

学 位 論 文 題 名

低アルゲン化小麦粉の開発と そのアレルギー予防・治療効果の解析

学位論文内容の要旨

近年アレルギー患者数が増加しており、とくに先進諸国においては深刻な社会問題となりつつある。本邦においてもアレルギー患者数が急増しており、1991 年の厚生省（現 厚生労働省）のアレルギー性疾患調査では、男性で 33.4%、女性で 36.2%がなんらかのアレルギー様症状を訴えていると報告されている。アレルギーは生理学的に特定の物質に対する免疫系の過剰反応と定義されており、食物に対する過剰反応が誘導される状態が食物アレルギーである。従来から卵白、牛乳、大豆が三大アレルギーといわれてきた。しかし、食物アレルギーに起因するアトピー性皮膚炎患者のうち、三大アレルギーに比べて、小麦やコメといった穀物に感受性を示す患者が予想以上に多いことが報告されている。小麦アレルギーの主要な症状は湿疹、蕁麻疹、喘息、鼻炎などであり、小麦製品を摂取あるいは吸入した後、比較的早期に発症する。小麦の主要なアレルギーとして塩溶性画分中の α -アミラーゼインヒビター、塩不溶性画分中の QQQP 系をエпитープとするグルテンが報告されている。通常、食物アレルギー患者に対してはアレルギーとなる食品の除去が指導される。しかし、小麦は主食であるとともに小麦粉として多くの食品に配合されていることから、日常の食生活から小麦を完全に除去することは非常に困難である。このような背景から、摂取してもアレルギー症状が発症しない「低アレルギー化小麦粉」が社会的なニーズとなっていた。しかしながら、小麦には様々な成分がアレルギーとなっているために育種による低アレルギー小麦は実現していない。

このような状況をふまえ、本研究においては考えられるアレルギーを網羅的に食品加工用酵素を用いて低減化し、実用的プロセスにより低アレルギー化小麦粉を作製することを第一の目的とした。後述のように低アレルギー化小麦粉は、食物アレルギー予防あるいは治療機能を意図してデザインされたものである。そこで、動物実験により低アレルギー化小麦粉がアレルギー予防・治療効果を有することを示すとともに、そのメカニズムを明らかにすることを第二の目的とした。

1. 小麦粉に対粉 0.5%のセルラーゼを加え、50℃、1 時間反応した後、対粉 0.5%のアクチナーゼを加え、40℃、1 時間反応することにより小麦アレルギー患者 IgE との反応性が検出限界以下にまで低下した低アレルギー化小麦粉の作製法を確立した。アレルギー分解に用いたセルラーゼは、腸管のモデル系である透過性フィルター上に培養した Caco-2 細胞において、最も主要な食物アレルギーである卵白アルブミンの透過を抑制する活性を有していた。さらに、この低アレルギー化プロセスを用いることで、免疫調節に寄与すると考えられるペプチドを多量に残存させることが可能であった。なお、このプロセスは工業化され、低アレルギー化小麦粉製品がオーム乳業株式会社（福岡県大牟田市）より販売されている。

2. 得られた低アレルゲン化小麦粉はグルテン構造が破壊されており、一般家庭での加工が困難であると考えられたので、実際の食品に加工するための操作法と最適材料配合を決定した。低アレルゲン化小麦粉に含まれるデンプンを加熱糊化させたバターを原料とし、カップケーキ、ピザ、クッキー、ウェハー、パスタ様の麺およびスナック菓子を作製した。低アレルゲン化小麦粉を原料としたカップケーキを用いた小麦アレルギー患者に対する臨床試験が進んでおり、良好な結果が得られている。また、本研究で提出したカップケーキの配合を一部変更して 2000 年冬からデコレーションケーキが製造され (オーム乳業)、低アレルゲン化小麦粉第 1 号商品として市販されている。次の商品として企画されているのはパスタであり、この商品でも本研究で提出した配合を基本としている。
3. 小麦アレルゲンを分解するための酵素をスクリーニングする際、オリゴマンノース型糖鎖を有するプロメラインが小麦アレルギー患者血清 IgE と反応することがわかった。さらに、主要な小麦アレルゲンの 1 つである α -アミラーゼインヒビターの糖鎖構造が抗原認識に重要であることが報告されている。そこで、小麦粉中から患者血清 IgE と反応性を示す糖タンパク質の探索を行い、60 kDa タンパク質を新たに見いだした。このタンパク質はオリゴマンノース型糖鎖を有し、その N 末端配列は LDPDESEXVTRYFRIR であり、8 番目のアミノ酸が糖鎖の結合したアスパラギンであると推定された。得られたアミノ酸配列と既知のタンパク質との相同性をデータベースにより検索したところ、60 kDa 糖タンパク質は新規であると考えられた。さらに、60 kDa 新規糖タンパク質を 1. に示した低アレルゲン化プロセスと同様にセルラーゼおよびアクチナーゼ処理することにより、IgE 反応性が消失することを明らかにした。
4. Brown Norway ラットをグルテンで免疫した後、キモトリプシン消化により抗原性を保ったまま可溶化したグルテン抗原を吸入させることによって、グルテン特異的な気道炎症を示す動物モデルを確立した。本動物モデルを用いて低アレルゲン化小麦粉のグルテン誘導気道炎症予防効果を調べた。その結果、低アレルゲン化小麦粉をグルテン抗原の吸入前に摂取させることにより、気管支肺胞洗浄液中の好酸球、好中球およびリンパ球数が顕著に減少したことから、グルテン誘導気道炎症が予防され得ることが強く示唆された。
5. Brown Norway ラットをグルテンで免疫した後に、低アレルゲン化小麦粉を摂取させると、血中の小麦特異的抗体レベル、グルテン抗原に応答した脾臓由来単核球の増殖応答およびサイトカイン mRNA 産生応答が無処理小麦粉を摂取させた場合以上に抑制された。すなわち、低アレルゲン化小麦粉はグルテンに対する免疫寛容を誘導することが証明され、低アレルゲン化小麦粉摂取によるグルテン誘導気道炎症の予防は免疫寛容の誘導を介していることが示唆された。さらに、小麦アレルギー患者による臨床試験の結果、大多数の患者では低アレルゲン化小麦粉を摂取してもアレルギー症状が惹起されないことが明らかとなっているので、低アレルゲン化小麦粉はアナフィラキシーショックなどの副作用を起こすことなくアレルギー予防・治療に適用できる可能性が示唆された。

本研究では、小麦アレルギー患者にも摂取可能な低アレルゲン化小麦粉を開発するとともに、低アレルゲン化小麦粉摂取により免疫寛容が誘導可能であることを明らかにした。本研究の成果は、小麦粉製品を全く摂取できず不自由な食生活を強いられている患者の治療に役立ち、ひいては小麦

アレルギーの根本的解決につながることを期待される。今後、アレルギー治療・予防機能発現のために必要な分子構造条件を明らかにすることにより、本研究で提案した低アレルゲン化食品に関する技術思想は小麦のみならず他の食品にも広く応用できると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 西 隆 則

副 査 教 授 青 山 頼 孝

副 査 教 授 渡 辺 道 子 (高崎健康福祉大学健康栄養学科)

副 査 助 教 授 田 辺 創 一 (広島大学生物生産学部)

学 位 論 文 題 名

低アルゲン化小麦粉の開発と

そのアレルギー予防・治療効果の解析

近年アレルギー患者数が増加しており、先進諸国において深刻な社会問題となりつつある。従来から卵白、牛乳、大豆が三大アレルギーといわれてきた。しかし、三大アレルギーに比べて小麦やコメといった穀物に感受性を示す患者が予想以上に多いことが報告されている。通常、食物アレルギー患者に対してはアレルギー除去療法が行われるが、小麦は主食であるとともに小麦粉として多くの食品に配合されていることから、小麦を完全に除去することは非常に困難である。このような背景から、摂取してもアレルギー症状が発症しない「低アレルギー化小麦粉」が社会的なニーズとなっていた。

このような状況をふまえ、本研究においてはアレルギーを食品加工用酵素により低減化し、実用的プロセスにより低アレルギー化小麦粉を作製することを第一の目的とした。後述のように低アレルギー化小麦粉は、食物アレルギー予防あるいは治療機能を意図してデザインされたものである。そこで、動物実験により低アレルギー化小麦粉がアレルギー予防・治療効果を有することを示すとともに、そのメカニズムを明らかにすることを第二の目的とした。

1. 小麦粉に対粉0.5%のセルラーゼを加え、50℃、1時間反応した後、対粉0.5%のアクチナーゼを加え、40℃、1時間反応することにより小麦アレルギー患者 IgE との反応性が検出限界以下にまで低下した低アレルギー化小麦粉の作製法を確立した。用いたセルラーゼは、腸管のモデル系である Caco-2 細胞において、最も主要な食物アレルギーである卵白アルブミンの透過を抑制した。さらに、この低アレルギー化プロセスを用いることで、免疫調節に寄与すると考えられるペプチドを多量に残存させることが可能であった。なお、このプロセスは工業化され、低アレルギー化小麦粉製品がオーム乳業株式会社（福岡県大牟田市）より販売されている。

2. 得られた低アレルゲン化小麦粉はグルテン構造が破壊されており、一般家庭での加工が困難であると考えられたので、実際の食品に加工するための操作法と最適材料配合を決定した。低アレルゲン化小麦粉に含まれるデンプンを加熱糊化させたバターを原料とし、カップケーキ、ピザ、クッキー、ウェハー、パスタ様の麺およびスナック菓子を作製した。低アレルゲン化カップケーキを用いて小麦アレルギー患者に対する臨床試験が進んでおり、良好な結果が得られている。
3. 主要な小麦アレルゲンの 1 つである α -アミラーゼインヒビターの糖鎖構造が抗原認識に重要であることが報告されている。そこで、小麦粉中から患者血清 IgE と反応性を示す糖タンパク質の探索を行い、60 kDa タンパク質を新たに見いだした。このタンパク質はオリゴマンノース型糖鎖を有し、その N 末端配列は LDPDESEXVTRYFRIR であり、8 番目のアミノ酸が糖鎖の結合したアスパラギンであると推定された。さらに、60 kDa 新規糖タンパク質を 1. に示した低アレルゲン化プロセスと同様にセルラーゼおよびアクチナーゼ処理することにより、IgE 反応性が消失することを明らかにした。
4. Brown Norway ラットをグルテンで免疫した後、キモトリプシン消化により抗原性を保ったまま可溶化したグルテン抗原を吸入させることによって、グルテン特異的な気道炎症を示す動物モデルを確立した。本動物モデルにおいて、低アレルゲン化小麦粉をグルテン抗原の吸入前に摂取させることにより、気管支肺胞洗浄液中の好酸球、好中球およびリンパ球数が顕著に減少したことから、グルテン誘導気道炎症が予防され得ることが強く示唆された。
5. Brown Norway ラットをグルテンで免疫した後に、低アレルゲン化小麦粉を摂取させると、血中の小麦特異的抗体レベル、グルテンに応答した脾臓由来単核球の増殖応答およびサイトカイン mRNA 産生応答が抑制された。すなわち、低アレルゲン化小麦粉はグルテンに対する免疫寛容を誘導することが証明され、低アレルゲン化小麦粉摂取によるグルテン誘導気道炎症の予防は免疫寛容の誘導を介していることが示唆された。さらに、大多数の小麦アレルギー患者では低アレルゲン化小麦粉を摂取してもアレルギー症状が惹起されないことが明らかとなっているので、低アレルゲン化小麦粉は副作用を起こすことなくアレルギー予防・治療に適用できる可能性が示唆された。

本研究では、小麦アレルギー患者にも摂取可能な低アレルゲン化小麦粉を開発するとともに、低アレルゲン化小麦粉摂取により免疫寛容が誘導可能であることを明らかにした。本研究の成果は、小麦粉製品を全く摂取できず不自由な食生活を強いられている患者の治療に役立ち、ひいては小麦アレルギーの根本的解決につながることを期待される。

よって審査員一同は、渡辺純が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。