

## 9 8 5 5 牛乳と鶏卵の主要アレルゲンタンパク質の消化性とアレルゲン性に及ぼす食塩の影響

助成研究者：坂井 堅太郎 (徳島大学 医学部 栄養学科)  
 共同研究者：山本 茂 (徳島大学 医学部 栄養学科)  
 水沼 俊美 (佐賀大学 文化教育学部)  
 真鍋 祐之 (神戸女子大学 瀬戸短期大学)

【研究目的】 牛乳タンパク質は、牛乳中に2.7~3.2%含まれ高い栄養価を有しているが、牛乳タンパク質中に約7~12%含まれる $\beta$ -ラクトグロブリンや約2~5%含まれる $\alpha$ -ラクトアルブミンは消化酵素に対して強い抵抗性を持っている。特に $\beta$ -ラクトグロブリンは人乳には含まれない完全な異種タンパク質であるため、牛乳アレルギー患者の主要なアレルゲンになっている。本研究では、一般育児用ミルクのタンパク質成分のペプシンによる消化性をpH1.5~4.0の範囲で検討し、また、ペプシンによるミルクタンパク質成分の消化性に及ぼす塩濃度の影響について検討したので報告する。

【研究方法】 一般育児用ミルクは市販の3銘柄を用いた。ミルクに含まれるタンパク質成分をペプシンにより、pH1.5、2.0、2.5、3.0、3.5または4.0で消化し、消化パターンをSDS-PAGEとイムノプロット法により分析した。また、pH2.0におけるミルクタンパク質成分のペプシン消化に及ぼす塩濃度の影響を0.2M、0.4Mまたは0.6MのNaClの存在下で検討した。

【研究結果】 カゼインは、pH1.5~3.5の範囲でよく消化されたが、pH4.0でわずかに低下した。 $\beta$ -ラクトグロブリン( $\beta$ -LG)はpH2.0で時間とともに緩やかに消化されたが、pHが上昇するに従って消化性が低下し、pH3.5以上ではほとんど消化されなかった。 $\alpha$ -ラクトアルブミン( $\alpha$ -LA)は、pH1.5~2.5の範囲で消化性に大きな違いなく、消化時間とともに緩やかに消化されたが、pH3.0以上ではほとんど消化されなかった。カゼインのペプシン消化には、塩濃度の影響はほとんどなかったが、 $\beta$ -LGと $\alpha$ -LAのペプシン消化は、塩濃度が上昇するに従って、未消化のタンパク質が残存するようになった。

【考察】 pH3.0~4.0での $\beta$ -LGと $\alpha$ -LAのペプシン消化における減弱は、新生児のペプシンの分泌量が少ないことに加えて、胃内のpHがペプシンの至適pHから離れた高い位置にあることから、乳幼児の牛乳タンパク質の主要なアレルゲンとなっている原因の一つではないかと考えられた。一般的に離乳食として使用される市販ベビーフード中の食塩量はかなり低値におさえられているので、牛乳を含むベビーフードでは、牛乳アレルゲンの胃内での消化を妨げないという観点からも、低い食塩量は妥当性があるといえる。また、今回の研究結果から、家庭での乳幼児の離乳食に使用する加工食品中の食塩量についても注意を払う必要があると思われた。



## 9855 牛乳と鶏卵の主要アレルゲンタンパク質の消化性とアレルゲン性に及ぼす食塩の影響

助成研究者：坂井 堅太郎 (徳島大学 医学部 栄養学科)  
共同研究者：山本 茂 (徳島大学 医学部 栄養学科)  
水沼 俊美 (佐賀大学 文化教育学部)  
真鍋 祐之 (神戸女子大学 瀬戸短期大学)

### ①研究目的

牛乳タンパク質は、牛乳中に2.7～3.2%含まれ高い栄養価を有している。しかし、牛乳タンパク質中に約7～12%含まれるβ-ラクトグロブリンや約2～5%含まれるα-ラクトアルブミンは消化酵素に対して強い抵抗性を持っている。特にβ-ラクトグロブリンは人乳には含まれない完全な異種タンパク質であるため、牛乳アレルギー患者の主要なアレルゲンになっている<sup>1)</sup>。このような牛乳タンパク質の消化酵素に対する消化性については、これまで本研究代表者らにより研究報告がなされている<sup>2,3)</sup>。ところで、新生児および乳幼児は、通常、一般育児用ミルクを使用している。特に新生児の場合、胃内のpHが3.0～4.0と高く、成長するに従ってpHが低下していくが、そのpHの変化による牛乳タンパク質成分の消化性についての検討はなされていない。また、乳幼児は一般に育児用ミルクだけでなく、他の食品も摂取するようになり、その際、食品中の食塩量による影響についても検討が必要と思われる。

そこで本研究では、一般育児用ミルクのタンパク質成分のペプシンによる消化性をpH 1.5～4.0の範囲で検討し、また、ペプシンによるミルクタンパク質成分の消化性に及ぼす塩濃度の影響について検討したので報告する。

### ②研究方法

#### 1. 実験材料

実験には一般に市販されている一般育児用ミルクのうちの3社 (A、BおよびC社) のものを使用した。それぞれのミルク100g当たりのタンパク質量は、A社が15.4g、B社が13.0g、C社が17.0gである。また、それぞれのミルクの特長として、A社においてDHA、ラクトフェリン、オリゴ糖配合、α-リノレン酸、乳清タンパク質、β-カロチン増強、B社においてDHA、母乳ヌクレオチド、シアル酸、オリゴ糖、β-カロチン、γ-リノレン酸、タウリン配合、α-ラクトアルブミン増強、C社においてDHA、鉄分、カルシウム、β-カロチン、イソマルトオリゴ糖配合、乳清タンパク質増強があげられる。

#### 2. 実験方法

### (1) ペプシンによるミルクタンパク質の消化試験

2.5 mlの一般育児用ミルクに7.5 mlの蒸留水を加え、濃塩酸でpHを正確に1.5、2.0、2.5、3.0、3.5または4.0に調整した。この混液に0.2 mg/mlの豚ペプシン（Sigma Chemical Company）水溶液を終濃度で4.0  $\mu$ g/mlになるように加え、37度の恒温水槽中に保温した。消化時間は30、60および120分間とし、各時間ごとに0.15 mlの試料を分取し、同量のSDS化用試料緩衝液（20%グリセリン、4.6%ドデシル硫酸ナトリウムおよび0.002%ブロモフェノールブルーを含む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、沸騰水浴中で5分間加熱した。なお、試料にSDS化用試料緩衝液を加えた後に相当量のペプシンを加えたものを消化時間0分とし、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。

### (2) SDS-PAGEおよびウエスタンブロット

SDS-PAGEはLaemmliの方法<sup>4)</sup>に従い、16%ゲルをミニゲル用平板プレート（1 mm厚10×10 cm）に作成し、試料10  $\mu$ lを20 mAの定電流で泳動後、0.25%クマシーブリリアントブルーR-250で染色した。電気泳動パターンはイメージスキャナ（GT-9500ART、エプソン）を用いて600 dpiの解像度で画像取得した。ウエスタンブロットの試料は、10%の2-メルカプトエタノールを含む2倍希釈したSDS化用試料緩衝液で20倍に希釈し、上記方法で希釈試料10  $\mu$ lを電気泳動後、Towbinらの方法<sup>5)</sup>によりニトロセルロース膜に転写した。転写膜は0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝液（T-PBS）で振とう洗浄し、3%ゼラチンを含むT-PBSで一晩振とうした。一次抗体として1%ゼラチンを含むT-PBSで希釈した抗牛 $\beta$ -ラクトグロブリンウサギ抗血清（2,000倍希釈）（Bethyl Lab. Inc.）または抗牛 $\alpha$ -ラクトアルブミン抗血清（1,000倍希釈）（Bethyl Lab. Inc.）を1時間反応させ、T-PBSで洗浄後、T-PBSで $\beta$ -ラクトグロブリンは2,000倍希釈、 $\alpha$ -ラクトアルブミンは1,000倍に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（Sigma）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上記イメージスキャナを用いて600 dpiの解像度で画像取得した。

## ③研究結果

### 1. 3社のミルクタンパク質成分のSDS-PAGE

3社の一般育児用ミルクをSDS-PAGEによりミルク中のタンパク質成分を比較検討した（Fig. 1）。実験に用いたミルク中のタンパク質成分はカゼイン（25~35 kD）、 $\beta$ -ラクトグロブリン（18.5 kD）および $\alpha$ -ラクトアルブミン（14.0 kD）が検出されたが、B社の場合、相対的に他社と比べてカゼインの割合が少ないようであった。

### 2. 異なったpHでのミルクタンパク質のペプシンによる消化性

消化試験は3社について行ったが、そのうちの1社（B社）についてのデータをFig. 2に示

す。カゼインはpH1.5~3.5の範囲で速やかに分解され、pH4.0では消化性がやや低下したものの、実験したpHの範囲でおおむねよく消化された。β-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンはともにpH1.5~2.5の範囲で時間の経過とともに徐々に分解されたが、pH3.0~4.0の範囲では消化後120分後においても未分解のバンドが残り、ペプシン消化に対する顕著な減弱が認められた。なお、ペプシンの代わりに蒸留水を用いた対照実験では、いずれのpHにおいても37度、120分間の保温中に個々のタンパク質成分の変化は認められなかった。

Fig. 2のSDS-PAGEはミルクタンパク質成分のペプシン消化の全体像を反映しているが、ミルクタンパク質の分解に伴う低分子化した多数のバンドの重複があるため、個々のタンパク質、特にカゼインより分子量の小さいβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンの正確な分解パターンは反映されていない。そこで、ミルクタンパク質成分のペプシン消化を牛β-ラクトグロブリンおよび牛α-ラクトアルブミンに対する特異抗体を用いたウエスタンブロットにより検討した (Fig. 3)。また、SDS-PAGE (Fig. 2) のカゼインの分解パターンとウエスタンブロット (Fig. 3) のβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンの分解パターンから得られた未分解のバンドを定量化することによって、個々のミルクタンパク質のペプシンによる消化性と消化時間に伴うバンドの減少率をFig. 4に示す。β-ラクトグロブリンはSDS-PAGEでみられたのと同様にpH1.5~2.5の範囲では消化時間とともに徐々に消化されていたが、pH3.0以上ではほとんど消化されず消化120分後においても未分解のものがほとんどであった。α-ラクトアルブミンにおいてもpH1.5~2.5の範囲では消化時間とともに徐々に消化されていたがpH3.0以上では消化性は顕著に低下していた。

### 3. ミルクタンパク質成分のペプシン消化に及ぼす塩濃度の影響

pH2.0におけるミルクタンパク質成分の消化試験に0.2M、0.4Mまたは0.6MのNaClを反応溶液に加え、NaClを加えないものを対照実験として行った (Fig. 5)。また、SDS-PAGEとウエスタンブロットで得られた結果から未消化のバンドを定量化し、個々のミルクタンパク質のペプシンによる消化性と消化時間に伴う減少率をFig. 6に示す。SDS-PAGEの結果から、カゼインは塩濃度が0.6Mに上昇してもその消化性にほとんど影響はなく、よく消化された。しかし、β-ラクトグロブリンおよびα-ラクトアルブミンは反応溶液中のNaCl濃度の上昇に伴い消化性が顕著に低下した。また、ウエスタンブロットの結果からも反応液中にNaCl濃度が上昇するに従って、β-ラクトグロブリンおよびα-ラクトアルブミンの消化性が低下し、0.6MのNaClの存在下ではそれぞれ70%以上が未分解であった。

## ④考察

食物アレルギーは乳幼児に多いとされており、その理由として乳幼児の食物抗原に対す

る生体防御機構の未熟さがあげられる。摂取された食物は消化の過程を経て腸管粘膜より吸収されるが、腸管粘膜には抗原吸収に対する防御機構が存在する<sup>6)</sup>。この腸管における防御機構には消化酵素によるアレルギーの分解、IgAによるアレルギー進入の阻害、経口免疫寛容などがあり、これらの防御機構が十分に機能しない場合、食物アレルギーが発症しやすいといわれている<sup>7)</sup>。これまで本研究代表者らは、市販牛乳中に含まれるタンパク質成分、特に牛乳タンパク質の中でも最もアレルギー活性が高いとされているβ-ラクトグロブリンの消化酵素に対する消化性について検討を行ってきた<sup>2,3)</sup>。

本研究では食物アレルギーが乳幼児に多いことと新生児の胃内のpHの変化に着目して、pHの違いによるミルクタンパク質成分の消化性について検討した。その結果、pH 3.0~4.0の範囲ではβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンの消化性はカゼインに比較して低かった。このことは新生児の場合、胃酸の分泌量が少ないことや胃内のpHがペプシンの至適pHから離れた3.0~4.0付近にあるため、胃内での消化機構がうまく働かず、これが乳幼児における食物アレルギーの原因の一つとなっているのではないかと思われる。また、一般育児用ミルクのタンパク質成分のペプシン消化に及ぼす塩濃度の影響を検討したところ、カゼインのペプシン消化には塩濃度の影響はほとんどなかったが、β-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンの消化は塩濃度が上昇するに従って消化性が顕著に低下した。このことから牛乳を含む加工食品のアレルギー性は、アレルギータンパク質の含量に加え、食品中の食塩量にも影響される可能性が示唆された。

食物に対するアレルギー発症の原因には諸説があるが、離乳食を与え始める時期が早くなってきていることもアレルギー疾患の増加の原因ともいわれている<sup>8)</sup>。離乳の時期が早まると、乳幼児がミルク以外の食品を摂取する時期が早まり、それに伴い食品に含まれる食塩も摂取する機会も早まる。近年では外食産業のめざましい発展、母親の就労率の増加、それに伴う生活の多様化、女性の食意識の変化などが母親の離乳食調理に様々な影響を及ぼしているだろう。一般的に離乳食として使用される市販ベビーフード中の食塩量はかなり低値におさえられているので、牛乳を含むベビーフードでは、牛乳アレルギーの胃内での消化を妨げないという観点からも、低い食塩量は妥当性があるといえる。また、今回の研究結果から、家庭での乳幼児の離乳食に使用する加工食品中の食塩量についても注意を払う必要があると思われる。

#### ⑤今後の課題

今回の研究から、牛乳中の主要なアレルギーであるβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンは、反応液中の塩濃度によりペプシンによる消化性が大きく減弱されることから、今後は、牛乳タンパク質成分の個々の精製標品を用いて、酵素反応速度論に基づき、各塩濃度および各pHでのK<sub>m</sub>（最大酵素反応速度を与える基質濃度の半分の濃度）を測定する必要があるだろう。このことにより、より酵素学的な立

場からみた牛乳アレルギータンパク質の特徴をとらえることが可能となり、また、その消化性を最適に保つような食パターンを示すことができると思われる。

⑥文献

- 1) 香山雅子、戸塚 譲、上野川修一：食品アレルギー対策ハンドブック（上野川修一、近藤直実編）247-251, サイエンスフォーラム（東京）, 1996.
- 2) 坂井堅太郎, 小川路恵, 高嶋治子, 水沼俊美, 真鍋祐之：日本栄養・食糧学会誌 50, 147-152, 1997.
- 3) 坂井堅太郎、中尾友宣、真鍋祐之：日本小児アレルギー学会誌 12, 72-79, 1998.
- 4) Laemmli, U.K.: Nature 277, 680-685, 1970.
- 5) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Pro. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354, 1979.
- 6) 大塚武、有田昌彦：アレルギーの臨床 179, 16-20, 1994.
- 7) 上野川修一：小児科診療 56, 979-986, 1993.
- 8) 水野清子：臨床栄養 91, 619-625, 1997.

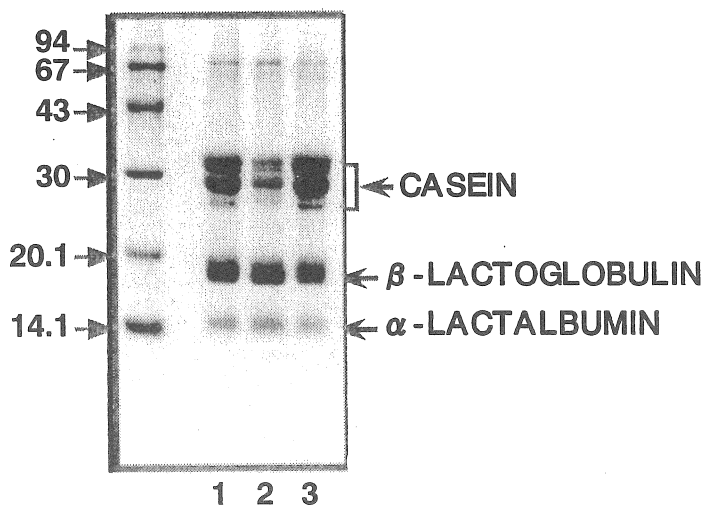


Fig. 1 SDS-PAGE of Bottle Milk Proteins in Three Different Companies (Lane 1, Company A; Lane 2, Company B; Lane 3, Company C).

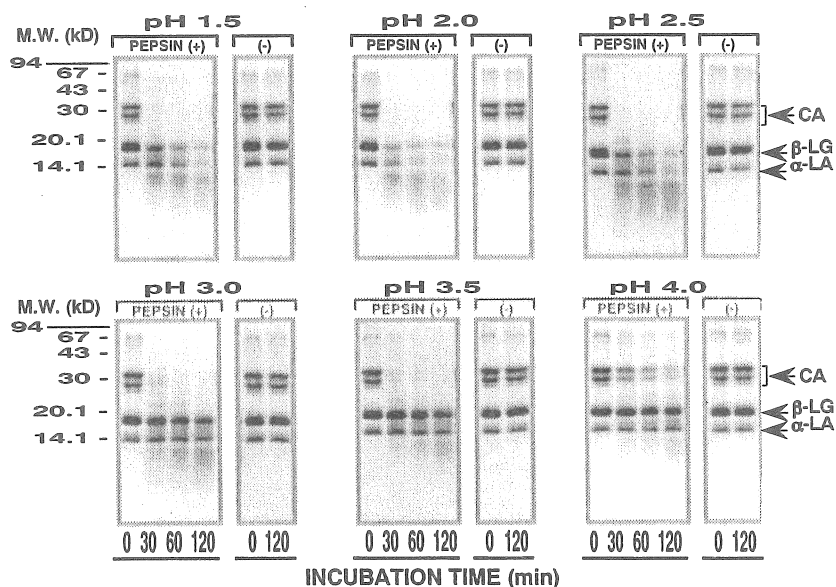


Fig. 2 SDS-PAGE of Bottle Milk Proteins Digested by Porcine Pepsin at Different pH (Company B). CA; Casein,  $\beta$ -LG;  $\beta$ -Lactoglobulin;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -Lactalbumin.



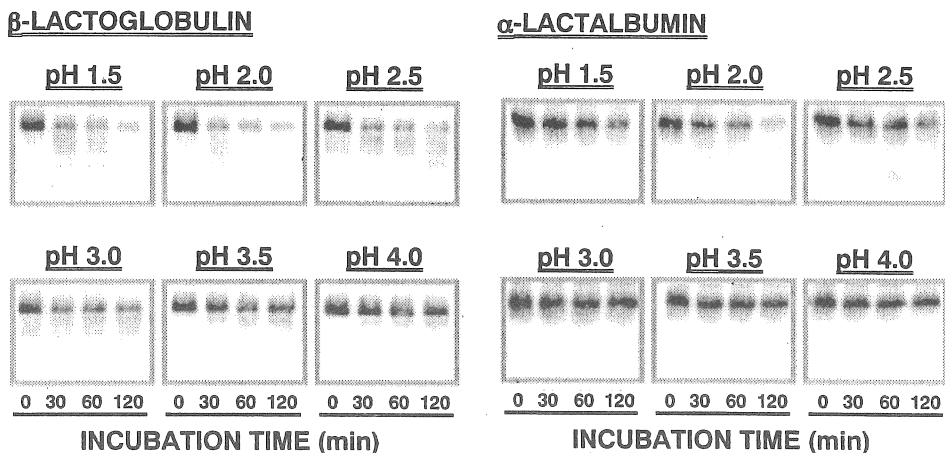


Fig. 3 Immuno Blots of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin in Bottle Milk Proteins Digested by Porcine Pepsin at Different pH.

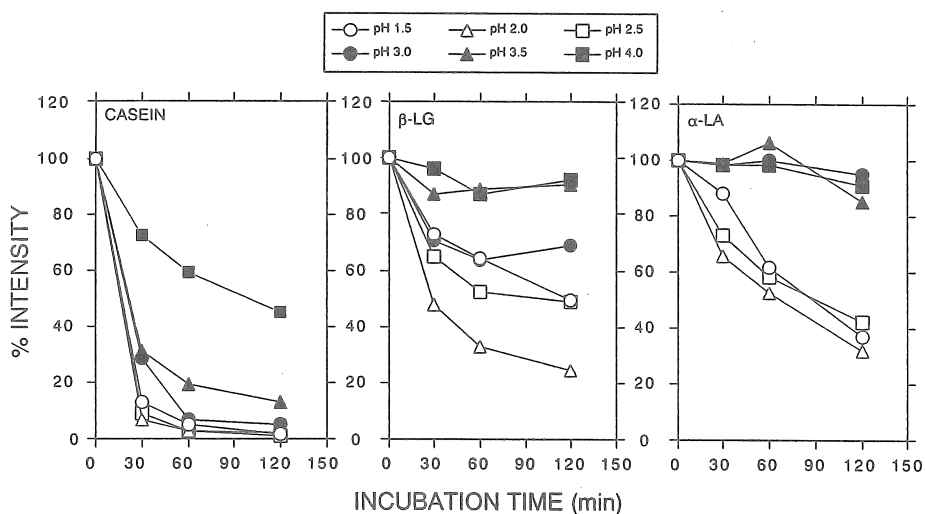
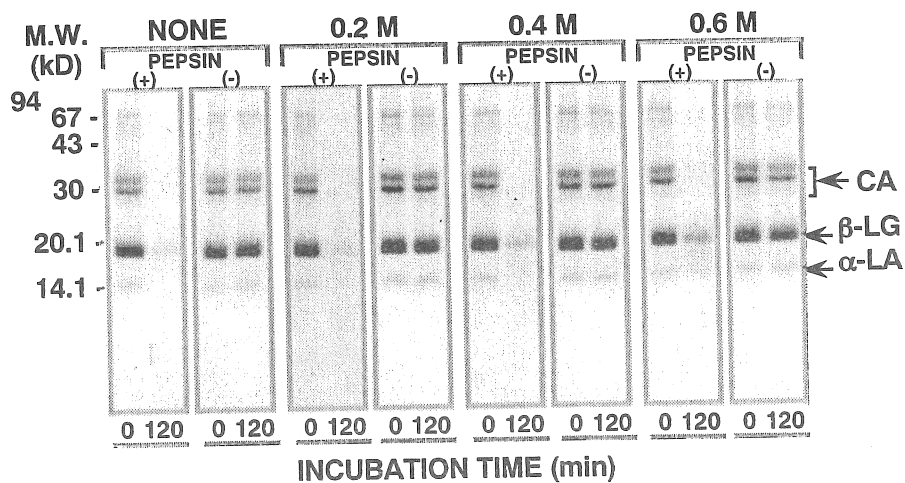


Fig. 4 Densitometric Scannings of SDS-PAGE or Immunoblots of Bottle Milk Proteins Digested by Porcine Pepsin at Different pH.

## SDS-PAGE



## IMMUNO BLOTTS

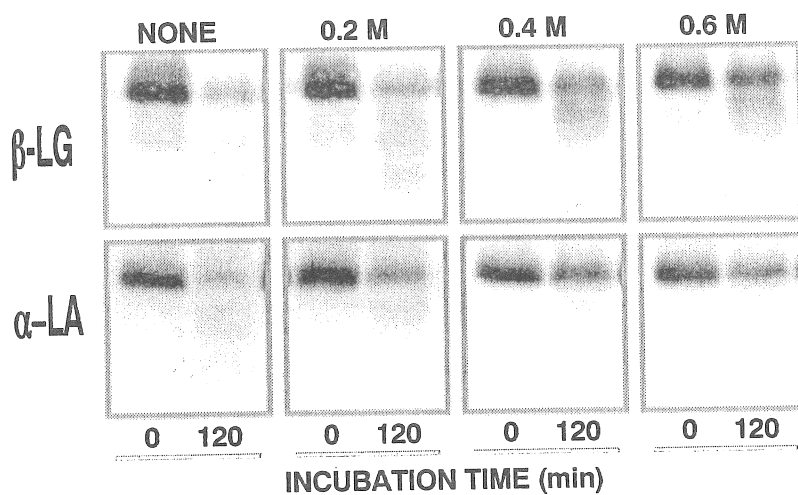


Fig. 5 Effect of NaCl Concentrations on Peptic Digestibility of Bottle Milk Proteins by at pH 2.0. CA; Casein,  $\beta$ -LG;  $\beta$ -Lactoglobulin;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -Lactalbumin.

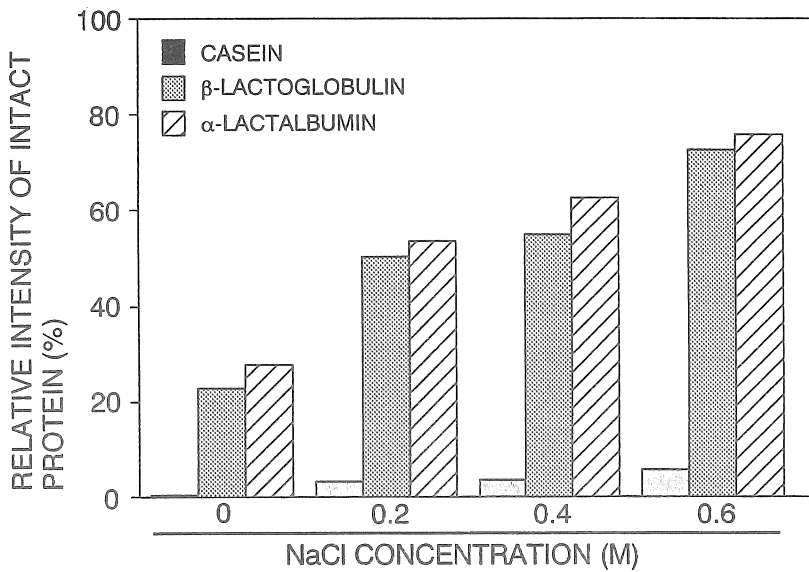


Fig. 6 Densitometric Scannings of SDS-PAGE or Immuno Blots of Bottle Milk Proteins Digested by Pepsin at pH 2.0 in the Presence of Various Conc. of NaCl

## Effect of NaCl Present on Digestibility and Allergenicity of Major Allergens in Cow's Milk and Hen's Egg

Kentaro Sakai<sup>1)</sup>, Shigeru Yamamoto<sup>1)</sup>, Toshimi Mizunuma<sup>2)</sup>,  
Sachinobu Manabe<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima,  
<sup>2)</sup>Faculty of Culture and Education, Saga University, <sup>3)</sup>Department of Domestic  
Science, Kobe Women's University, Seto Junior College

### Summary

Allergenicity and antigenicity of food proteins are generally dependent on their heat-stability and resistance to digestive enzymes. Using the methods of SDS-PAGE and immunoblots, we assessed peptic-digestibility of major milk proteins (casein,  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) and  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA)) in commercially available bottle milks in acidic pH range (pH 1.5 to 4.0), and we also investigated the effect of NaCl present on peptic digestibility of milk proteins at pH 2.0. The profile of peptic digestion of casein was similar at pH range of 1.5 to 3.5 where the intact proteins of casein disappeared rapidly, whereas low digestibility of casein was found at pH 4.0. Peptic digestibility of  $\beta$ -LG and  $\alpha$ -LA were gradually digested at pH range of 1.5 to 2.5 and were almost resistant to the enzyme at over pH 3.0. To combine the facts that newborn infants have low amount of pepsin and out of its optimum pH in their stomach, the low digestibility of  $\beta$ -LG and  $\alpha$ -LA at over pH 2.5 suggested that may be one of reason for causing these proteins to food allergens. In the presence of NaCl at pH 2.0, casein showed an almost similar profile to peptic digestibility in contrast to  $\beta$ -LG and  $\alpha$ -LA which were decreased their peptic digestibility by dose of NaCl concentration. This result suggested that consideration of NaCl present in cooking for infant foods may be necessary for digestibility of allergenic cow's milk proteins and prevent to milk allergy.