

市販ヨーグルト中の β -ラクトグロブリンの抗原性と 消化性に関する研究

坂井堅太郎, 水羽 陽子^{*1}, 清水池綾子, 鉄穴森陽子^{*2}, 谷廣佳奈子^{*2},
高松 寛子^{*2}, 萩原 知保^{*3}, 井原早枝子^{*3}, 中島 康絵^{*3},
高野 路子^{*4}, 上田久美子^{*4}

(2006年10月10日 受理)

Antigenicity and digestibility of β -lactoglobulin in commercially available yogurt

Kentaro SAKAI, Yoko MIZUHA, Ayako SHIMIZUIKE, Yoko KANAMORI, Kanako TANIHIRO,
Hiroko TAKAMATSU, Chiho HAGIHARA, Saeko IHARA, Yasue NAKAJIMA,
Michiko KOHNO and Kumiko UEDA

Abstract

Yogurt is a production from fermentation of cow's milk, and is one of major allergenic foods containing a high allergenic protein, called β -lactoglobulin (β -LG). Although allergenicity in yogurt is not well known, patients with food allergy against cow's milk generally eliminate it to prevent allergic syndromes. Because of strong relationship of allergenicity in food proteins with their antigenicity as well as resistance to gastroentero-digestive enzymes, we used the methods of ELISA inhibition, SDS-PAGE and immunoblots to assess antigenic level and peptic-digestibility against β -LG in commercially available yogurt by comparison with two types of heat pasteurized cow's milks (low temperature long time-treated milk (LTLT) and ultra-high temperature-treated milk (UHT)). There is less difference of antigenic activity against β -LG between yogurt and cow's milks (LTLT and UHT). In analysis of SDS-PAGE, the profile of peptic-digestion showed that intact protein of casein was rapidly disappeared in cow's milks (LTLT and UHT) and yogurt, whereas the digestibility of β -LG was less in LTLT and well in UHT and yogurt. Similar profile of peptic-digestibility between UHT and yogurt was revealed by immunoblot analysis with slight difference visualizing more fragmented small peptides along with antigenicity against β -LG in yogurt as compared with those in UHT.

^{*1} 2004年度広島女学院大学大学院人間生活学研究科修了

^{*2} 広島女学院大学大学院人間生活学研究科生活科学専攻

^{*3} 2004年度広島女学院大学生活科学部卒業

^{*4} 2005年度広島女学院大学生活科学部卒業

These results are reasonable for patients with cow's milk allergy to remove yogurt as same as cow's milk. In addition when the ill is gradually liberated, suitable release from avoidance food may be present in order as former in UHT and yogurt and latter in LTLT, in the point of peptic-digestibility of β -LG.

I 緒 言

食物を摂取することによって生体に不利な反応が起こり、その反応が免疫学的機序によるものを食物アレルギーと定義している¹⁻⁵⁾。食物アレルギーの治療の基本は除去食療法とされているが、患者が小児である場合は成長・発達過程の重要な時期であるので、実施に際しては十分な栄養補給とアレルギー反応の出現を抑えるための調理方法の工夫も必要である。しかし、現状では、食品加工や加熱調理による食品のアレルゲン性の変化に関する情報はそれほど多くはなく、アレルギー症状の程度に応じた食生活指導も十分に体系化されていない。

食物アレルギーの原因となっている主な食品には、鶏卵が最も多く、鶏卵に続き牛乳による割合が高くなっている^{6,7)}。牛乳に含まれる成分の中で、 β -ラクトグロブリン (β -LG) は、消化酵素に対して抵抗性を示し、また、人乳に含まれない異種性のタンパク質であることから、乳幼児を中心に主な牛乳アレルギーとなっている⁸⁾。一方、ヨーグルトは牛乳を原料とし、そのタンパク質成分は牛乳とほぼ同じであることから、牛乳アレルギーの緩解に伴う除去食解除の対象としては、牛乳と同等またはやや早い段階の食品となっている (表1)。

表1 牛乳およびヨーグルトの成分組成
(100g 当たり)

	普通牛乳	ヨーグルト(全脂無糖)
エネルギー (kcal)	67	62
タンパク質 (g)	3.3	3.6
脂 質 (g)	3.8	3.0
炭水化物 (g)	4.8	4.9
カルシウム (mg)	110	120
ナトリウム (mg)	41	48

五訂増補日本食品標準成分表より

一般的に食物アレルギーになりやすいタンパク質は消化酵素に抵抗性があり、またタンパク質の抗原性の強さにも関係が強いことが知られている⁹⁾。これまで、加熱殺菌方法の異なる市販牛乳に含まれるタンパク質成分の消化性と抗原性の変化に関する検討が行われているが、ヨー

グルトのアレルゲン性を牛乳と比較して詳細に研究した報告はない。また、ヨーグルトは、牛乳を原料として発酵することにより製造されることから、発酵による製造過程でアレルゲン性の強さに変化が生じていることも考えられる。

そこで、本研究では市販ヨーグルトに含まれる β -LG のペプシンに対する消化性と抗原性の違いを低温殺菌牛乳 (LTLT) および超高温殺菌牛乳 (UHT) を比較対照として検討した。

II 実験方法

1. 実験材料

実験には一般のスーパーマーケットで販売されているヨーグルト (全脂無糖) 4 銘柄 (Y-1, -2, -3, -4), LTLT 1 銘柄 (殺菌条件: 65°C30分間), UHT 1 銘柄 (殺菌条件: 140°C 3 秒間) を用いた。

2. 競争阻害 ELISA¹⁰⁾

ELISA 用96穴マイクロプレート (旭テクノグラス (株)) に、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解した β -LG (5 μ g/ml) (Sigma Chemical Company) を各穴に100 μ l 加え、室温で30分間緩やかに振とうした後、4°C で一晩放置した。0.05% Tween20を含むリン酸緩衝液 (T-PBS) で各穴を5回洗浄した後、ブロッキング操作として、リン酸緩衝液に0.4%の濃度になるように希釈したヤギ正常血清 (Vector Lab Inc) を各穴に200 μ l 加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、試料溶液の 1/3 希釈列を T-PBS で作成し、それぞれの50 μ l を各穴に加え、さらにリン酸緩衝液で10,000倍希釈した抗牛 β -LG ウサギ抗血清 (Bethyl Lab Inc) を50 μ l 加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、T-PBS で2,000倍希釈したアルカリホスホターゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Sigma) を各穴に100 μ l 加え、90分間放置した。T-PBS で洗浄後、100 μ l のアルカリホスホターゼ基質溶液 (Kirkegaard&Perry Lab, Inc) を加え、室温で20分間発色させた。50 μ l の 150 mM EDTA 溶液を加えて反応を停止した後、マイクロプレートリーダー (システムインスツルメンツ (株), イムノミニ NJ-2300) で 405 nm の吸光度を測定した。得られた阻害曲線から50%阻害に必要な試料希釈率を求めた。

3. ペプシン消化による試料の調製

1 ml の牛乳またはヨーグルトに 4 ml の蒸留水および 5 ml の 0.1 M クエン酸を加え、濃塩酸で pH を 2.0 に調整した。この混液に豚ペプシン (Sigma) 水溶液を終濃度で 4 μ g/ml になるように加え、37°C の恒温水槽中に120分間保温した。反応終了後、500 μ l の試料を分取し、

500 μ l の SDS-ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 試料緩衝液 (20%グリセリン, 4.6%ドデシル硫酸ナトリウムおよび0.002%プロモフェノールを含む 125 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 6.8) を加えた後, 終濃度が10%になるように 2-メルカプトエタノールを加え, サーマアルミブロックバス (旭テクノグラス (株), ALB-221) で 5 分間加熱した。なお, ペプシンの代わりに蒸留水を用いたものを対照実験とした。

4. SDS-PAGE およびイムノプロット

SDS-PAGE には16%ゲルを用い, それぞれ試料の 5 μ l を Laemmli の方法に従い, 15 mA の定電流で電気泳動を行い, 泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルーで染色した¹¹⁾。イムノプロットでは, まず, 試料を 1/2 濃度の SDS-PAGE 試料緩衝液で10倍に希釈し, そのうちの 5 μ l を上記の方法により電気泳動を行った。ゲルに泳動されたタンパク質は, Towbin らの方法によりニトロセルロース膜に転写し, 転写膜は T-PBS で振とうした後, 3%ゼラチンを含む T-PBS で一晩振とうした¹²⁾。一次抗体として 1%ゼラチンを含む T-PBS で希釈した抗牛 β -LG ウサギ抗血清 (2,000倍希釈) を 1 時間反応させ, T-PBS で洗浄後, T-PBS で 2,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ IgG で 1 時間反応させた。さらに T-PBS で洗浄後, アルカリフォスファターゼ基質溶液 (Sigma) で発色反応させた。転写膜上の各バンドはイメージスキャナ (セイコーエプソン (株) GT-8200U) を用いて画像取得した。

Ⅲ 実験結果および考察

牛乳に含まれる β -LG は, 人乳中には存在しない異種性の高いタンパク質成分で, しかも消化酵素に対して抵抗性を示す強固な高次構造を持つことから, 牛乳タンパク質の中でも主要なアレルゲンとなっている⁸⁾。

市販のヨーグルト (全脂無糖) 4 銘柄 (Y-1, -2, -3, -4), LTLT 1 銘柄および UHT 1 銘柄に含まれる β -LG の抗原性の違いを競争阻害 ELISA により分析し, それぞれの銘柄から得られた阻害曲線を図 1 に示す。阻害曲線から50%阻害に必要な試料希釈率は LTLT, UHT, Y-1, -2, -3, -4 で, それぞれ 1/42.6, 1/98.0, 1/113.6, 1/52.6, 1/21.7, 1/64.1 と算出され, Y-3 で他の製品に比べて抗原性がやや低い結果を得たが, 概ね加熱殺菌の異なる牛乳とヨーグルトに含まれる β -LG の抗原性には大きな違いはなかった。

次にヨーグルトと牛乳 (LTLT および UHT) に含まれるタンパク質成分を SDS-PAGE により分析し, その結果を図 2 に示す。実験に用いたヨーグルトのタンパク質成分は, 牛乳の場合と同様にいずれの製品においてもカゼイン (25?35kD), β -LG (18.5kD) および α -ラクトアル

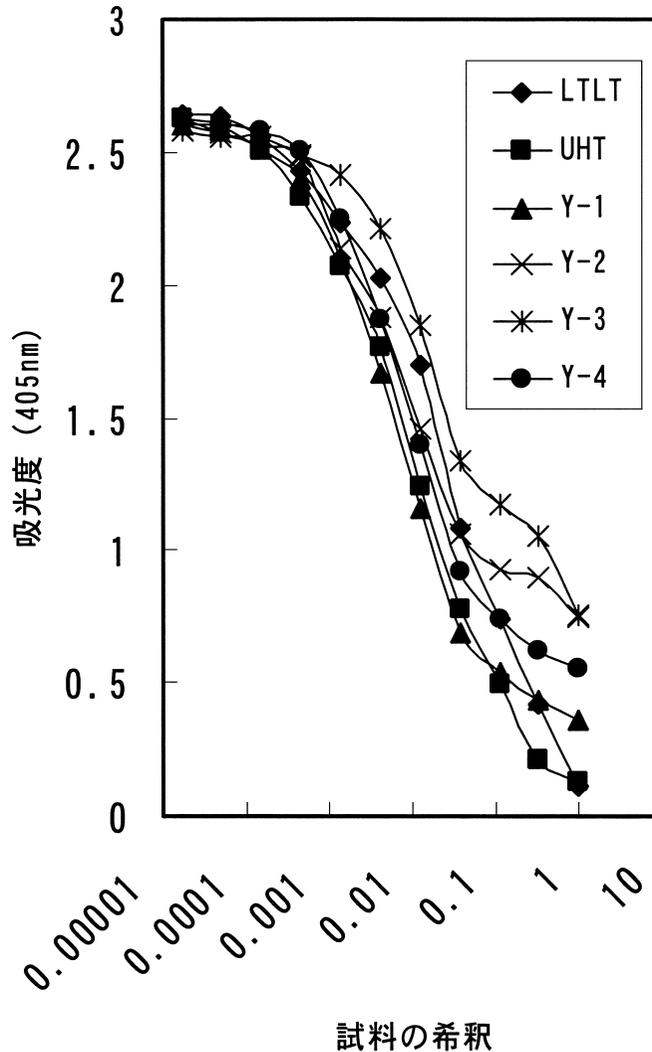


図1 牛乳およびヨーグルトの β -ラクトグロブリンに対する競争阻害 ELISA

ブミン (14.0 kD) が濃いバンドとして検出され、ヨーグルトと牛乳において顕著な違いはなかった。井越らは、市販ヨーグルトに含まれるペプチドについて、HPLCにより検出した24種類のペプチドの全てがカゼイン由来であることを報告している¹³⁾。今回の SDS-PAGE による実験で、ヨーグルトのカゼインのバンドは牛乳のそれとの差がほとんどないことから、ヨーグルトを製造する際の発酵過程によるタンパク質成分の分解は、かなり限定的なものと思われた。

ヨーグルトおよび牛乳に含まれるタンパク質成分のペプシンによる消化性を SDS-PAGE によ

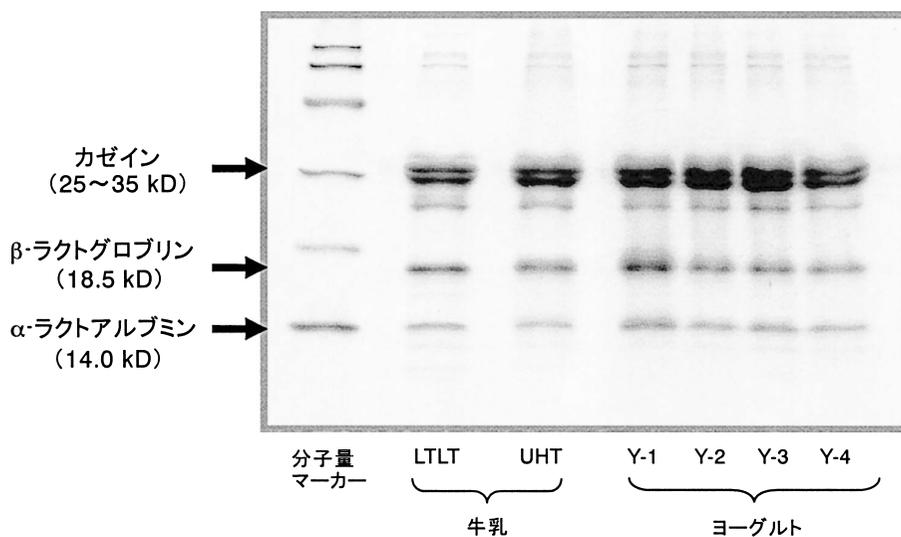


図2 牛乳およびヨーグルトの SDS-PAGE

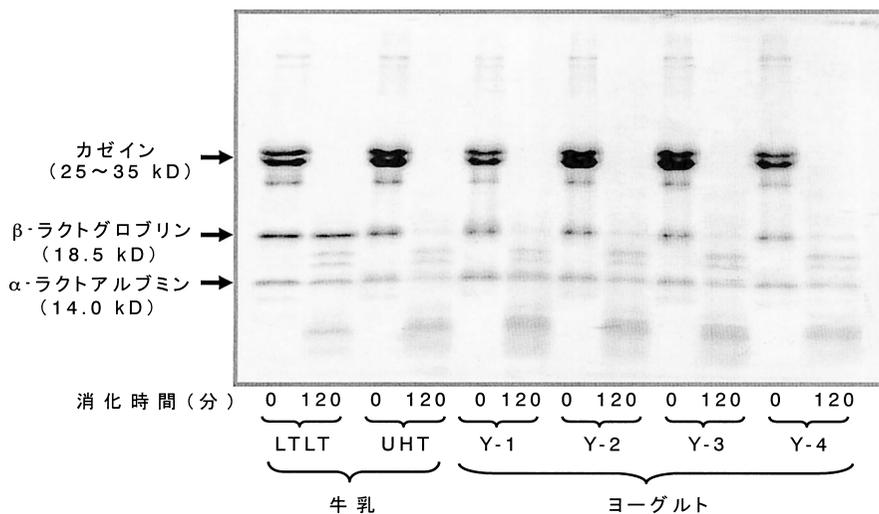


図3 SDS-PAGE による牛乳およびヨーグルトタンパク質のペプシン消化

り解析した結果、実験に用いたすべてのヨーグルトおよび牛乳において、カゼインの速やかな分解と α -ラクトアルブミンの若干の消化抵抗性が認められた (図3)。 β -LG については LTLT でペプシンに対する強い消化抵抗性が認められたが、ヨーグルト (全銘柄) と UHT では β -LG に相当するバンドは消失していた。このことから、ヨーグルトと UHT の β -LG は、ペプシンに対する消化抵抗性が失われていることが認められた。

さらにヨーグルトおよび牛乳に含まれる β -LG のペプシン消化性の変化をイムノプロットにより検討した結果では、SDS-PAGE により解析した結果と同様にペプシン消化による LTLT の β -LG はほとんど未分解であった (図4)。また、UHT の β -LG はペプシン消化により、そのバンドはほとんど消失していた。一方、ヨーグルト (全銘柄) では、ペプシン消化後の β -LG のバンドはほぼ消失していたが、 β -LG のペプシンによる分解産物と思われる抗原性を保持した低分子ペプチドが検出された。

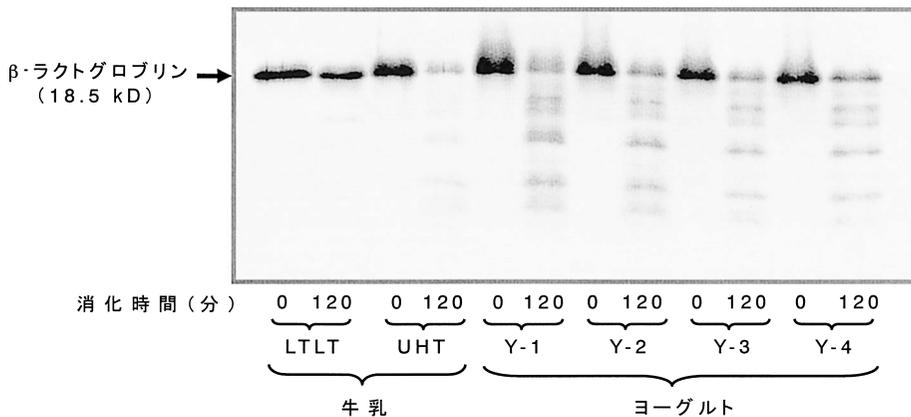


図4 イムノプロットによる牛乳およびヨーグルトタンパク質のペプシン消化

SDS-PAGE とイムノプロットによる実験結果から、ヨーグルトに含まれる β -LG のペプシンによる消化性の変化は、ペプシン消化後に β -LG の抗原性を保持した低分子ペプチドが検出されてはいたが、ほぼ UHT に近い状態にあることが確認された。以前の研究で、UHT は 2~3 秒間という極めて短時間にもかかわらず、130~140°C という超高温による加熱殺菌処理により β -LG の高次構造が崩れ、ペプシン消化に対する抵抗性を失っていることを報告した^{10, 14, 15})。つまり UHT の β -LG はカゼインの消化性と類似した、良好なものになっているため、UHT のアレルギー性も LTLT に比べて緩和されている可能性を示すものであった。ヨーグルトの場合、その製造工程により 80~85°C で 30 分もしくは 90~95°C で 5~10 分の加熱殺菌が行われていることから、UHT の β -LG の場合と同様に β -LG の高次構造が崩れ、ペプシン消化に対する抵抗性が失われたものと推察される。

今回の研究から、加熱殺菌条件の異なる牛乳とヨーグルトに含まれる β -LG の抗原性には大きな違いはないが、ペプシンによる消化性が UHT と同様に高い状態であることを明らかにした。この結果は、牛乳アレルギーの緩解に伴う除去食解除で、ヨーグルトが牛乳と同等またはやや早い段階の食品に位置されていることに概ね妥当性があると判断されるが、除去食解除は

まずヨーグルトと UHT から行い、その後に LTLT の解除を行う方がよいかもしれない。今後は、ヨーグルトに含まれる β -LG のアレルゲン性の程度について、牛乳アレルギー患者の血清を用いた反応性を調べるなどの詳細な検討を行う必要がある。

食物アレルギーは、成長・発達の重要な時期である小児期に発症頻度が高いが、患者の多くは発育と共に徐々に改善され、食物に対するアレルギーも耐性となってくる^{16,17)}。このことは、個々の食物アレルギー患者に対して症状の程度と耐性獲得の状況に応じて、厳しい食事制限が必要な場合と制限が緩くてよい場合があるものと思われる。今回の市販のヨーグルトと牛乳中の β -LG の消化性と抗原性を検討した研究成果がその一助になることを期待する。

文 献

- 1) 杉崎千鶴子, 池田有希子, 田和本寛, 他: 乳児期食物アレルギーの有病率に関する疫学調査 (第 2 報) 8 ヶ月時調査結果について. アレルギー; 52: 913, 2003.
- 2) 杉崎千鶴子, 池田有希子, 田和本寛, 他: 乳児期食物アレルギーの有病率に関する疫学調査 (第 3 報). アレルギー; 53: 953, 2004.
- 3) 今井孝成, 板橋家頭夫: 学校給食における食物アレルギーの実態. 日本小児科学会雑誌; 109: 1117-1122, 2005.
- 4) Munoz-Furlong A, Sampson HA and Sicherer SH: Prevalence of self-reported seafood allergy in the U.S. J Allergy Clin Immunol; 36: 113, S100, 2004.
- 5) Bock SA: Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. Pediatrics; 79: 683-688, 1987.
- 6) 厚生省「食物アレルギー対策検討委員会」(飯倉洋治委員長)平成9年度報告書, 1997.
- 7) 厚生省「食物アレルギー対策検討委員会」(飯倉洋治委員長)平成11年度報告書, 1999.
- 8) 金子哲夫: 牛乳タンパク質の抗原性と低減化. 「牛乳成分の特性と健康」山内邦男, 今村経明, 守田哲朗編, 光生館 (東京): 31-55, 1993.
- 9) 上野川修一: 食品抗原の生化学的特徴. 小児科診療; 56: 979-986, 1993.
- 10) 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 β -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.
- 11) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature; 277: 680-685, 1970.
- 12) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Pro Natl Acad Sci USA; 76: 4350-4354, 1979.
- 13) 井越敬司, 小林弘昌, 宮川 博, 他: 市販ヨーグルト中のペプチドとその構造. 日本畜産学会報; 73: 299-304, 2002.
- 14) 坂井堅太郎, 小川路恵, 高嶋治子, 他: 加熱殺菌方法の異なる市販牛乳タンパク質のペプシンによる消化性. 日本栄養・食糧学会誌; 50: 147-152, 1997.
- 15) Sakai K, Yoshino K, Satter MA, et al: Effects of pH Variation and NaCl on in vitro Digestibility of Cow's Milk Proteins in Commercially Available Infant Formulas. J Nutr Sci Vitaminol; 46: 325-328, 2000.
- 16) 向山徳子: 食物アレルギーの臨床. アレルギー科; 13: 113-121, 1977.
- 17) 伊藤節子: 食物アレルギーの自然歴. 小児科診療; 7: 1049-1055, 2004.