

小麦の抗原性低下を目的とした処理方法の検討 SOME ATTEMPTS AT DECREASING IN ALLERGENIC ACTIVITY BY HIGH TEMPERATURE-PRESSURE AND PROTEASE TREATMENTS IN WHEAT

竹本和仁

Kazuhito TAKEMOTO

1. 緒言

本来、生体防御のための免疫機構が体に不都合な症状を引き起こすことがあり、その1つにアレルギーがある。現在、日本人の3人に1人は何らかのアレルギーを発症していると言われており、食物アレルギーは「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫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」と定義される¹⁾。

アレルギー反応は、I型(即時型)、II型(細胞傷害型)、III型(免疫複合型)、IV型(遅延型)に分けられる。食物アレルギーはI型もしくはIV型の免疫学的機序によると考えられている。I型アレルギーは即時型アレルギーと呼ばれ、IgE(免疫グロブリンE)依存型の反応を示す。アレルゲン(抗原)が食物の場合は食物アレルギー、アレルゲンが花粉の場合は花粉アレルギーとなる。

食物アレルギーのほとんどはタンパク質である。食事性のタンパク質は、消化酵素によってペプチドやアミノ酸に分解されて腸管から吸収されるが、一部のタンパク質は消化されずにそのまま、あるいは大きなペプチドとして吸収されることがある。吸収されたタンパク質ないし大きなペプチドは腸管免疫系によって異物として認識され、抗原提示細胞内に取りこまれ、その情報がT細胞(胸腺において成熟したリンパ球)に提示され、T細胞が活性化される。T細胞は様々なサイトカイン(細胞間情報伝達タンパク質)を産生し、同じく骨髄由来リンパ球であるB細胞を活性化してIgE抗体産生へと至る。この特異的IgE抗体は全身に存在する肥満細胞上のIgE受容体に結合して感作が成立する(図1)。再度同じアレルゲンが体内に吸収されると、アレルゲンは肥満細胞上の特異的IgE抗体に架橋結合し、これにより肥満細胞内にシグナルが伝達され、ヒスタミンなどの化学伝達物質が放出されて、アレルギー反応、すなわち蕁麻疹、湿疹、下痢、喘息などの症状が誘発される。

食物アレルギーを引き起こす三大アレルゲンとして、鶏卵、牛乳、小麦が挙げられ、その他にも大豆や肉類など食事に不可欠なものがアレルゲンとして存在する。複数の食物に対してアレルギーを発症することも多く、蕎麦やピーナッツでは急性の激しい症状(アナフィラキシーショック)を起こして死に至る危険もある。

現在、加工食品にはアレルギー表示を必要とする特定原材料が指定されているが、予想外の経路でアレルゲンが混入することがあり、患者にとって安心できる状況にはない。食物アレルギーを重症化さ

せないためには、アレルゲンを含む食物を摂取しないことが必要とされる。

現在では、主要アレルゲンを除去した低アレルゲン食品が市販されつつあるが、除去法の確立、低アレルゲンであることの確認、食品としての品質を維持することなど解決すべき課題が多数ある。

現在アレルゲンとなりうる食品は多様を極めており、複数の食品を原因食物とする人においては原因食品の除去によって食事の豊かさや健康を損なう可能性がある。特に発育途上にある乳児や幼児においては、除去食によって不足する栄養素を補う為に、代替食を用いる必要が生ずる。しかし、除去食や代替食の不十分さから成長障害を引き起こすケースも存在する。五藤ら²⁾は、食物アレルギーに起因する体重増加不良を起こしていた12名の乳幼児の症例を報告した。患児の中には母独自の判断による制限食が体重増加不良の原因と考えられる患児も存在し、最も深刻な例では体重、身長、頭囲に顕著な発達発育の遅れが見られ、著明な低栄養をきたし大脳萎縮の見られるケースもあった。三浦ら³⁾は2品目以上のアレルギー食品の完全除去を2年以上行った8名のアレルギー患児の骨密度を追跡しており、対象とされた患児では腰椎骨密度が年齢正常値を下回り、特に除去食の継続年数の長い者ほどその傾向が顕著であったことを報告している。

また、食物アレルギーの問題は患者のみならず、その家族にまで影響が及ぶ。下川ら⁴⁾は食物アレルギーによるアナフィラキシー既往児の養育者12名を対象に、食物アレルギーの意味を明らかにする目的で、半構造化面接を実施し、アナフィラキシー発症を経験した養育者は、食べものによって子どもに死の危険が生じることを理解しているものの、アナフィラキシー発症機構の理解しがたさ故、周囲との理解の乖離は大きく、味方を得がたい状況であることを報告している。また、高木⁵⁾は食物アレルギー児にとって望ましい給食実施に向けての基礎資料を得る目的で、108の保育園・幼稚園および食物アレルギー児の保護者を対象に、食物アレルギー児の給食に関するアンケートを実施しており、その報告の中で、食物アレルギーを疾患とらえて給食での対応を求めている保護者に対して、食物アレルギーを軽くみている園があり、危険を招く認識のズレがあることや、医師からの食事療法の指導を受け、園に要望を出す保護者に対し、「神経質」などととらえられ、信じてもらえない精神的苦痛を保護者が感じていることなどを述べている。

このように本人のみならず、養育者をも大いに悩ましている食物アレルギーであるが、これまで除去食療法が中心であった治療は、ここ数年の間で経口免疫療法が治療の一選択として加えられるようになり、話題となっている⁹⁾。

多数存在する原因食品のなかでも小麦は、諸外国において Baker's Asthma やセアリック病などのアレルギー疾患の要因として知られており、本邦においては食事依存性運動誘発アナフィラキシー(Food-dependent exercise-induced anaphylaxis : FDEIA)の原因食品として小麦が最も頻度が高い食品であるとしている。FDEIA はアレルギー摂取のみでは症状を引き起こさず、アレルギー摂取後に運動を伴うことで発症し、吐き気、蕁麻疹、血管性浮腫、鼻炎、呼吸困難、喘息、意識障害などのアナフィラキシーショック症状が起るとされている⁹⁾。

これらの疾患を引き起こす小麦中の主要なアレルギー成分はグルテンである。グルテンは特有の粘弾性を有しており、うどんのコシやパンの膨らみなどはグルテンの性質によって与えられることが一般に知られている。即ち、グルテンは小麦食品の調理・加工に必要な成分として重要な役割を担っている。また、その特有の性質から、グルテンは米粉パンなど小麦粉を主原料としない加工食品にも添加物として応用されているため、グルテンをいかに対処するかが重要となってくる。

小麦アレルギー患者への対応食品として、小麦アレルギー除去小麦粉の作製法を Ikezawa ら⁹⁾が報告しているが、Ikezawa らの報告は小麦粉全体に対して処理を行った報告であり、本報告の条件ではグルテンが全て除去されている訳ではなく、状況によっては小麦アレルギーが発症するリスクがないわけではない。そこで著者は、2009 年に小麦澱粉を精製した「浮粉」を主原料に、副原料、添加物にもたんぱく質を含まず、小麦アレルギー発症リスクを伴わないパンの製法を検討した。結果、タンパク質(グルテン)が無い状態であっても、粘性物質の添加によって容量体積比(パンの膨化)を補助することが可能であることを確認した。しかし、通常的小麦粉を用いたものに比べ、生地成形が困難であり、加熱後の外観や食味などが劣っていたことから、無タンパク状態でのパンの加工は現段階では困難であると判断した。この結果を踏まえ、研究の目的を食品中のアレルギーとなる成分を除去した食品の創作から、アレルギーの抗原性を除去、あるいは低減化させ、減感作療法への応用が可能な食品を検討することとした。

食品の低アレルギー化に関する研究としては、野上ら¹⁰⁾による牛肉に存在するアレルギーに対する高圧処理の研究があり、併せて米やリンゴも高圧処理によってアレルギー性が低下することを紹介している。小麦においては、新居ら¹¹⁾による小麦バターに対する高温高圧加熱の研究がある。新居らは、小麦を高温高圧で処理することによって抗原量が著しく低下することを報告している。この新居らの報告は、小麦バターの状態での処理であるが、小麦アレルギーそのものへの効果とは意味合いが異なる。グルテンそのものへの高温高圧加熱による低アレルギー化効果が認められれば、小麦製品のみならず、グルテンを添加物とした加工食品全てに応用

可能となる。そこで本研究では、精製されたグルテンを異なる条件下で高温高圧加熱処理した場合の低アレルギー化効果を検討した。

また、渡辺¹²⁾、Tanabe¹³⁾¹⁴⁾らはプロメラインをはじめとする food processing 酵素などによる処理によって、グルテンの低アレルギー化が可能であることを報告している。渡辺や Tanabe らの用いた酵素以外にも、多数の food processing 酵素が存在するが、それらのうち、どの酵素が低アレルギー化に有効であるかの検証は未だ十分ではない。今回、エイチビィアイ株式会社より、小麦グルテンの低アレルギー化に有力な 4 種の新規 food processing 酵素の提供を受けることができた。そこで著者はエイチビィアイ株式会社によって新たに開発された性質の異なる 4 種のエンド型プロテアーゼの有する小麦グルテンの低アレルギー化効果を明らかにすることを目的とした。

尚、これらの実験に際しては、抗原量を評価指標とした新居らが、低アレルギー化が加熱に伴う抗原抽出効率の低下による見かけの変化である可能性を懸念していたことを勘案し、総タンパク量に対する抗原認識率を新たな評価指標として加えた。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験 1 高温高圧加熱処理の小麦グルテン低アレルギー化に及ぼす影響

精製されたグルテンに対する高温高圧加熱による抗原量低下の効果を明らかにする為、以下の実験を行った。

2-1-1. 小麦グルテンおよび小麦グルテンの分画

測定対象の精製小麦グルテンとして A-グル K(グリコ)を用いた。Hetty ら¹⁵⁾および Tanaka ら¹⁶⁾の方法を参考にグルテンをグルテニン、およびグリアジン画分に分画した。すなわち、グルテン 1.5g に 70%エタノールを 30ml 添加し、10 分間強振させ懸濁させた。12000rpm 10 分間の遠心分離後、液性部位をグリアジン、沈殿残渣をグルテニンとし、それぞれをシャーレに移し 50℃で 14 時間乾燥させ、粉碎した。それぞれの画分を乾燥前に直接触れて性状を調査し、乾燥後の粉末には再び水を添加し、直接触れて性状を確認した。

2-1-2. 高温高圧加熱処理条件

グルテンに 3 倍量の純水を添加し、真空包装した群(以下加水群とする)と純水を添加せずに真空包装した群(以下無水群とする)を設定し、新居ら¹¹⁾及び高橋ら¹⁷⁾の方法を参考に、オートクレーブを用いて 120℃、圧力 1.2at、10 分間の条件で加熱した。処理後、55℃で 8 時間乾燥させたサンプルを後述の抗原量測定のサンプルとして用いた。

2-1-3. 抗原量の定量法

処理後のグルテンの抗原量を FASTKIT エライザ Ver. II 小麦(日本ハム)を用いて以下の手順で定量した。なお、対照群として未処理のグルテンを用いた。

2-1-3-1. 抗原量定量の前処理

対象群 1g および高温高圧加熱グルテン粉末 1g にキット付属の抗原抽出液を 19ml 添加し、110 往復/分の速度で 12 時間振とうさせ、遠心分離後、上清を濾過し、濾液を -18°C で測定直前に解凍するまで冷凍保存した。抗原抽出溶液 1ml は希釈用緩衝液にて 20 倍希釈したものを測定溶液とし、以下の抗原量測定に用いた。

2-1-3-2. 抗原量の定量法

キット付属の抗体固相化プレート(96 穴)に $100\mu\text{L}$ ウェルで各測定溶液を 3 ウェルずつ添加し、室温に 60 分間静置後、キット付属の洗浄液を $250\mu\text{L}$ ウェル毎に添加することで 5 回洗浄を行った。洗浄作業後、ビオチン結合抗体溶液を $50\mu\text{L}$ ウェル添加し、室温に 60 分間静置後、洗浄液を $250\mu\text{L}$ ウェル添加し、再度 5 回洗浄した。その後、酵素-ストレプトアビジン結合物溶液を $50\mu\text{L}$ ウェル添加し、室温に 30 分間静置後、洗浄液を用いて 5 回洗浄した。発色剤 (TMB) を $50\mu\text{L}$ ウェル添加し、室温で 20 分間静置し発色させた。反応停止液 (0.5N 硫酸) を $50\mu\text{L}$ ウェル添加し、450nm の吸光度を測定した。

対照群とした未処理のグルテンの平均吸光度を抗原量の基準とし、各処理グルテンの平均吸光度から抗原量の相対値を以下の式によって求めた。

サンプルの平均吸光度 \div 対照群の平均吸光度=抗原量相対値

2-1-4. 抗原認識率の算出法

ローリー法¹⁸⁾によって求めた対照群のタンパク質量を先項で求めた各測定液の抗原量の相対値に乘じ、真の抗原量とした。また、真の抗原量を測定溶液中のタンパク質量で除し、各処理グルテンの抗原認識率を算出した。以下に抗原認識率の算出式を示す。

サンプルの真の抗原量 \div サンプルの測定溶液のタンパク質量 $\times 100$ =抗原認識率(%)

2-1-5. 統計処理

相対抗原量、真の抗原量及び抗原認識率において、対照群と各処理群での単純比較を t 検定を用いて行い、危険率 0.05 未満および危険率 0.01 未満の判定を行った。

2-2. 実験 2 新規プロテアーゼ処理による小麦グルテンの低アレルゲン化能の検討

エイチビィアイ株式会社によって提供された 4 種の新規プロテアーゼの有する低アレルゲン化能を明らかにする為、以下の実験を行った。

2-2-1. 新規プロテアーゼの希釈条件

本研究に用いるタンパク質分解酵素としてエイチビィアイ株式会社(兵庫県宍粟市)製の新規酵素である、オリエンターゼ ON(黄麹菌中性プロテアーゼ)、オリエンターゼ 90N(細菌性中性プロテアーゼ)、オリエンターゼ AY(糸状菌酸性プロテアーゼ)、オリエンター

ゼ 22BF(細菌アルカリプロテアーゼ)の 4 種を用いた。各酵素溶液は提供サンプル中の酵素濃度がそれぞれ異なるため、以下のように調製し、酵素濃度を揃えた。オリエンターゼ ON は酵素粉末 0.2g を純水 10ml に溶解し、酵素濃度 1%とした。以下、オリエンターゼ 90N は酵素粉末 0.167g を純水 10ml に、オリエンターゼ AY は酵素粉末 0.125g を純水 10ml に、オリエンターゼ 22BF は酵素粉末 0.357g を純水 10ml に溶解し、酵素濃度をそれぞれ 1%とした。

2-2-2. pH 緩衝液作製法

各酵素による反応を至適 pH 付近で行う為の緩衝液を以下の方法で調製した。調整した緩衝液の pH は pH メーターによって確認した。リン酸緩衝液(pH7.0)は 0.2M リン酸二水素ナトリウム 39ml とリン酸水素二ナトリウム 61ml を混合し、最終容積を純水で 200ml にした。リン酸緩衝液(pH7.2)は 0.2M リン酸二水素ナトリウム 28ml とリン酸水素二ナトリウム 72ml を混合し、最終容積を純水で 200ml にした。塩酸-塩化カリウム緩衝液(pH2.0)は 0.2M 塩化カリウム 50ml に 0.2M 塩酸 10.6ml 混和し、最終容積を純水で 200ml にした。炭酸-重炭酸緩衝液(pH10.5)は 0.1M 炭酸ナトリウム 40.5ml と 0.1M 重炭酸ナトリウム 9.5ml を混合し、最終容積を純水で 100ml にした。

2-2-3. グルテンに対する酵素反応条件

測定対象小麦グルテンとして A-グル K(グリコ)を用いた。各酵素における反応条件は以下の通りに設定し、反応を行った。

オリエンターゼ ON では、グルテンを 1g 精量し、リン酸緩衝液 (pH7.0)15ml に浸潤・分散させ、酵素溶液 $100\mu\text{L}$ 添加後、 $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ で 0 分、10 分間、20 分間、30 分間反応させ、 80°C で 60 分間加熱し酵素を失活させ、反応を停止した。3000rpm 20 分間遠心分離後の沈殿残渣を抗原量測定に用いた。0 分処理はあらかじめ 80°C 、60 分間加熱して失活させた酵素溶液を用い、酵素溶液添加直後に反応停止操作を行った。

以下、オリエンターゼ 90N では、リン酸緩衝液(pH7.2)を用い、オリエンターゼ AY では、塩酸-塩化カリウム緩衝液(pH2.0)を用いて精秤したグルテンを浸潤させ、オリエンターゼ ON と同様の方法で反応を進行させた。オリエンターゼ 22BF では、炭酸-重炭酸緩衝液(pH10.5)を用い、反応温度 $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ にて反応を進行させた。

2-2-4. 抗原量の定量・抗原認識率の算出法

抗原量の定量は実験 1 と同様、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦(日本ハム)を用いて測定し、抗原認識率も同様に算出した。なお、抗原量定量の前処理には酵素処理後の沈殿残渣を全量用い実験 1 における前処理と同様の操作を行った。

2-2-5. 統計処理

相対抗原量、真の抗原量及び抗原認識率において対照群と各処理群での単純比較を t 検定を用いて行い、危険率 0.05 未満および危険率 0.01 未満の判定を行った。また、各酵素で最も抗原認識率の

低かった群における比較を、一元配置分散分析を用いて危険率 0.05 未満および危険率 0.01 未満の有意差の有無を判定した。

2-3. 実験 3 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性の測定

本実験で設定した反応時間及び酵素濃度が適切なものであったか確認するため、各酵素の酵素活性について追実験を行った。

2-3-1. 反応基質及び測定項目

可溶性タンパク質である牛血清アルブミン(以下 BSA)を基質とし、反応時間、酵素濃度、基質濃度の 3 要因の及ぼす各酵素活性に与える影響をブラッドフォード法とニンヒドリン反応を併用して測定した。

2-3-2. 酵素活性の経時変化の検討

基質総量を 20mg、酵素濃度を基質総量の 0.1%とし、各酵素の至適温度と至適 pH で 0 分・2 分・4 分・6 分・8 分・10 分・20 分・30 分間反応させた時の酵素活性をブラッドフォード法による高分子タンパク質量の減少の測定と、ニンヒドリン反応による生成ペプチド量の増加の測定によって測定した。酵素反応は以下の条件で作用させた。

2%BSA 溶液 1ml に緩衝液 1ml を加え、0.01%w/v に調整した酵素溶液を 100 μ l 添加した。0 分(対照群)にはあらかじめ失活させた酵素溶液を添加した。その後、至適温度に設定した恒温槽にて設定時間である 0 分、2 分、4 分、6 分、8 分、10 分、20 分、30 分の反応をさせた。反応後、80℃に設定した恒温槽で 1 時間加熱し、反応停止させた。0 分では、酵素溶液添加直後のものを加熱した。

2-3-3. 酵素活性に及ぼす酵素濃度の影響の検討

基質総量 20mg、反応時間 10 分とし、各酵素の至適温度と至適 pH で酵素を基質総量の 0%・0.001%・0.01%・0.1%・1%添加した時の酵素活性を、先述の反応時間の検討実験と同様にブラッドフォード法とニンヒドリン反応によって測定した。

酵素溶液はあらかじめ作製した 1%酵素溶液を原液とし、0.1%、0.01%、0.001%にそれぞれ希釈した。以下、先述の反応時間の検討実験と同様の条件で、反応時間を 10 分に固定し反応させた。反応後、80℃に設定した恒温槽で 1 時間加熱し反応停止させた。

2-3-4. 酵素活性に及ぼす基質濃度の影響の検討

酵素重量 1 μ g、反応時間 10 分とし、各酵素の至適温度と至適 pH での反応を、基質総量を 0mg・4mg・8mg・12mg・16mg・20mg に設定した時の酵素活性を、先述の反応時間の検討実験と同様にブラッドフォード法とニンヒドリン反応によって測定した。ブラッドフォード法とニンヒドリン反応の呈色は BSA そのものでも起こるため、設定した濃度における両法の吸光度を測定し、反応液との差を酵素活性とした。

基質溶液の濃度は 0mg、4mg、8mg、12mg、16mg、20mg の

6 種とした。以下、先述の実験と同様の条件で、酵素濃度を 0.001% に固定し、反応させた。反応後、80℃に設定した恒温槽で 1 時間加熱し反応停止させた。

2-3-5. 最大反応速度及びミカエリス定数の算出

基質濃度に伴う酵素活性の結果から各酵素の最大反応速度とミカエリス定数を算出した。算出に用いる測定値は、結果をモル濃度の値に変換可能なニンヒドリン反応の測定値とし、各酵素の測定値から Lineweaver-Burk プロットを作成し、最大反応速度とミカエリス定数を導いた。

2-3-6. 酵素活性の測定法

酵素活性の測定に用いたブラッドフォード法とニンヒドリン反応は以下に示す手順で行った。

2-3-6-1. ブラッドフォード法の手順

ブラッドフォード法に用いる CBB 溶液は CBB(クマシーブリリアントブルー)G-250 を 25mg 精秤し、メタノール 50ml を加え攪拌溶解後、リン酸 100ml を加え更に 1 時間攪拌し、純水で 1 l にメスアップし、濾過させたものを一晩静置して用いた。後述の各種条件の酵素反応液を純水で 10 倍希釈した溶液を 100 μ l 取り、CBB 溶液 2ml を添加して発色させた溶液の 570nm の吸光度を測定した。

濃度既知の標準液として、400 μ g/ml、40 μ g/ml、4 μ g/ml に調整した BSA 溶液を 100 μ l 取り CBB 溶液 2ml を添加し、発色させた溶液の 570nm の吸光度を測定した。ブランクとして純水 100ml に CBB 溶液 2ml を添加した溶液の 570nm の吸光度を測定した。

2-3-6-2. ニンヒドリン反応の手順

ニンヒドリン反応に用いる 1%ニンヒドリンエタノール溶液はニンヒドリン 1g をエタノール 100ml に溶解させたものを用いた。後述の各種条件の反応液を 500 μ l 取り、pH を 4~8 の範囲にするための緩衝液を 500 μ l 添加後、更に純水 1ml を添加し、攪拌後 1%ニンヒドリン/エタノールを 100 μ l 加えた。その後、攪拌して 70℃に設定した恒温槽でさらに 10 分間加熱した。反応後の溶液に純水 5ml を加え、570nm の吸光度を測定した。

濃度既知の標準液として、100 μ M/ml、75 μ M/ml、50 μ M/ml、25 μ M/ml に調製したグリシン溶液を対照に同様の操作を行い、比較を行った。ブランクとして純水を用い、総容積を等しくした状態で 1%ニンヒドリン/エタノールを添加し、同様の操作を行った。

3. 結果

3-1. 実験 1 高温高压加熱処理の小麦グルテン低アレルゲン化に及ぼす影響の検討結果について

実験 1 において実施した、グルテンの分画、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦を用いた抗原量の測定、抗原認識率の結果について以下に述べる。

3-1-1. 分画したグルテニン及びグリアジンの物理的性状について

グルテンを懸濁させた 70%エタノールの水溶性画分には粘性があり、沈殿残渣には弾性があった。乾燥前の水溶性分画は白濁しており、沈殿残渣は黄白色を示していたが、乾燥処理によってどちらも褐変を示した。粉碎後に水を添加し、直接ふれることによって性状を調査したところ、水溶性画分では、乾燥前の液体は粘性を有していたが、乾燥後は粉末のままとなり粘性を失っていた。沈殿残渣では乾燥前は吸水によって凝集しゴム状の弾性を有していたが、乾燥後は凝集性に乏しくなり、一部凝集したもののゴム状の弾性を失っていた。

3-1-2. 高温高圧加熱処理グルテンの FASTKIT エライザ Ver. II 小麦での吸光度、および抗原量相対値について

対照群と高温高圧加熱処理群の吸光度、および吸光度を基に対照群における抗原量を 1 としたときの高温高圧加熱処理群の抗原量相対値を表 1) に示した。加水群では低下傾向、無水群では上昇傾向が見られたが、t-検定による対照群との単純比較の結果、両群ともに有意差は認められなかった。

3-1-3. 高温高圧加熱処理群グルテンの測定溶液中のタンパク質量と真の抗原量、および抗原認識率について

対照群と高温高圧加熱処理群の測定溶液 1ml 中に含まれるタンパク質量、対照群のタンパク質量に抗原量相対値を乗じて求めた真の抗原量、および高温高圧加熱処理群の測定溶液中の抗原量を、各々の測定溶液中に含まれるタンパク質量で除した抗原認識率を表 2) に示した。真の抗原量は先述の抗原量相対値を重量に変換したものであるため、各処理群における値の傾向と、対象群と比較したときの有意差の判定は、抗原量相対値の結果と一致した。

また、抗原認識率においては加水状態では低下傾向、無加水状態では上昇傾向が見られたが、t-検定による対照群との単純比較の結果、両群ともに有意差は認められなかった。

3-2. 実験 2 新規プロテアーゼ処理による小麦グルテンの低アレルギー化能の検討結果について

実験 2 において実施した、4 種の酵素によって処理されたグルテンの、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦を用いた抗原量の測定、抗原認識率の結果について以下に述べる。

3-2-1. 4 種の新規プロテアーゼで処理したグルテンの FASTKIT エライザ Ver. II 小麦での吸光度および抗原量相対値について

対照群と酵素処理群の吸光度及び、吸光度を基に対照群における抗原量を 1 としたときの酵素処理群の抗原量相対値を表 3) に示した。処理酵素に基づき、オリエンターゼ ON 処理、オリエンターゼ 90N 処理、オリエンターゼ AY 処理、オリエンターゼ 22BF 処理のカテゴリーに分け、以下に個別の結果を述べる。

オリエンターゼ ON 処理群では、10 分間処理群で対象群と比べて

低い値になっており、続く 20 分間の処理で一旦微増、後の 30 分間の処理で再度低下し、もっとも低い値となった。t-検定による対照群との単純比較の結果、30 分処理群において、対象群に対し危険率 0.05 未満で有意に低い値であると認められた。

オリエンターゼ 90N 処理群では、10 分間の処理で対象群と比べて僅かに高い値を示し、続く 20 分間の処理で大きく低下した。後の 30 分間の処理で 20 分の処理より増加した。t-検定による対照群との単純比較の結果、20 分処理群、30 分処理群において対象群に対し危険率 0.05 未満で有意に低い値であると認められた。

オリエンターゼ AY 処理群では、10 分間の処理で最も低い値となり、続く 20 分間の処理で一旦値が増加し、後の 30 分間の処理で再度値が低下した。t-検定による対照群との単純比較の結果、10 分処理群において対象群に対し危険率 0.01 未満で有意に低い値であると認められた。

オリエンターゼ 22BF 処理群では、10 分間の処理で最も低い値となり、続く 20 分間の処理で値が一旦微増し、後の 30 分間の処理で再度値が低下した。t-検定による対照群との単純比較の結果、10 分処理群、20 分処理群、30 分処理群において危険率 0.01 未満で有意に低い値であると認められた。

3-2-2. 4 種の新規プロテアーゼで処理したグルテンの測定溶液に含まれるタンパク質量と真の抗原量および抗原認識率について

酵素処理群の測定溶液 1ml 中に含まれるタンパク質量と、対照群のタンパク質量に抗原量相対値を乗じて求めた真の抗原量、および、酵素処理群の測定溶液中の抗原量を、各々の測定溶液に含まれるタンパク質量で除した抗原認識率を表 4) に示した。真の抗原量は先述の抗原量相対値を重量に変換したものであるため、各処理群における値の傾向と、対象群と比較したときの有意差の判定は、抗原量相対値の結果と一致した。

一方、各酵素処理群の抗原認識率については、抗原量相対値と同様に処理酵素に基づくカテゴリーに分け、以下に個別の結果を述べる。

オリエンターゼ ON 処理群では、10 分間の処理で対象群と比べて低い値になっており、続く 20 分間の処理で一旦微増、後の 30 分間の処理で再度低下し、最も低い値となった。t-検定による対照群との単純比較の結果、10 分処理群、20 分処理群、30 分処理群において危険率 0.05 未満で有意に低い値であると認められた。

オリエンターゼ 90N 処理群では、10 分間の処理に対象群と比べて高い値を示した。続く 20 分間の処理で大きく低下し、最も低い値となった。後の 30 分間の処理で抗原量、抗原認識率ともに微増した。t-検定による対照群との単純比較の結果、20 分処理群、30 分処理群において危険率 0.05 未満で有意に低い値であると認められた。

オリエンターゼ AY 処理群では、10 分間の処理で大きく低下し、最も低い値となった。続く 20 分間の処理で一旦増加し、後の 30 分間の処理で再度低下した。t-検定による対照群との単純比較の結果、

果、20 分処理群、30 分処理群において危険率 0.05 未満で有意に低い値であると認められ、10 分処理群においては危険率 0.01 未満で有意に低い値であると認められた。

オリエンターゼ 22BF 処理群では、10 分間の処理で最も低い値となり、対象群と比べても激減していた。続く 20 分間の処理で一旦微増、後の 30 分間の処理で再度低下した。t 検定による対照群との単純比較の結果、10 分処理群、20 分処理群、30 分処理群において危険率 0.01 未満で有意に低い値であると認められた。

3-2-3. 4 種類の新規プロテアーゼにおいて最も効果が見られた条件間の低アレルゲン化能の比較について

各酵素で最も抗原認識率が低値を示した群を表 5) に示した。一元配置分散分析による多群間比較を行ったところ、オリエンターゼ 22BF がオリエンターゼ ON に対し危険率 5% 未満で、オリエンターゼ 90N に対し危険率 1% 未満で有意に抗原認識率が低い値であった。

3-3. 実験 3 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性の測定の結果について

実験 3 において実施した、反応時間、酵素濃度、基質濃度に伴う 4 種の酵素の酵素活性の結果について以下に述べる。

3-3-1. 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性の経時変化について

反応時間と酵素活性の関係のブラッドフォード法による全酵素での結果の一覧を図 2) に示した。いずれの酵素においても測定値が上下する結果となり、反応時間と酵素活性の間に一貫した特徴は表れなかった。全体的には時間経過とともに低下する傾向がうかがえた。

一方、ニンヒドリン反応による全酵素での結果の一覧を図 3) に示した。こちらも全ての酵素において測定値が上下し一貫した特徴は見られなかった。時間経過による全体的な傾向は酵素の種類によって異なり、オリエンターゼ ON では上昇傾向、オリエンターゼ 90N ではほぼ平行、オリエンターゼ AY、オリエンターゼ 22BF では降下傾向がうかがえた。

3-3-2. 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす酵素濃度の影響について

酵素濃度と酵素活性の関係のブラッドフォード法による全酵素での結果の一覧を図 4) に示した。いずれの酵素においても測定値が上下しており、酵素濃度と酵素活性の間に一貫した特徴は見られなかった。オリエンターゼ AY の測定結果は 0.05% 濃度を境に対象を示す独特な特徴がみられた。

一方、ニンヒドリン反応による全酵素での結果を図 5) に示した。いずれの酵素もある濃度までの測定値はほぼ平衡もしくは緩やかな変化を示し、その濃度以降に大きな変化が見られる結果となった。オリエンターゼ AY のみ測定値の上昇傾向が見られ、他の 3 種の酵

素は低下の傾向を示した。

3-3-3. 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす基質濃度の影響について

基質濃度と酵素活性の関係について、ブラッドフォード法による全酵素での測定結果の一覧を図 6) に示した。また、全酵素での基質濃度本来の測定値との差分の一覧を図 7) に示した。基質本来の測定値との差は、オリエンターゼ ON、オリエンターゼ 90N、オリエンターゼ 22B では上下しているが、いずれも増加傾向、オリエンターゼ AY、オリエンターゼ AY ではほぼ直線的な増加がみられた。結果、すべての酵素が基質濃度の上昇に伴い、基質本来の測定値との差が大きくなる傾向が見られた。

一方、ニンヒドリン反応による全酵素での測定結果の一覧を図 8) に示した。また、全酵素での基質濃度本来の測定値との差分の一覧を図 9) に示した。基質本来の測定値との差は、オリエンターゼ ON では上下しているが、基質濃度の上昇とともに増加傾向を示し、オリエンターゼ AY ではほぼ直線的な増加がみられた。オリエンターゼ 90N でも基質濃度の上昇に伴い差が増加しているが、80mg を境に差の増加が緩やかになる傾向がみられた。オリエンターゼ 22BF では上下しているが、オリエンターゼ 90N と同様に 80mg 以降、差の増加が緩やかになる傾向が見られた。

3-3-4. 4 種の新規プロテアーゼの最大反応速度およびミカエリス定数について

本実験から観測された各酵素の最大反応速度 ($\mu\text{M}/\text{分}$) とミカエリス定数は以下の通りであった。オリエンターゼ ON では最大反応速度 $14.1\mu\text{M}/\text{分}$ 、ミカエリス定数 4.24×10^{-6} であった。オリエンターゼ 90N では最大反応速度 $12.2\mu\text{M}/\text{分}$ 、ミカエリス定数 2.43×10^{-6} 、オリエンターゼ AY では最大反応速度 $9.34\mu\text{M}/\text{分}$ 、ミカエリス定数 6.54×10^{-6} 、オリエンターゼ 22BF では最大反応速度 $2.59\mu\text{M}/\text{分}$ 、ミカエリス定数 1.59×10^{-7} であった。

4. 考察

4-1. 実験 1 高温高圧加熱処理の小麦グルテン低アレルゲン化に及ぼす影響に対する考察

実験 1 の結果より導かれる考察を以下に述べる。

4-1-1. グルテンの分画によるグリアジンとグルテニンの変化

グリアジンは粘着性を持ち、グルテニンは弾力性を持つことが知られている¹⁹⁾。今回水溶性画分に粘性が、沈殿残渣に弾性があったことから、今回採用した方法でもグリアジンとグルテニンの分離が行われたと推測する。しかし、乾燥処理によって色・性状の変化が見られ、分画による変性を起こしたものと判断した。そのため、グリアジン及びグルテニン画分を高温高圧加熱処理に用いることを避けた。グルテンの変性は 70°C 以上で起こるとされていたため、乾燥温度を 50°C に設定したが、タンパク単離後に長時間熱に晒すことで、 70°C より低温でも変性しうることが確認された。

4-1-2. 高温高圧加熱による低アレルゲン化効果

同じ測定キットを用いた新居ら¹⁹⁾の報告では、オートクレーブによる加熱で抗原量を約 1/185 に低下出来るとされていた。しかし今回の結果では、オートクレーブ加熱後の抗原量は未処理の状態とほぼ差がなかった。

また、新居らはオートクレーブ加熱による抗原量の低下が抽出液へのタンパク質抽出効率の低下による見かけの低下である可能性があるとしていた。そのため、本研究では抽出液中のタンパク質量に対する抗原認識率を算出した。しかし、この値においてもオートクレーブ加熱による効果は見られなかった。

新居らの方法では、小麦粉に処理を施しているのに対し、本研究ではグルテンそのものに処理を施していることが相違点であり、結果の相違もこのことに起因していると考ええる。そのため、高温高圧加熱による小麦タンパクの低アレルゲン化に際しては、グルテン単独の状態では高温高圧の影響を受けづらい、ないしタンパクの単離の際に耐温・耐圧の構造に変化した可能性が示唆された。また、小麦のアレルゲンとして認識される成分はグルテンだけでなく、糖タンパクも認識されることが明らかになっている²⁰⁾。小麦粉そのものに高温高圧加熱処理をかけた場合には、この糖タンパク質にも影響が及ぶことが予測できるため、小麦全体の低アレルゲン化を目的とする場合は、小麦粉の状態で高温高圧加熱を施す方が効果的である可能性がある。

4-2. 実験2 新規プロテアーゼ処理による小麦グルテンの低アレルゲン化能の検討に対する考察

実験2の結果より導かれる考察を以下に述べる。

4-2-1. 4種の新規プロテアーゼが有する低アレルゲン化能

オリエンターゼ ON による処理では、10 分間の反応で、未処理のグルテンに比べ抗原量が有意に減少しており、設定した反応時間の全てで、未処理のグルテンより抗原認識率が有意に低下していた。また、オリエンターゼ 90N による処理では、20 分間以上の処理で、未処理のグルテンに比べ抗原量が有意に少なくなり、抗原認識率も同様の反応時間で未処理グルテンより有意に低くなった。この 2 種の酵素はいずれも中性溶液下で反応を行っていることから、pH によるグルテンの変性が起こった可能性は低いと考えられるが、抗原量と抗原認識率の低下は酵素反応の影響によるものと考えられる。

一方、オリエンターゼ AY では 10 分間の処理でのみ抗原量が未処理のグルテンより有意に低下しており、抗原認識率においても 10 分の反応時間で未処理グルテンより有意に低くなった。オリエンターゼ AY での反応は酸性溶液下で行っている。そのため、酸性 pH によるグルテンの変性の影響も考えられるが、0 分処理での抗原量と抗原認識率には未処理のグルテンと大きな違いはなく、有意差もなかったが、酵素反応による影響が大部分を占めるものと考えられる。

また、オリエンターゼ 22BF による処理では全ての反応時間で、

抗原量が未処理のグルテンと比べて有意に減少し、抗原認識率も全ての反応時間で未処理のグルテンより有意に低くなった。オリエンターゼ 22BF の反応では、アルカリ性溶液下で処理を行っている。そのため、アルカリ性 pH によるグルテンの変性の影響も考えられるが、0 分処理での抗原量と抗原認識率に、未処理グルテンとの大きな違いはなく、有意差もなかったが、抗原量と抗原認識率の低下は酵素反応による影響が大部分を占めるものと考えられる。

全ての酵素処理で一度低下した抗原量と抗原認識率が反応時間の延長で増加した現象の仮説については後述する。

本研究に用いた 4 種の酵素では、抗原量、あるいは抗原認識率が未処理グルテンより有意に低下する反応時間が存在していた。このことは、4 種の新規プロテアーゼは、全てがグルテンへの低アレルゲン化能を有していることを示唆している。しかし、結果から、今回用いた 4 種類のいずれの酵素においても、抗原量、抗原認識率の両方で反応時間の延長に伴い、抗原量が低下していくことは断言できない。抗原認識率から判断すると、オリエンターゼ 90N では 20 分の反応時間を必要とするがそれ以外の 3 種の酵素においては 10 分の反応時間で低アレルゲン効果を得るには充分と考える。特にいずれの酵素も抗原認識率の上昇するタイミングが存在するため、必ずしも長い反応時間を設定する必要はないと考える。

一旦低下した抗原量が上昇した原因は、一つの抗原として認識されていたタンパク質が、抗原として認識される複数のペプチドに更に分解される現象、すなわち、低分子化に伴うエピトープ(抗体結合部位)の副成によるものと考えている。酵素反応によって分解されたグルテンでは、エピトープペプチドの切断とともに 1 分子にエピトープとなる配列を複数含むペプチドが生成されており、さらに反応を進めることでそれぞれのエピトープに分解されたために、抗原と認識されるペプチドが増え、抗原量の上昇へと繋がった可能性が考えられる。明確な結論を得る為には、処理グルテンに存在するペプチドを分析する必要がある。

尚、他の酵素を用いた低アレルゲン化の研究ではエピトープの切断部位や切断率に関して評価した報告がなされているが、本研究ではそれらに関して正確な情報は得られない。しかし、今回用いた FASTKIT エライザ Ver. II 小麦が小麦アレルゲンの複合抗体を用いた測定法であり、複数種の小麦アレルゲンエピトープに捕捉可能であること。グルテンにおけるグリアジンとグルテニンの量は同程度である¹⁹⁾が、抗原認識率が 50%を下回る群が多数あること。グルテンを構成するグリアジンのエピトープには PQQPF、QQPFP(Q:グルタミン、P:プロリン、F:フェニルアラニン)等、グルテニンのエピトープには QQQPP 等があるとされている。この内、グルテニンのエピトープは分解され難いが、単一の酵素によっていずれも切断可能である²¹⁾²²⁾こと。以上の 3 点から、本研究で用いた酵素においても、グリアジン及びグルテニンの双方のエピトープを切断していることが推察できる。

4-2-2. 4種の新規プロテアーゼの低アレルゲン化能の差

それぞれの酵素による効果は、各酵素の反応速度の特徴等の違いによって同一条件下での比較が困難であるため、各酵素で最も抗原

認識率の低値となった群に関して比較を行った。中性プロテアーゼであるオリエンターゼ ON とオリエンターゼ 90N の間に有意な差が見られなかったことから、中性プロテアーゼによる処理では、酵素の種類による効果の差は少ない可能性が考えられる。また、アルカリ性プロテアーゼであるオリエンターゼ 22BF と中性プロテアーゼであるオリエンターゼ ON、オリエンターゼ 90N の間に有意差が認められたことから、中性プロテアーゼよりアルカリ性プロテアーゼの方が高い低アレルゲン化効果を有することが示唆された。一方、酸性プロテアーゼであるオリエンターゼ AY はいずれの群とも有意差が認められなかったが、値から中性プロテアーゼより効果が高く、アルカリ性プロテアーゼより効果が低い位置にあると推察できる。すなわち、プロテアーゼの性質による効果は、アルカリ性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼの順に大きいことが予測できる。

4-3. 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性の特性、及び酵素活性の特性と実験条件の整合性

実験 3 の結果から導かれる考察と、実験 2 の設定条件の整合性について以下に述べる。

4-3-1. 4 種の新規エンドプロテアーゼの酵素活性の経時変化と設定時間の整合性について

反応時間に伴う酵素活性の変化は、基本的には反応時間の延長に伴い比例的に上昇し、ある時点をピークに活性が平衡となる兆候が一般的である。今回の測定における酵素活性の経時変化には一貫性のある経過は見られず、ブラッドフォード法とニンヒドリン反応の双方で測定値が上下していた。オリエンターゼ 90N とオリエンターゼ AY のブラッドフォード法による測定結果は 2 分以降、測定値が平衡していたため、2 分間の反応でピークに達する可能性が予測されたが、ニンヒドリン反応の測定結果において 2 分以降も変化が存在していたことから、その可能性は否定された。ブラッドフォード法とニンヒドリン反応双方の全体的な測定値の傾向から、時間経過とともに反応が進むことが予測できるのみである。そのため、本実験で設けた 10 分、20 分、30 分という設定が適切な反応時間であったかは断言できない。基質の低分子化を求めるならば、長時間の設定も考えられるが、過剰に長時間にわたる反応時間の設定は実用的ではない。10 分間の反応で低アレルゲン化効果が認められたことから、本研究での反応時間の設定は不適切ではなかったと考える。

4-3-2. 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす酵素濃度の影響と設定濃度の整合性について

酵素濃度によって生成物の量は比例的に変化するとされているが、今回の結果では正比例的な兆候は見られなかった。特にブラッドフォード法での測定値は激しく上下しており、酵素によって兆候も全く異なっていた。そのため、ブラッドフォード法による結果から、設定濃度が適切であったかを判断することは困難である。一方、

ニンヒドリン反応の測定値は低濃度の酵素では緩やかに変化し、ある濃度を境に大きく変化するというおおよそ一貫性のある兆候が見られた。オリエンターゼ ON とオリエンターゼ AY では 0.1% を境に、オリエンターゼ 90N とオリエンターゼ 22BF では 0.01% を境に大きな変化が見られたことから、本研究で設定した酵素濃度 0.1% はオリエンターゼ ON とオリエンターゼ AY にとって低濃度であり、オリエンターゼ 90N とオリエンターゼ 22BF にとっては適切な濃度であったと考えられる。

4-3-3. 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす基質濃度の影響について

一定量の酵素に対し基質濃度を増やした場合、一般に基質濃度の低いうちは比例的に酵素活性が上昇し、ある濃度以降は酵素活性の上昇が起これらなくなるとされている。酵素量の上限から、基質と結合可能な酵素が飽和現象を引き起こすことがその要因の一つとされている。今回のブラッドフォード法の測定値のスタンダードとの差分では、全ての酵素でそのような兆候は見られなかった。即ち、今回設定した基質濃度の範囲は飽和に至る濃度でなかったことが予測される。一方、ニンヒドリン反応の測定値のスタンダードとの差分では、オリエンターゼ ON とオリエンターゼ AY では、およそ直線的に酵素活性が増加していた。そのため、これらの酵素においては、ブラッドフォード法における判断と同様に、今回設定した基質濃度の範囲は飽和に至る濃度でなかったことが予測される。一方、オリエンターゼ 90N とオリエンターゼ 22BF では、酵素量の 8,000 倍である 80mg を境に酵素活性の上昇が穏やかになっていた。そのため、これらの酵素では 8000 倍の基質の存在で飽和現象が引き起こされる可能性がある。しかし、ブラッドフォード法での兆候や後述するニンヒドリン反応の特性を加味すると、測定値に現れないペプチドの生成が 80mg 以降の基質濃度でも進んでいた可能性もあり、断言することは出来ない。最終生成物及び中間生成物のみを検知する測定法を用いることで正確な特性を分析できると考える。

4-3-4. 酵素活性の測定法の特徴と測定結果への影響、および予測される 4 種の新規プロテアーゼ共通の特徴

今回の酵素活性測定では一様な一定順序の効果は見られず、ブラッドフォード法、ニンヒドリン反応の双方で測定結果に波が現れた。ブラッドフォード法の測定値は、タンパク質あるいはペプチド量が多いほど高い値を示すが、分子量 3,000 未満のペプチドでは反応を示さなくなり、測定値が減少するという特徴がある。このことから、基質の低分子化が進行する酵素反応に対する活性測定に用いられる方法である。この特徴から、今回のブラッドフォード法の測定値の上昇時には、分子量 3,000 以上のペプチドの生成が優位となっており、下降時には分子量 3,000 未満のペプチドの生成が優位となっていたことが推測できる。すなわち、今回用いた 4 種の酵素は一定サイズのペプチドを順序よく生成するわけではなく、高分子ペプチドと低分子ペプチドを不特定の順序で同時に生成し、最終的に一定サイズの低分子ペプチドへと分解していくことが予測できる。

一方、ニンヒドリン反応はタンパク質あるいはペプチドの末端のアミノ酸に反応して一般に青色ないし青紫を呈色するため、測定溶液中のペプチドの数が増えることで測定値は高い値となる。この特徴は、酵素反応によって基質が何分子のペプチドに分解されたかを測定することに利用される。しかし、反応するアミノ酸の種類によって発する色が異なり、プロリンでは黄色、ヒドロキシプロリンでは橙色、それ以外のアミノ酸で青色ないし青紫を呈色する特徴がある。今回の測定では青色の呈色をターゲットとした為、酵素によってプロリンあるいはヒドロキシプロリンを末端とするペプチドが生成された場合には青色の濃度が低下し、測定値も低下することとなる。よって、今回のニンヒドリン反応の測定値の下降時にはプロリンもしくはヒドロキシプロリンを末端とするペプチドの生成が優位となっており、上昇時にはそれ以外のアミノ酸を末端としたペプチドの生成が優位となっていたことが推測できる。このことから、4種の酵素は単一のアミノ酸を起点として低分子化を進めるわけではなく、プロリンもしくはヒドロキシプロリンを含む、複数のアミノ酸を切断可能部位としており、特に反応時間と酵素活性の結果から最終生成物はプロリンもしくはヒドロキシプロリンを末端とするペプチドであったことが予測できる。

4-4. 実験1、実験2、実験3の結果を総合的に検討した考察

実施した実験のそれぞれの結果と考察を相互に照らし合わせるにより、新たな考察が導かれる。以下にそれらの考察内容を述べる。

4-4-1. 高温高圧加熱と酵素処理の低アレルギー化効果の違い

高温高圧加熱と酵素反応では、真の抗原量、抗原認識率ともに、酵素反応による効果が明らかに高い。これは、今回用いた測定キットが複数のエピトープと結合可能で、その量を測定する特徴を持つことに起因すると考える。酵素反応によるタンパク質への影響が、ペプチドの切断による低分子化であり、低分子化の際にエピトープも切断している為に抗原量及び抗原認識率が低下したと推察できることに対し、高温高圧加熱によるタンパク質への影響が、タンパク質の高次構造の変化であり、エピトープ自体への作用が酵素反応に比べて少なかった為、抗原量及び抗原認識率が低下しなかったものと推察する。

4-4-2. 4種の新規プロテアーゼに予測される共通の特徴とグルテンに対する低アレルギー化への作用について

著者は、4-3-4. で、ブラッドフォード法の特徴から、4種の酵素は、「高分子ペプチドと低分子ペプチドを不特定の順序で同時に生成し、最終的に一定サイズの低分子ペプチドへと分解していく」という可能性を述べた。この考察は、4-2-1. で述べた考察の、「エピトープペプチドの切断とともに1分子にエピトープとなる配列を複数含むペプチドが生成されており、さらに反応を進めることでそれぞれのエピトープに分解されたため」、という部分を支持している。

一方、酵素活性測定におけるニンヒドリン反応の兆候から、4種の酵素の切断可能部位にプロリンが含まれる可能性も述べた。このことから、2-4-1. で述べたエピトープの切断部位の更なる仮説が導かれる。即ち、今回用いた4種の酵素はグルテンのエピトープとして確認されているPQQPF、QQFPF、QQQPPを含むペプチドのプロリン部位を切断可能であり、それにより低アレルギー化へ導いたことが予測できる。

4-4-3. 抗原量相対値と抗原認識率の違い

各処理群の抗原量相対値と抗原認識率の相違を比較できるように、高温高圧加熱処理グルテンの抗原量相対値と抗原認識率を表6)に、4種の新規プロテアーゼによって処理したグルテンの抗原量相対値と抗原認識率を表7)にまとめた。抗原量相対値では対象群に比べ有意に低値と認められなかった群が抗原認識率では有意に低値であると認められたり、抗原量相対値、抗原認識率共に対象群と比べて有意に低値であるが抗原量相対値より抗原認識率の方が高い数値であったりと、ユニークな違いが見られた。

抗原量相対値は各処理グルテンの測定溶液中の抗原が、対象群としたグルテンに対してどれだけ存在しているかを示したものである。一方、抗原認識率は処理後のタンパク質内に抗原がどれだけ残っているかを示したものである。そのため、数値が一致しないのは当然であるが、抗原量相対値では、新居らが指摘していた通り、その時の各測定溶液に含まれる抗原タンパク質量、またはタンパク質総量によって値が変動する可能性が高い。それに対して抗原認識率は、各測定溶液中のタンパク質量の多寡を排除した値となって現れるため、純粋に処理による効果を評価することができる。そのため、FASTKIT エライザシリーズで抗原量低下の比較・評価を行う場合には抗原認識率は有効な指標になると考えられる。

5. 結論

本研究では、抗原認識率の評価をしたことにより、各処理における抗原量の変化を正確に捉える事ができた。その結果、高温高圧加熱処理よりも酵素による処理の方が高い低アレルギー化効果を持つことが確認できた。特にオリエンターゼ 22BF の低アレルギー化効果が優れていることが明らかになった。しかし、抗原と交叉性のある酵素も報告されている²⁰⁾ため、この点に関して慎重に扱わなくてはならない。また、高温高圧加熱処理では抗原量、抗原認識率ともに低下が確認されなかったが、実際に食品を摂取した場合は、消化・吸収の過程を経て体内に取り込まれる。高温高圧加熱処理によって変性したグルテンで、アレルギー成分の吸収が抑制されていた場合、表れる症状も抑制される可能性が考えられる。そのため、酵素処理グルテンも高温高圧加熱処理グルテンも量的評価のみならず、動物実験等を通じて生体における効果の面を更に検証する必要がある。

本研究において低アレルギー化が認められた酵素処理グルテンは、グルテンを必要とする食品に、アレルギー性の低いグルテンを提供できる可能性を示唆している。特に今回用いた酵素はいずれも

食品添加物として利用されている酵素を選択しているため、経口摂取への安全性も高いことが考えられる。また、オートクレーブによる加熱は加工食品の殺菌工程として用いられる手法である為、生体における効果の面に有効であった場合には、安全かつ有効な加工方法となり得る可能性がある。

尚、効果が見られた酵素処理グルテンを添加物として利用する場合、物性的な性質が重要であり、物性的変化も追跡しなくてはならないが、本研究で処理したグルテンにおいてはそれらに関する十分な検証は行っていない。しかし、藤野²⁰がオリエンターゼ 90N で処理したグルテンを用いての麺の作製に成功しており、麺への展開が可能であることが期待できる。ただし、各処理によっていくらか低アレルギー化効果を得ることができ、食品展開が可能であったとしても、嗜好性を失っている食品としての役目を果たさないため、より嗜好性の高い応用食品についても検討しなくてはならない。

6. 謝辞

最後に、実験にあたって試料酵素を提供いただきましたエイチビィアイ株式会社の堰口明義社長、伊藤洋三部長、修士論文の執筆にあたって、絶えず御指導を下さいました美作大学大学院谷口誠教授、美作大学短期大学部桑守正範教授、実験データの解析を御指導いただきました美作大学短期大学部栗脇淳一准教授に本紙面を借りて深く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- 1) 海老沢元宏, 厚生労働省科学研究班による「食物のアレルギー診療の手引き 2011」. 2011.
- 2) 五藤和子, 高増哲也, 池辺敏市, 栗原和幸, 食物アレルギーおよびその治療としての除去に起因する体重増加不良をきたした 12 例. アレルギー, 45, 260, 1996.
- 3) 三浦優子, 笹井敬子, 金子堅一郎, 食物アレルギーにおける食物抗原の除去と骨密度. アレルギー, 45, 261, 1996.
- 4) 下川伸子, 尾岸恵三子, アナフィラキシー児の養育者における食物アレルギーの意味. 小児保健研究, 70, 486-494, 2011.
- 5) 高木瞳, 食物アレルギー児給食の保育園・幼稚園の対応と保護者の要望. 岐阜聖徳学園大学短期大学部紀要, 35, 39-52, 2003.
- 6) 大谷智子, 小児科領域における研究と治療の進歩(7)食物アレルギー. 東京女子医科大学雑誌, 81, 171-177, 2011.
- 7) 栗原和幸, 食物アレルギーの経口免疫療法(経口耐性誘導). Journal of environmental dermatology and cutaneous allergology, 5, 365-372, 2011.
- 8) 香西はな, 矢野博己, 加藤保子, 小麦タンパク質とアレルギー—小麦依存性運動誘発アナフィラキシーに注目して—. 川崎医療福祉学会誌, 16(1), 11-19, 2006.
- 9) Ikezawa.Z, [Effect of hypoallergenic wheat(HAW-A1) on atopic dermatitis(AD)with wheat allergy. And its antigenic analysis using sera from patients with AD]. arerugi, 43, 679-688, 1994.

- 10) 野上直行, 松野正知, 原崇, 城斗志夫, 西海理之, 鈴木敦士, 高圧処理による食品タンパク質のアレルゲン性低減化. 高圧力の科学と技術, 16, 11-16, 2006.
- 11) 新居佳孝, 岡久修己, 大村芳正, 小麦アレルゲンの検出法とその低減化に関する研究. 徳島工技センター業務報告平成 16 年度, 52, 2006.
- 12) 渡辺道子, 渡辺純, 園山慶, 田辺創一, 酵素分解による小麦粉の低アレルゲン化. 日本農芸化学会誌, 76, 1090-1091, 2002.
- 13) TANABE Soichi, WATANABE Michiko, Production of Hypoallergenic Wheat Flour. Food science and technology research, 5, 317-322, 1999.
- 14) 田辺創一, 手崎彰子, 渡辺道子, 池澤善郎, 荒井綜一, プロメライン処理による低アレルゲン化小麦粉の作製およびその製パンへの応用: 食品. 日本農芸化学会誌, 70, 19, 1996.
- 15) van den Broeck Hetty C., America Antoine H., Smulders Marinus J., Bosch Dirk, Hamer Rob J., Gilissen Ludovicus J., van der Meer Ingrid M., Journal of chromatography. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. J Chromatogr B Analyt Technol biomed life sci, 877, 975-982, 2009.
- 16) Tanaka M, Nagano T, Yano H, Matsuda T, Ikeda TM, Haruma K, Kato Y, Impact of ω -5 gliadin on wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis in mice. Biosci Biotechnol Biocem, 70, 313-317, 2011
- 17) 高橋享子, 鎌田陽子, 友政美紀, 森寛, 阪田まり子, 大室和代, 低アレルゲン化卵ボーロによる減感作療法. アレルギー, 54, 1052, 2005.
- 18) 片岡榮子, 古庄律, 安原義, 栄養学・食品学を学ぶヒトのための食品科学実験 [第二版]. 地人書館, 116-117, 2003.
- 19) 和田淑子, 大越ひろ, 健康・調理の科学—おいしさから健康へ—. 建泉社, 156-157, 2004.
- 20) Watanabe J, Tanabe S, Sonoyama K, Kuroda M, Watanabe M, IgE-reactive 60 kDa glycoprotein occurring in wheat flour. Biosci Biotechnol Biocem, 65, 2102-2105, 2001.
- 21) 老田茂, 小麦カルボキシペプチダーゼによる小麦アレルゲンタンパク質の分解. 東北農業研究, 61, 205-206, 2008.
- 22) 老田茂, 林高見, 亀山眞由美, 発芽小麦種子プロテアーゼによる小麦グリアジン・グルテニンのエпитープ分解. 東北農業研究センター研究成果情報, 2009.
- 23) 田辺創一, 手崎彰子, 渡辺道子, 柳原行義, 小麦アレルゲンとパynaupル由来酵素プロメラインの交叉反応性. アレルギー, 46, 1170-1173, 1997
- 24) 藤野由佳, 低アレルゲン化小麦たんぱくを用いた製麺法の検討. 美作大学食物学科卒業研究, 2012.

8. 図表

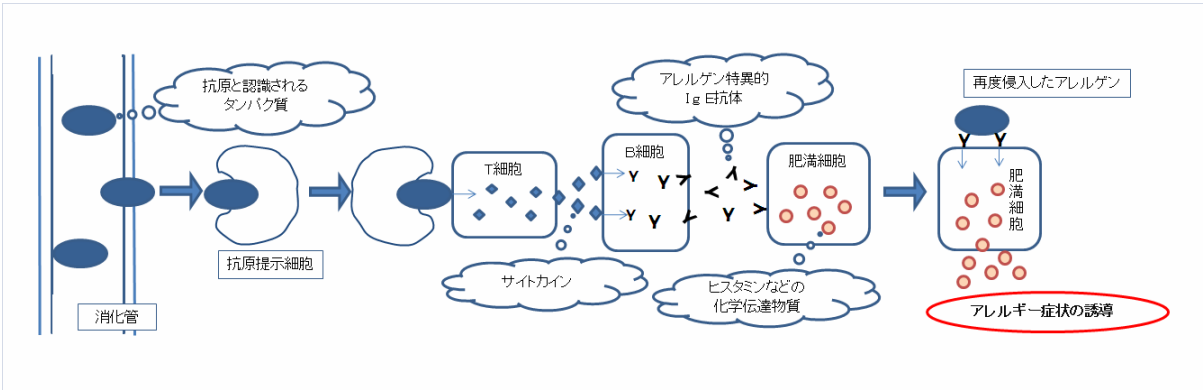


図 1) I 型アレルギーの発症機序

表1)未処理グルテンと高温高压加熱処理グルテンの吸光度および抗原量相対値

	吸光度(abs/ml)	抗原量相対値
対照群	0.771±0.202	1.000±0.262
加水	0.657±0.071	0.851±0.071
無水	0.843±0.105	1.093±0.136

対照群:未処理グルテン、加水:加水状態高温高压加熱処理グルテン、無水:未加水状態高温高压加熱処理グルテンを指す。

表 2)未処理グルテンと高温高压加熱処理グルテンの
各測定溶液中のタンパク質量、真の抗原量、抗原認識率

	タンパク質量(mg/ml)	抗原量(mg/ml)	抗原認識率(%)
対照群	13.76±0.072	13.76±3.61	100.0±26.2
加水	12.51±0.072	11.71±1.26	93.6±10.1
無水	13.58±0.605	15.04±1.87	110.7±13.8

対照群:未処理グルテン、加水:加水状態高温高压加熱処理グルテン、無水:未加水状態高温高压加熱処理グルテンを指す。

表 3) 未処理グルテンと 4 種の新規プロテアーゼ処理グルテンの
吸光度および抗原量相対値

	吸光度(abs/ml)	抗原量相対値
対照群	0.771±0.202	1.000±0.262
ON 0min	0.755±0.033	0.979±0.106
ON 10min	0.432±0.067	0.560±0.087
ON 20min	0.495±0.035	0.642±0.046
ON 30min	0.383±0.118*	0.497±0.153*
90N 0min	0.798±0.077	1.035±0.074
90N 10min	0.835±0.041	1.083±0.053
90N 20min	0.254±0.053*	0.329±0.069*
90N 30min	0.364±0.033*	0.471±0.042*
AY 0min	0.837±0.047	1.085±0.019
AY 10min	0.183±0.069**	0.237±0.090**
AY 20min	0.505±0.033	0.655±0.043
AY 30min	0.356±0.244	0.461±0.316
22BF 0min	0.782±0.086	1.013±0.021
22BF 10min	0.035±0.022**	0.046±0.028**
22BF 20min	0.112±0.010**	0.145±0.013**
22BF 30min	0.065±0.017**	0.084±0.022**

対照群:未処理グルテン、ON 0min:オリエンターゼ ON-0 分処理グルテン、ON 10min:オリエンターゼ ON-10 分処理グルテン、ON 20min:オリエンターゼ ON-20 分処理グルテン、ON 30min:オリエンターゼ ON-30 分処理グルテン、90N 0min:オリエンターゼ 90N-0 分処理グルテン、90N 10min:オリエンターゼ 90N-10 分処理グルテン、90N 20min:オリエンターゼ 90N-20 分処理グルテン、90N 30min:オリエンターゼ 90N-30 分処理グルテン、AY 0min:オリエンターゼ AY-0 分処理グルテン、AY 10min:オリエンターゼ AY-10 分処理グルテン、AY 20min:オリエンターゼ AY-20 分処理グルテン、AY 30min:オリエンターゼ AY-30 分処理グルテン、22BF 0min:オリエンターゼ 22BF-0 分処理グルテン、22BF 10min:オリエンターゼ 22BF-10 分処理グルテン、22BF 20min:オリエンターゼ 22BF-20 分処理グルテン、22BF 30min:オリエンターゼ 22BF-30 分処理グルテンを指す。*:対象群に対し危険率 5%未満で有意差を認める。**:対象群に対し危険率 1%未満で有意差を認める。

表 4) 未処理グルテンと 4 種の新規プロテアーゼ処理グルテンの
各測定溶液中のタンパク質量、真の抗原量、抗原認識率

	タンパク質量(mg/ml)	抗原量(mg/ml)	抗原認識率(%)
対照群	13.76±0.072	13.76±3.61	100.0±26.2
ON 0min	16.52±0.402	13.46±0.58	81.5±3.52
ON 10min	18.92±2.290	7.70±1.19	40.7±6.31*
ON 20min	16.25±1.604	8.83±0.63	54.3±3.87*
ON 30min	18.71±1.898	6.83±2.10*	36.5±11.2*
90N 0min	14.56±0.265	14.23±1.38	86.2±8.35
90N 10min	13.04±0.507	14.89±0.72	114.2±5.54
90N 20min	15.07±0.617	4.52±0.95*	30.0±6.33*
90N 30min	13.52±0.315	6.49±0.58	48.0±4.32*
AY 0min	13.56±1.076	14.92±0.84	90.3±5.07
AY 10min	17.72±0.892	3.26±1.24**	18.4±6.97**
AY 20min	17.23±0.797	9.01±0.60	52.3±3.47*
AY 30min	19.17±0.342	6.34±4.35	33.1±22.7*
22BF 0min	12.77±1.447	13.93±1.53	84.4±9.28
22BF 10min	8.40±1.074	0.63±0.39**	7.50±4.66**
22BF 20min	9.24±0.308	1.99±0.18**	21.6±1.96**
22BF 30min	8.75±0.627	1.15±0.30**	13.2±3.43**

対照群:未処理グルテン、ON 0min:オリエンターゼ ON-0 分処理グルテン、ON 10min:オリエンターゼ ON-10 分処理グルテン、ON 20min:オリエンターゼ ON-20 分処理グルテン、ON 30min:オリエンターゼ ON-30 分処理グルテン、90N 0min:オリエンターゼ 90N-0 分処理グルテン、90N 10min:オリエンターゼ 90N-10 分処理グルテン、90N 20min:オリエンターゼ 90N-20 分処理グルテン、90N 30min:オリエンターゼ 90N-30 分処理グルテン、AY 0min:オリエンターゼ AY-0 分処理グルテン、AY 10min:オリエンターゼ AY-10 分処理グルテン、AY 20min:オリエンターゼ AY-20 分処理グルテン、AY 30min:オリエンターゼ AY-30 分処理グルテン、22BF 0min:オリエンターゼ 22BF-0 分処理グルテン、22BF 10min:オリエンターゼ 22BF-10 分処理グルテン、22BF 20min:オリエンターゼ 22BF-20 分処理グルテン、22BF 30min:オリエンターゼ 22BF-30 分処理グルテンを指す。*:対象群に対し危険率 5%未満で有意差を認める。**:対象群に対し危険率 1%未満で有意差を認める。

表 5) 4 種の新規プロテアーゼ処理グルテンにおいて
最も抗原認識率が低下した群における比較

	抗原認識率 (%)
ON 30min	36.5 ± 11.2 ^a
90N 20min	30.0 ± 6.33 ^a
AY 10min	18.4 ± 6.97 ^{ab}
22BF 10min	7.50 ± 4.66 ^b

ON 30min:オリエンターゼ ON-30 分処理グルテン、90N 20min:オリエンターゼ 90N-20 分処理グルテン、AY 10min:オリエンターゼ AY-10 分処理グルテン、22BF 10min:オリエンターゼ 22BF-10 分処理グルテンを指す。異符号の群間に危険率 5%未満の有意差を認める。

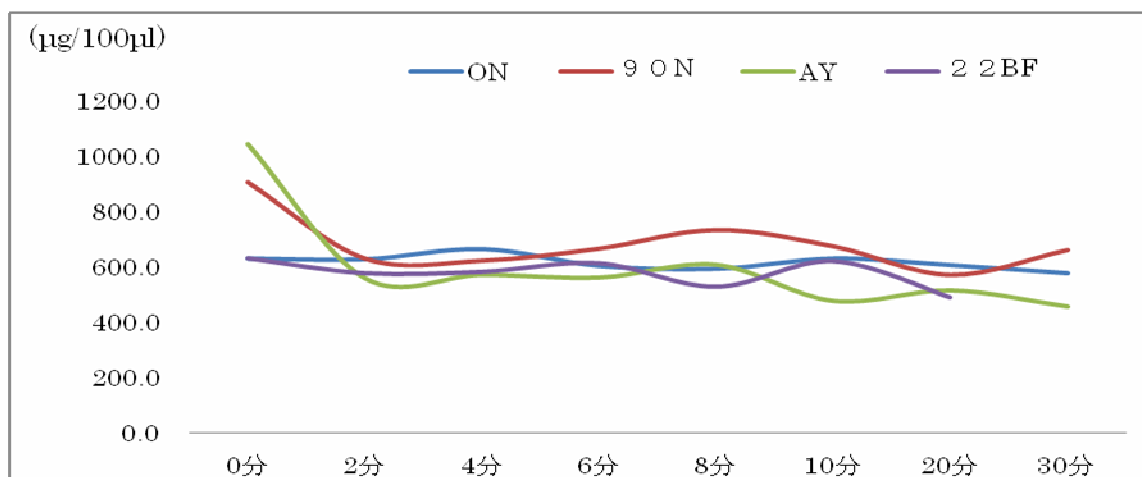


図 2) ブラッドフォード法による 4 種の新規プロテアーゼの
酵素活性の経時変化を調査した結果の一覧

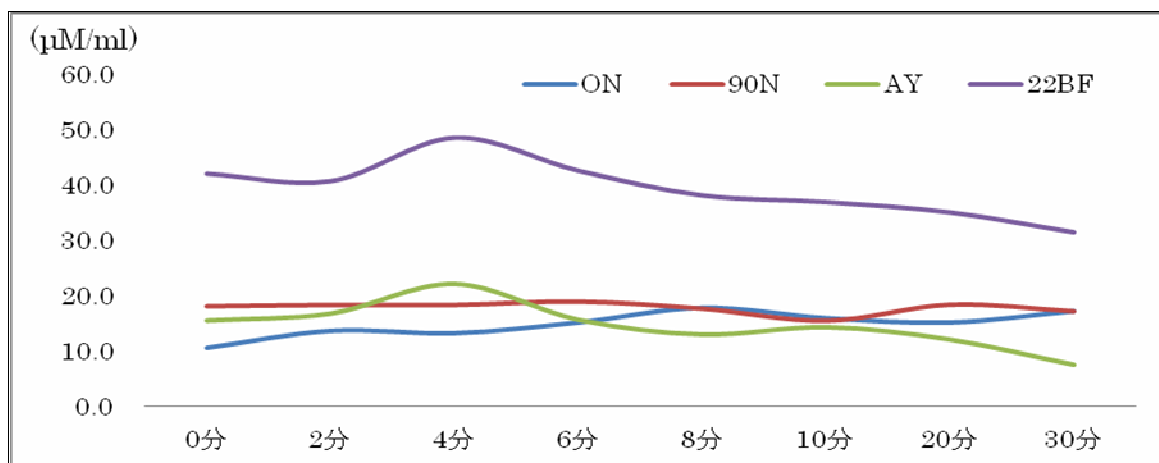


図 3) ニンヒドリン反応による 4 種の新規プロテアーゼの
酵素活性の経時変化を調査した結果の一覧

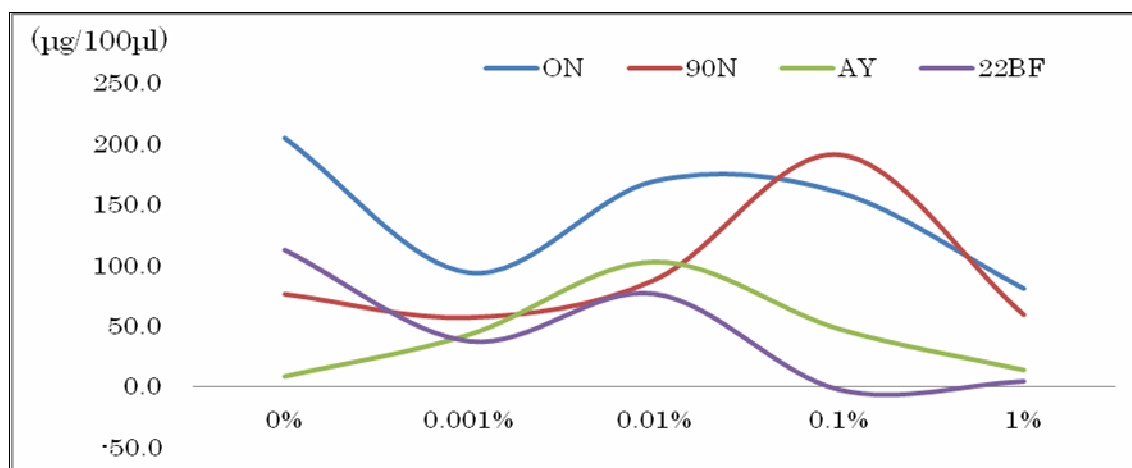


図 4) ブラッドフォード法による 4 種の新規プロテアーゼの
酵素活性に及ぼす酵素濃度の影響を調査した結果の一覧

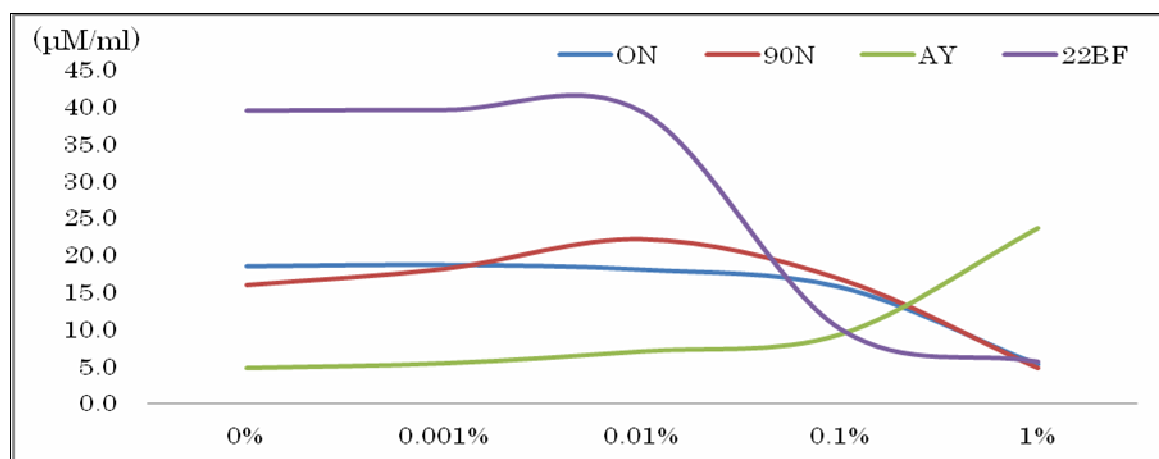


図 5) ニンヒドリン反応による 4 種の新規プロテアーゼの
酵素活性に及ぼす酵素濃度の影響を調査した結果の一覧

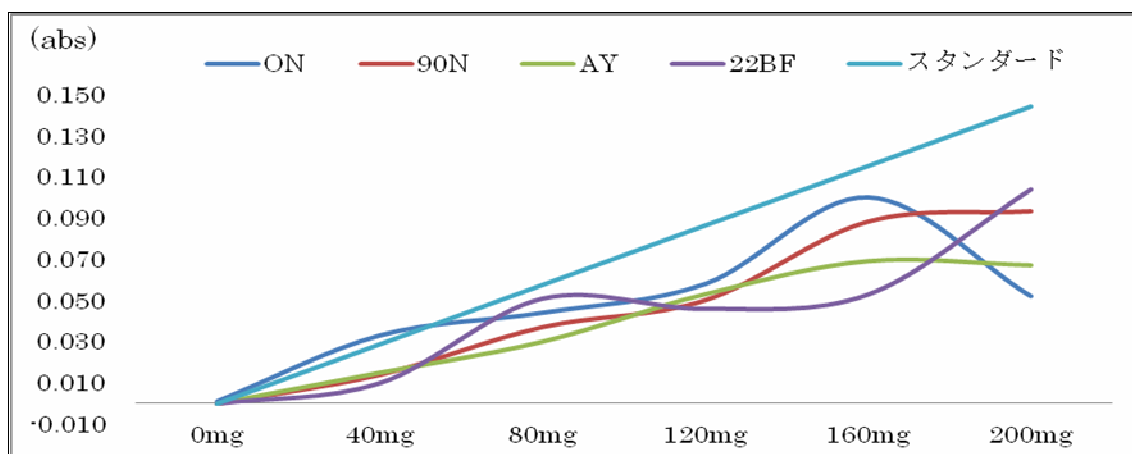


図 6) ブラッドフォード法による 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす基質濃度の影響を調査した結果の一覧

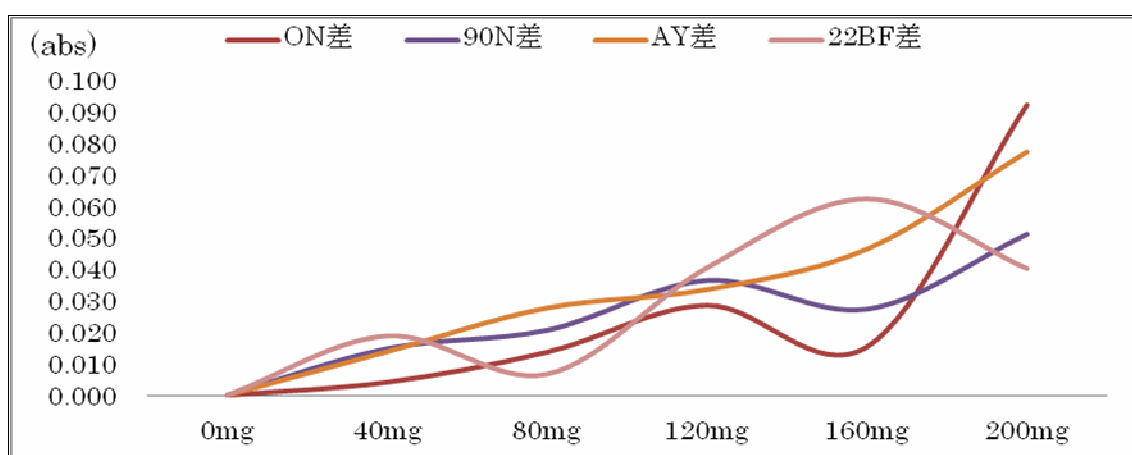


図 7) ブラッドフォード法による 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす基質濃度の影響を調査した結果の基質濃度本来の測定値との差の一覧

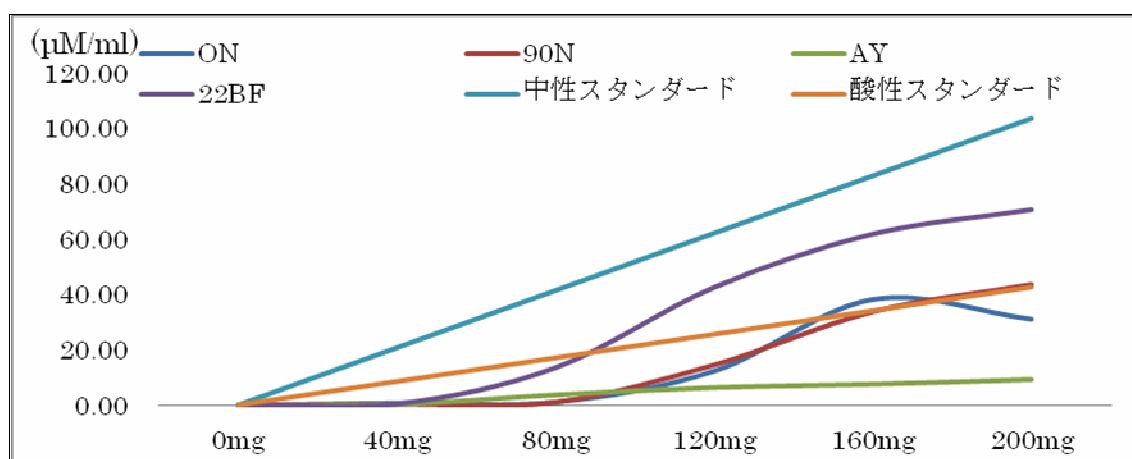


図 8) ニンヒドリン反応による 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす基質濃度の影響を調査した結果の一覧

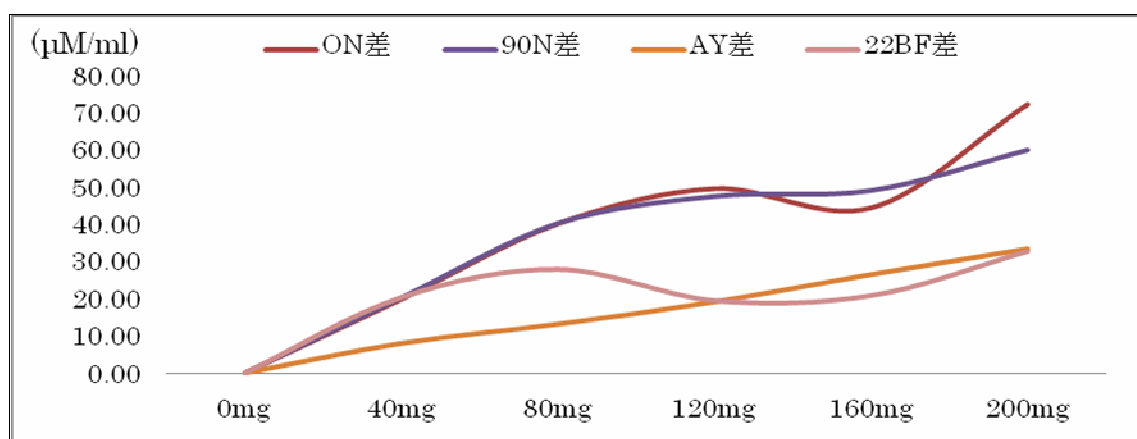


図 9) ニンヒドリン反応による 4 種の新規プロテアーゼの酵素活性に及ぼす基質濃度の影響を調査した結果の基質濃度本来の測定値との差の一覧

表 6)高温高压加熱処理グルテンの抗原量相対値と抗原認識率

	抗原量相対値	抗原認識率
加水	0.851	0.936
無水	1.093	1.107

対照群:未処理グルテン、加水:加水状態高温高压加熱処理グルテン、無水:未加水状態高温高压加熱処理グルテンを指す。

表 7) 4 種の新規プロテアーゼ処理グルテンの抗原量相対値と抗原認識率

	抗原量相対値	抗原認識率
ON 0min	0.979	0.815
ON 10min	0.56	0.407*
ON 20min	0.642	0.543*
ON 30min	0.497*	0.365*
90N 0min	1.305	0.862
90N 10min	1.083	1.142
90N 20min	0.329*	0.300*
90N 30min	0.471*	0.480*
AY 0min	1.085	0.903
AY 10min	0.237**	0.184**
AY 20min	0.655	0.523*
AY 30min	0.461	0.331*
22BF 0min	1.013	0.844
22BF 10min	0.046**	0.075**
22BF 20min	0.145**	0.216**
22BF 30min	0.084**	0.132**

対照群:未処理グルテン、ON 0min:オリエンターゼ ON-0 分処理グルテン、ON 10min:オリエンターゼ ON-10 分処理グルテン、ON 20min:オリエンターゼ ON-20 分処理グルテン、ON 30min:オリエンターゼ ON-30 分処理グルテン、90N 0min:オリエンターゼ 90N-0 分処理グルテン、90N 10min:オリエンターゼ 90N-10 分処理グルテン、90N 20min:オリエンターゼ 90N-20 分処理グルテン、90N 30min:オリエンターゼ 90N-30 分処理グルテン、AY 0min:オリエンターゼ AY-0 分処理グルテン、AY 10min:オリエンターゼ AY-10 分処理グルテン、AY 20min:オリエンターゼ AY-20 分処理グルテン、AY 30min:オリエンターゼ AY-30 分処理グルテン、22BF 0min:オリエンターゼ 22BF-0 分処理グルテン、22BF 10min:オリエンターゼ 22BF-10 分処理グルテン、22BF 20min:オリエンターゼ 22BF-20 分処理グルテン、22BF 30min:オリエンターゼ 22BF-30 分処理グルテンを指す。*:対象群に対し危険率 5%未満で有意差を認める。**対象群に対し危険率 1%未満で有意差を認める。