Asaumi T, Ogura K, Ebisawa M.** Increasing specific immunoglobulin E levels correlate with the risk of anaphylaxis during an oral food challenge. *Pediatr Allergy Immunol*. 29: 417-424 (2018).
- Yang W, Tu Z, Wang H, Zhang L, Song Q.** Glycation of ovalbumin after high-intensity ultrasound pretreatment: effects on conformation, immunoglobulin (Ig)G/IgE binding ability and antioxidant activity. *J Sci Food Agric*. 98: 3767-3773 (2018).
- Yao M, Xu Q, Luo Y, Shi J, Li Z.** Study on reducing antigenic response and IgE-binding inhibitions of four milk proteins of *Lactobacillus casei* 1134. *J Sci Food Agric*. 95: 1303-1312 (2015).
- Yokooji T, Okamura Y, Chinuki Y, Morita E, Harada S, Hiragun M, Hide M, Matsuo H.** Prevalences of specific IgE to wheat gliadin components in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int*. 64: 206-208 (2015).
- Yoneyama M, Nomura T, Kato T, Sobajima T, Tanida H, Morishita T, Sugiura S, Suda**

**Y, Hirabayashi Y, Misawa C, Kamioka N, Tanaka H, Mizuno M, Terada A, Kanda Y, Saitoh S.** Probability curves for predicting symptom severity during oral food challenge with milk. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 115: 251-253 (2015).

## 謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP17K00831、ならびに一般財団法人ニッポンハム食の未来財団の「平成 29 年度公募型研究助成事業」の助成を受けたものです。

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導ならびにご鞭撻を賜り、和泉秀彦教授には厚く御礼申し上げます。和泉教授には、研究や発表に対する取り組み方をご指導いただきました。研究室配属から 6 年間、未熟な私をご指導いただき心より感謝申し上げます。

本論文の作製にあたり審査、ご指導いただきました武庫川女子大学 食物栄養学科 高橋享子教授、本学 井澤一郎教授、池田彩子教授に厚く御礼申し上げます。

実験操作や論文執筆において懇切丁寧にご指導いただきました山田千佳子准教授に厚く御礼申し上げます。様々な実験手技についてご教授くださり、心より感謝申し上げます。

食物アレルギーの臨床的知見をご教示くださいました榎村春江講師、本研究を遂行するにあたり様々なご支援をいただきました河合菜月助手に心より感謝申し上げます。

食物アレルギーの基礎から医学的な解釈をご教示くださいました、あいち小児保健医療総合センター 副センター長 伊藤浩明先生、アレルギー科 医長 松井照明先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究で使用したアレルギー患者血清を供与くださいました、伊藤先生、松井先生、ならびにアレルギー科の皆様に感謝申し上げます。

好塩基球活性化試験を行う機会をいただき、ご教授くださいました、藤田医科大学付属病院 小児科 柘植郁哉客員教授、ばんたね病院 小児科 近藤康人教授、医学部 小児科 勅使河原深雪様に感謝申し上げます。

最後に、研究生活を共に過ごした名古屋学芸大学 管理栄養学部 食品学研究室の 4 年生、ならびに卒業生の皆様には、多くの研究でご協力いただきました。今後のご活躍を心よりお祈り申し上げます。