

氏 名	内藤 宙大
学 位 の 種 類	博 士 (栄養科学)
学 位 番 号	第 1 3 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 20 日
学 位 論 文 名	牛乳加工食品中の主要アレルゲンの性状解析
論 文 審 査 委 員	主査 教 授 井澤 一郎
	副査 高橋 亨子
	副査 教 授 和泉 秀彦
	副査 教 授 池田 彩子

論 文 内 容 の 要 旨

背景および目的

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

研究 1

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

研究 2

牛乳加工食品である、市販ヨーグルト 2 種 (*Bifido. Longum*, ヨーグルト A; *Lb. bulgaricus* + *Str. thermophilus*, ヨーグルト B) および市販チーズ 5 種 (セミハード、ハード、ホワイト、

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

研究 3

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

結論

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

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、遷延する牛乳アレルギーの原因となる主要なアレルゲンとして α_{S1} -カゼインを同定してその重要性を明らかにし、さらに、牛乳加工食品の生化学的な性状解析から、牛乳中では可溶化して存在している α_{S1} -カゼインが、加工食品中では不溶化していることを見出した。論文は4章構成で、各章はそれぞれの目的に合わせて合理的な方法で検証して結果を導き出しており、各章の関連性は高く、牛乳アレルギーの主要アレルゲンに焦点をあてた一貫したテーマでの研究になっている。

第1章では、牛乳タンパク質と牛乳アレルギーについて概説した。

第2章（研究1）では、遷延化した牛乳アレルギーに対する経口免疫療法（OIT）を受けた患者のアレルギー症状の改善と、患者血清中の牛乳タンパク質特異的IgEとの関係性から、牛乳中の α_{S1} -、 β -カゼインが重症牛乳アレルギー患者の主要アレルゲンであることを明らかにした。これまでの多くの論文では、牛乳アレルゲンは β ラクトグロブロンであると報告されているが、自然寛解することが多い乳児期における牛乳主要アレルゲンと遷延化した就学年齢期の牛乳主要アレルゲンを比較した報告はない。本研究の対象者が平均8歳で、年齢により原因タンパク質が異なる可能性があることを議論できたことは（本論文には記載されていないが）新規な推論とも言える。これを糸口として、自然寛解しやすい牛乳アレルギーが一部の患児で遷延化するメカニズムの解明を進めてほしい。一方、本研究では、最も相関係数が高値であった α_{S1} -カゼインを中心に解析し、これを主要アレルゲンとしてまとめられているが、 α_{S2} -カゼインの精製が難しく利用できなかったことや、残念ながら試料の制限から受動感作好塩基球の活性化実験が α_{S1} -カゼインしか行えなかったことなどから、 α_{S1} -カゼイン以外のカゼインについては今後さらなる検討が必要であると思われる。

第3章（研究2）では、乳製品の α_{S1} -カゼインを電気泳動法や阻害ELISAを用いて解析し、チーズの種類（製法）によって、タンパク質組成、 α_{S1} -カゼインの分解の程度や可溶性、および牛乳アレルギー患者IgE抗体反応性タンパク質の含有量が異なることを明らかにした。

第4章（研究3）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・焼成した時の α_{S1} -カゼインの溶解性に注目して解析し、 α_{S1} -カゼインは、特にグルテンを含む副食材と混捏・焼成することで不溶化し、抗原性が低下することを見出した。そして、研究2および3の結果から、調理加工によって起こる α_{S1} -カゼインの修飾や分解、溶解性の変化などがアレルゲン性の低下につながる可能性があることを指摘し、牛乳アレルギー患者にとって有益なものかを考察した。システイン残基をもたない α_{S1} -カゼインの溶解性に焦点をあてた論文は少なく、加工食品中での溶解性を解明したことは、新規性・独自性があり評価できる。しかし、食品中の不溶性タンパク質は消化管内で消化酵素により分解・可溶化され、アレルゲン性が現れる可能性があることから、不溶化によって低アレルゲン性になるかは、今後の検討課題であると思われる。

内藤宙大氏は、修士課程在籍時から一貫して、食物アレルギーの研究に取り組んでおり、本博士論文も、単なる個別の論文の寄せ集めではなく、牛乳アレルギーの主要アレルゲンの解析という一貫した研究テーマを追求したものである。食物アレルギーは、小児栄養や食育の分野において解明されるべき重要な研究テーマであり、博士論文の研究テーマとして妥当である。論文の内容は、牛乳アレルギーについて、今まで不明であった重症患者の主要アレルゲンを明らかにしたという点で、栄養科学的に新規性および有用性が認められ、また、主要アレルゲンの α_{S1} -カゼインが加工食品中で不溶化しているとの発見は、独創性、進歩性があり、これらの研究成果は食物アレルギーの OIT 研究に新たな知見を加えるものである。研究は、多くの国内外での先行研究をよく理解した上で行っており、目的に沿った実験方法・解析方法を設定して適切に遂行できている。論文の構成も適切である。口頭試問では、審査員からの意見・助言に対して真摯に受け止めて適切に回答できており、十分な学識、そして科学的・論理的思考能力が備わっていることがうかがえた。

研究のまとめ方、研究成果および考察、発表会・最終試験における質問の受け答えなどについて、総合的に評価したところ、本論文は本学大学院栄養科学研究科における博士論文に値すると判定する。