

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

徳島大学医学部栄養学科実践栄養学講座, 神戸女子大学瀬戸短期大学生生活科*)
坂 井 堅太郎 中 尾 友 宣 真 鍋 祐 之*)

key words : 食物アレルギー, β -ラクトグロブリン, 市販加熱殺菌牛乳, ペプシン, パンクレアチン

要 旨

一般に食品タンパク質のアレルゲン性は、熱安定性と消化酵素に対する抵抗性に深く関係している。加熱殺菌方法の異なる市販牛乳（低温殺菌牛乳（LTLT）、高温短時間殺菌牛乳（HTST）、および超高温殺菌牛乳（UTH））に含まれる β -ラクトグロブリン（ β -LG）のペプシンとパンクレアチンによる消化性と消化後の抗原性の変化を競争阻害ELISA試験とイムノプロット法で検討した。LTLTとHTST中の β -LGは、ペプシンおよびパンクレアチンに対して強い抵抗性を示したが、UTH中の β -LGは、これらの消化酵素に対して抵抗性を示さなかった。牛乳を沸騰水浴中に15分間加温した場合、LTLT中の β -LGは、これらの消化酵素に対する抵抗性を著しく消失した。これらの結果は、 β -LGの消化性から市販加熱殺菌牛乳を選択する場合、LTLTやHTSTよりもUTHが優れている可能性を示唆するとともに、加熱調理によって牛乳中の β -LGの胃腸管での消化性が改善されることが推察された。

は じ め に

食物アレルギーは、成人よりも消化機能の未熟な小児に多く発症し、患者数の増加や食物アレルゲンの特定の困難さに加えて、治療に伴う栄養学的問題を抱えている¹⁾。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、小児期は成長・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乏しく、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。

牛乳は、卵や大豆と並び我が国では食物アレルギーの主要な原因食品となっている^{2) 3)}。一般に、入手・利用可能な牛乳は乳等省令が規定する方法により加熱殺菌された市販のものである。具体的には、低温殺菌牛乳（LTLT）（62～65℃、30分間）、高温短時間殺菌牛乳（HTST）（72℃以上、15秒間以上）および超高温殺菌牛乳（UHT）（120～150℃、1～5秒間）の3種類が普及している。

ところで、牛乳アレルギーで問題になる主要なアレルゲンタンパク質は、 β -ラクトグロブリン（ β -LG）と α s1-カゼインである。中でも β -LGは、熱安定性と消化酵素に対する抵抗性から、最もアレルゲン活性が高いとされている³⁾。 β -LGの消化酵素による消化性については、これまで主に β -LGの精製タンパク質標品または牛乳から分離された乳清タンパク質の成分として検討されてきた^{4) 5)}。しかし、牛乳アレルギー患者が実際に除去の対象としている市販加熱殺菌牛乳または牛乳を用いた加熱調理品に含まれる β -LGの消化性に関する検討はほとんどない。わ

Abbreviation : EDTA ; ethylene diamine tetra acetate, ELISA ; enzyme - linked immunosorbent assay, HTST ; high temperature short time - treated milk, β -LG ; β -lactoglobulin, LTLT ; low temperature long time - treated milk, T - PBS ; tween20 - phosphate buffered saline, SDS-PAGE ; sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, UHT ; ultra - high temperature - treated milk

ずかに、市販加熱殺菌牛乳中の β -LGのペプシン消化を検討した我々の報告がある程度である⁶⁾。

そこで本研究では、我々がこれまで行ってきた研究をさらに進め、胃腸管が連続した消化器官であることを考慮して、加熱殺菌方法の異なる市販牛乳中の β -LGをペプシンとパンクレアチンにより連続消化させ、その消化性と消化後の抗原性の変化を検討した。また、市販牛乳に対する加熱調理への影響をみるため、沸騰水浴中で加温した牛乳中の β -LGの消化性と消化後の抗原性の変化についても検討したので報告する。

実験方法

1. 実験材料

実験には一般に市販されている牛乳のうち、LTLT 2 銘柄 (LTLT-1 (65℃, 30分間) および LTLT-2 (65℃, 30分間)), HTST 2 銘柄 (HTST-1 (72℃, 15秒間) および HTST-2 (85℃, 20秒間)) および UHT 4 銘柄 (UHT-1 (140℃, 3秒間), UHT-2 (140℃, 2秒間), UHT-3 (130℃, 2秒間) および UHT-4 (130℃, 2秒間)), 計 8 銘柄を用いた。なお、これらはすべて成分無調整の製品で、購入後、4℃に保存し、製造日より 5 日以内に実験に供した。

2. ペプシンおよびパンクレアチンによる牛乳タンパク質の消化試験

1 ml の牛乳に 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 を正確に 2.0 に調整した。この混液に豚ペプシン (Sigma Chemical Company) 水溶液を終濃度で 4 μ g/ml になるように加え、37℃の恒温水槽中に 120 分間保温した。反応終了後、1 M Tris を加え、pH を正確に 8.5 に調整した後、豚パンクレアチン (Sigma) を終濃度で 150 μ g/ml になるように加え、37℃の恒温水槽中に 120 分間保温した。パンクレアチンによる消化反応は、試料の 1/4 量のウマ正常血清 (Sigma) を加えて停止した。なお、試料の pH を 8.5 に調整した後にペプシンを加え、更にウマ正常血清を加えた後にパンクレアチンを加えたものを消化時間 0 分の試料とした。また、ペプシンまたはパンクレアチンの代わりに蒸留水を用いたものを対照試料とした。

市販加熱殺菌牛乳の加温による影響は、1 ml の牛乳を沸騰水浴中に 15 分間放置し、室温に 30 分間放置後、上記方法により消化酵素で処理した。

3. イムノブロット法

消化酵素で処理した試料のうち 100 μ l を分取し、

400 μ l の蒸留水を加え、さらに 500 μ l の 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、沸騰水浴中で 5 分間加熱した。そのうち 10 μ l を Laemmli の方法⁷⁾に従い、16% 平板アクリルアミドゲル (1 mm 厚, 10 $\times$ 10 cm) に 15 mA の定電流で電気泳動を行い、ゲルに泳動されたタンパク質は、Towbin らの方法⁸⁾によりニトロセルロース膜に転写した。転写膜は 0.05% Tween20 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 β -LG ウサギ抗血清 (2,000 倍希釈) (Bethyl Lab. Inc.) 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 やギ 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イメージスキャナ (GT-9000ART, セイコーエプソン株式会社) を用いて 600 dpi の解像度で画像取得した。

4. 競争阻害 ELISA 試験

ELISA 用 96 穴マイクロプレート (Greiner Labortechnik) の各穴に、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解した β -LG (5 μ g/ml) (Sigma) を 100 μ l 加え、室温で 30 分間緩やかに浸透した後、4℃で一晩放置した。T-PBS で各穴を 5 回洗浄した後、ブロック操作として、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ファターゼ結合抗ウサギ IgG やギ IgG を 100 μ l 各穴に加え、90 分間放置した。T-PBS で洗浄後、100 μ l のアルカリホスファターゼ基質溶液 (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で 415 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。

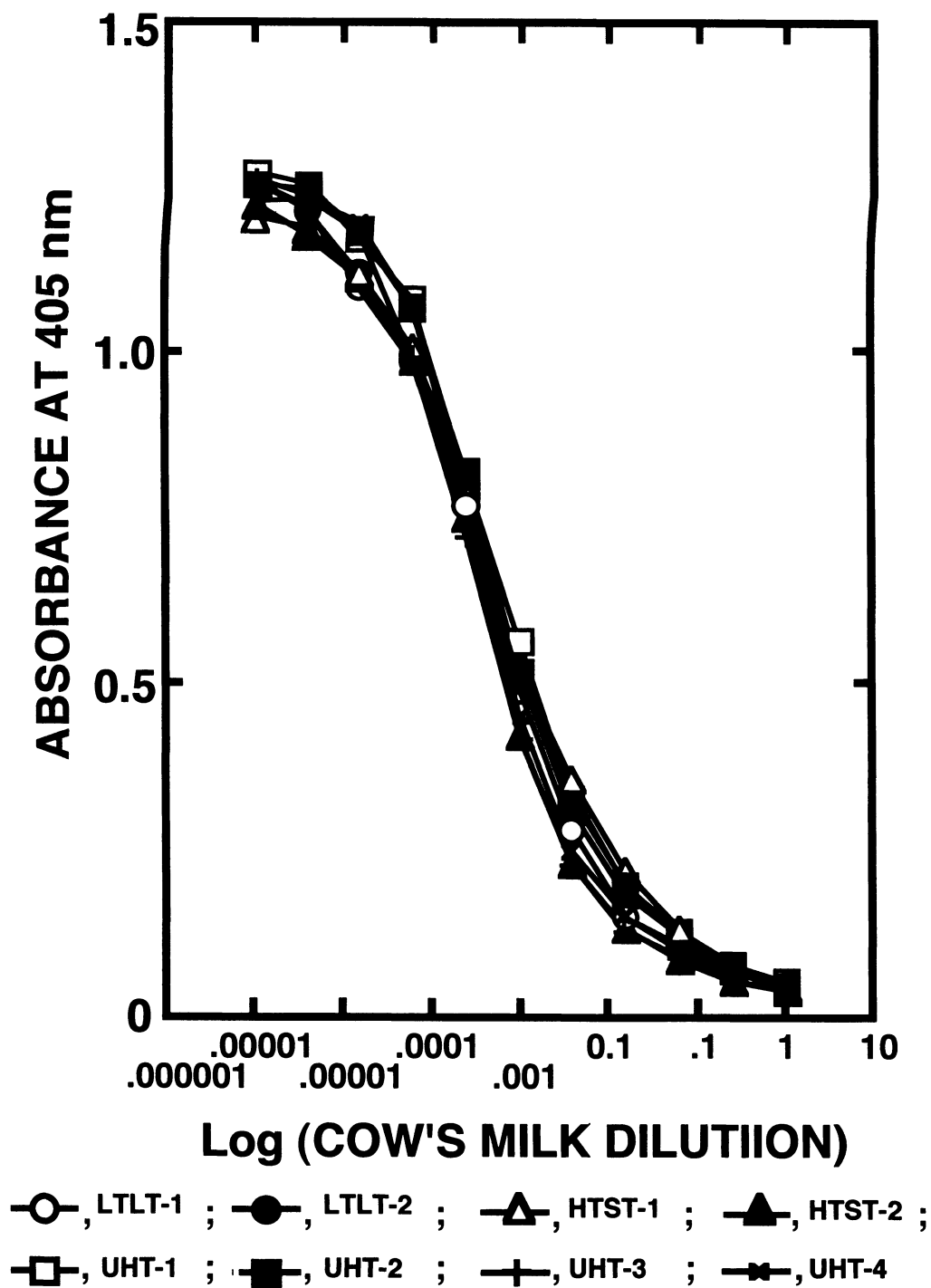


Fig. 1 INHIBITION ELISA FOR β -LG IN HEAT PASTEURIZED COMMERCIAL COW'S MILKS AGAINST RABBIT ANTI- β -LG ANTISERUM

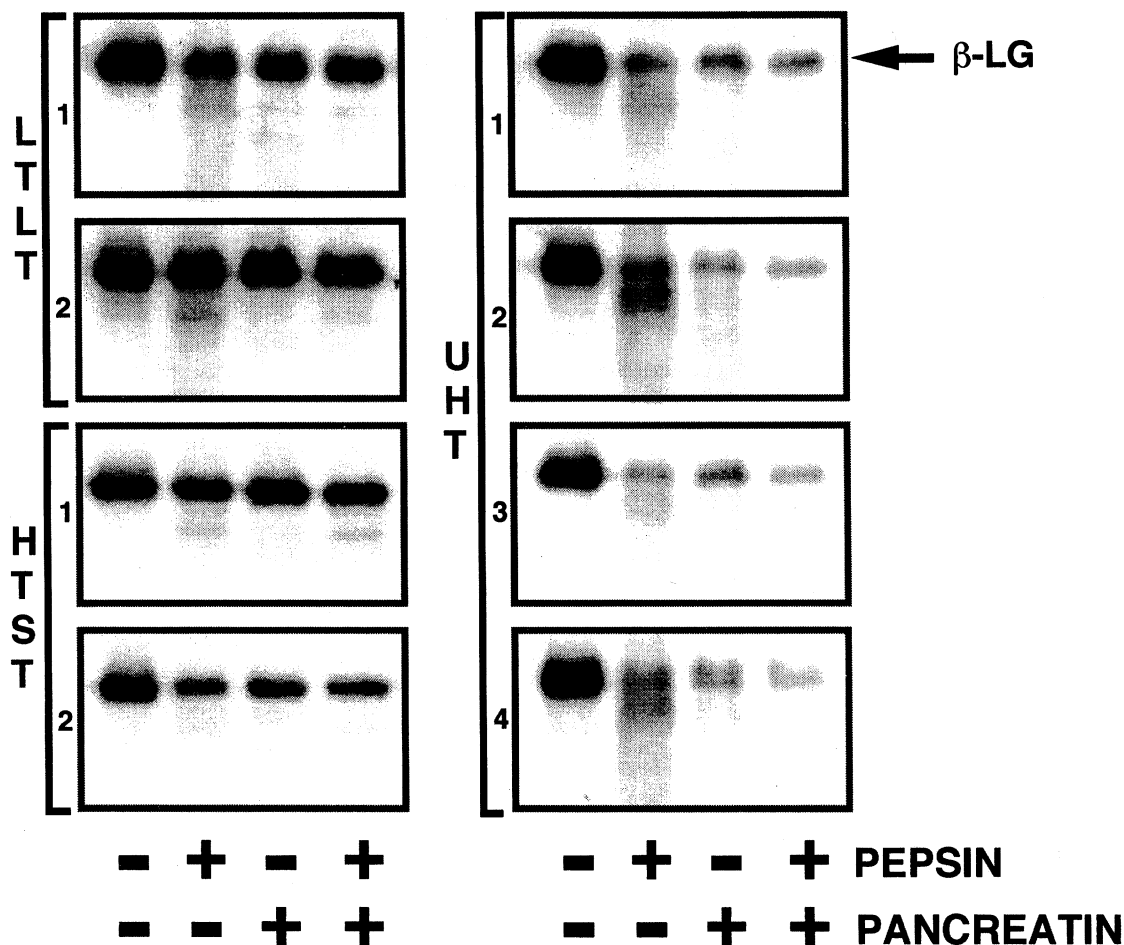


FIG. 2 WESTERN BLOTS OF β -LG IN DIFFERENT HEAT PASTEURIZED COW'S MILKS DIGESTED BY PEPSIN FOLLOWED BY PANCREATIN

実験結果

加熱殺菌方法の異なる市販のLTLT 2 銘柄 (LTLT-1 および -2), HTST 2 銘柄 (HTST-1 および -2) およびUHT 4 銘柄 (UHT-1, -2, -3 および -4) について, 抗牛 β -LGウサギ抗血清を用いた競争阻害ELISA試験により, 牛乳中の β -LGの抗原性を比較検討した (FIG. 1). 実験に用いた個々の牛乳の阻害曲線から求めた50%阻害に必要な試料希釈率は, $1/2,200 \sim 1/3,300$ の範囲内で, β -LGの抗原性は牛乳の加熱殺菌処理および製品間に顕著な違いは認められなかった.

次に, 上記牛乳に含まれるタンパク質成分をペプシ

ンとパンクレアチンで消化し, β -LGの消化性の変化を牛 β -LGに対する特異抗体を用いたイムノプロット法で検討した (FIG. 2). LTLTおよびHTST中の β -LGは, 製品間の違いに拘わらず, ペプシンあるいはパンクレアチンの単独消化, およびこれらの酵素による連続消化においても未分解の濃いバンド (18.5 kD) が検出され, 胃腸管の消化酵素に対して強い抵抗性を示した. 一方, UHT中の β -LGは, 使用した4 銘柄共にこれらの消化酵素に対して抵抗性が認められず, 消化酵素処理後の未分解の β -LGは薄いバンドとして検出された. また, UHTのペプシン単独消化において, 消化により低分子化したと思われる15kD前後の抗原性を保持したブロードなペプチドバ

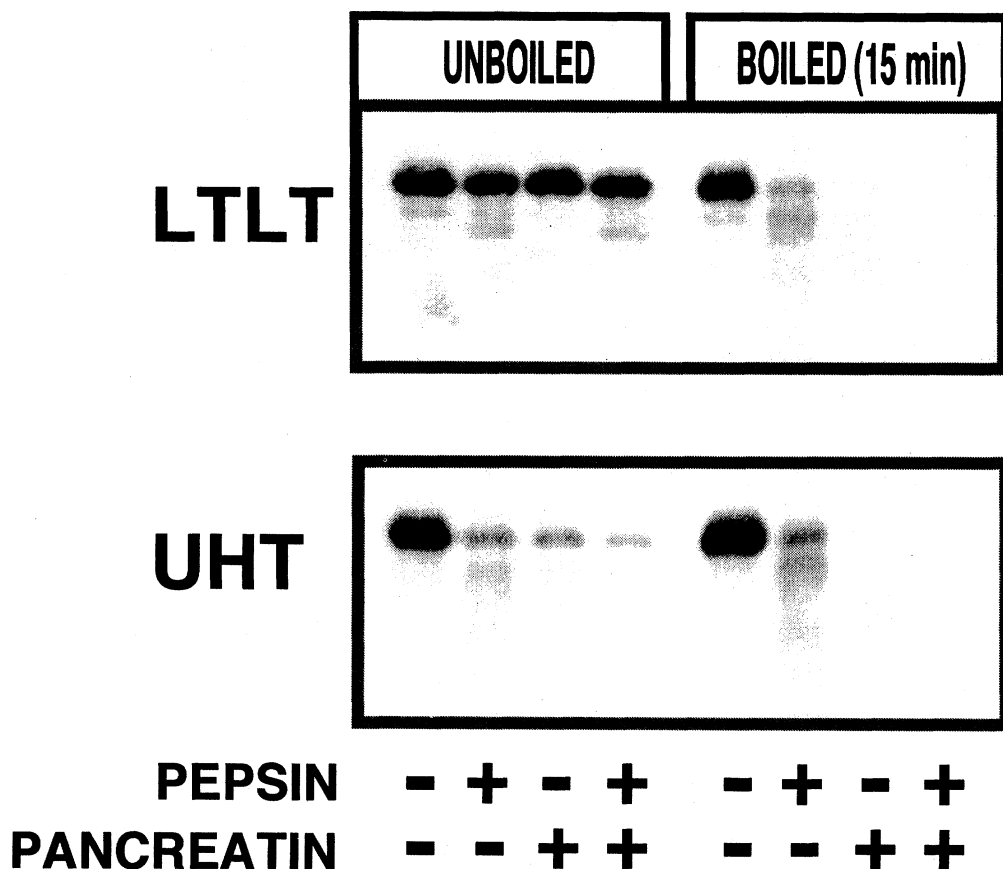


FIG. 3 WESTERN BLOTS OF β -LG IN BOILED LTLT AND UHT DIGESTED BY PEPSIN FOLLOWED BY PANCREATIN

ンドが認められた。さらに、UHTのペプシンとパンクレアチンによる連続消化では、未分解の β -LGのバンドは、ペプシンまたはパンクレアチン単独の消化に比べてそれほど減少していなかった。しかし、ペプシンにより低分子化したと思われる15 kD前後の抗原性を保持したペプチドバンドは、両酵素による連続消化ではほぼ完全に消失していた。

Fig. 3は、LTLTおよびUHTを沸騰水浴中に15分間加温した際のペプシンとパンクレアチンによる β -LGの消化性の変化をイムノプロット法で調べた結果である。牛乳の加温による β -LGのバンドの減少は両牛乳とも認められなかった。一方、加温処理を行ったLTLT中の β -LGは、ペプシンとパンクレアチンによる消化性に著しい変化を認めた。つまり、ペプシンまたはパンクレアチンによる単独消化において、

LTLT中の β -LGは、これらの消化酵素に対する抵抗性を大きく失い、消化酵素処理後の未分解の β -LGのバンドは、加温処理を行わないものと比較して著しく減少した。さらに、ペプシンとパンクレアチンによるLTLTの連続消化では、未分解のバンドがほとんど検出できない程度に消化された。UHTにおけるペプシンとパンクレアチンによる連続消化では、牛乳を加温処理することによって、 β -LGの消化後の未分解のバンドがほとんど検出できない程度に分解されていた。

次に市販加熱殺菌牛乳をペプシンとパンクレアチンで連続消化した試料を用いて、抗牛 β -LGウサギ抗血清に対する競争阻害ELISA試験を行った。Table 1は、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、消化酵素無処理の試料を100%とした場

TABLE 1. ANTIGENICITY OF β -LG IN HEAT PASTEURIZED COW'S MILKS DIGESTED BY PEPSIN FOLLOWED BY PANCREATIN*

	UNDIGESTED	DIGESTED	
	UNBOILED	UNBOILED	BOILED
LTLT-1 (65°C, 30 min)	100**	36 ± 18	12 ± 4
-2 (65°C, 30 min)	100	25 ± 11	-
HTST-1 (72°C, 15 sec)	100	21 ± 4	-
-2 (85°C, 20 sec)	100	9 ± 2	-
UHT-1 (140°C, 3 sec)	100	10 ± 4	10 ± 2
-2 (140°C, 2 sec)	100	10 ± 1	-
-3 (130°C, 2 sec)	100	7 ± 3	-
-4 (130°C, 2 sec)	100	7 ± 3	-

* THE SAME EXPERIMENT WAS DONE THREE OR FOUR TIMES IN DIFFERENT DAYS USING DIFFERENT LOTS OF MILK.

** THE ANTIGENICITY OF β -LG IN EACH DIGESTED COW'S MILK IS EXPRESSED AS THE PERCENTAGES OF THAT IN UNBOILED AND UNDIGESTED COW'S MILK. THE DATA REPRESENT MEAN ± SD.

合の β -LGの抗原性の残存率を示したものである。ペプシンとパンクレアチンによる連続消化後の β -LGの抗原性の変化は、LTLTで約30%前後、UHTで7~10%と算出され、UHTはLTLTに比べ消化後の抗原性の残存率で約1/2.5~1/5.1程度低かった。沸騰水浴中で加温した牛乳中の β -LGのペプシンとパンクレアチンによる連続消化後の抗原性は、LTLTにおいて著しい低下が認められ、加温を行わない試料で消化酵素無処理の場合に対して12%と算出された。この値は沸騰水浴中に加温したUHT中の β -LGの消化後の抗原性(10%)とほぼ同程度であった。

考 察

通常、食物は食品素材そのものを食することは少なく、食事として加熱調理したものを摂取している。牛乳については、乳等省令により規定された方法で加熱殺菌された市販のものが通常利用され、一般に生乳を飲用する機会はほとんどない。牛乳は、卵と並び我が国では主要な食物アレルギーの原因食品となっている¹⁾。

β -LGは熱と消化酵素に対する安定性から牛乳タンパク質の中で最もアレルゲン活性が高いとされている³⁾。

本研究で使用した市販牛乳中の β -LGの抗原性は、生乳との比較は行っていないが、牛乳の加熱殺菌方法の違いに拘わらず、それぞれの銘柄間に顕著な差は認められなかった。一方、食品タンパク質のアレルゲンは、熱による安定性に加えて消化酵素に対する抵抗性にも密接に関係している。小児期は、消化機能が未熟であるため、食物アレルゲンが未消化または抗原性を保持した高分子の状態では腸管に到達し、血液中へ移行するのを増大させると考えられている。

本研究は、市販牛乳中の β -LGのペプシンとパンクレアチンによる単独および連続消化による消化性と消化後の抗原性が牛乳の加熱殺菌方法の違いにより差があることを明らかにしたものである。LTLTとHTST中の β -LGは、ペプシンあるいはパンクレアチン単独消化のみならず、両酵素による連続消化においても強い抵抗性を示した。一方、UHT中の β -LGは、これらの消化酵素に対して抵抗性を示さなかった。UHTは1~5秒間の極めて短時間であるが、120~

150℃の高温で殺菌される。この超高温処理のため牛乳中の β -LGの高次構造が弛み、これらの消化酵素に対して抵抗性を失ったと思われる。

ところで、UHTのペプシン消化では、消化により生成したと思われる抗原性を保持した15 kD前後のペプチドバンドがイムノブロット法により検出された。この抗原性を保持したペプチドバンドは、ペプシンとパンクレアチンによる連続消化では完全に消失した。このことは、UHT中の β -LGが胃腸管で効率よく消化されるためには、小腸での消化の前に胃におけるペプシン消化が十分に行われることが必要と思われる。また、牛乳中の β -LGの消化性から市販加熱殺菌牛乳を選択する場合、LTLTやHTSTよりも加熱殺菌温度の高いUHTのほうが優れている可能性を示唆している。

最近、我々は、ラットにLTLTまたはUHTを強制的に経口投与し、胃内での β -LGの消化性を調べたところ、UHT投与ラットの消化度は、LTLT投与ラットに比べて高いことを報告した⁶⁾。また、Heppellらは、脱脂乳をモルモットに2週間投与した後、加熱または非加熱の乳清タンパク質を静脈注射し、アナフィラキシー反応を調べたところ、100℃または115℃で30分間加熱した乳清タンパク質にはアナフィラキシー感受性がなかったことを報告している⁹⁾。実際に牛乳アレルギー患者に対して、これらの市販加熱殺菌牛乳によるアレルギー症状の出現と程度に差があるかどうかを検討する必要がある。

加工食品にも牛乳が含まれるものがあるが、その多くは、食品製造過程で加熱操作が加えられている。また、家庭での調理に牛乳を材料とする場合も加熱操作を施すものが多く、焼く・煮る・蒸すなどの操作が比較的長時間行われる。食物アレルギー患者の中には、加工食品または加熱調理品に対してアレルギー症状を出現しないことも少なくないようである。しかし、現在のところ、加工食品や加熱調理による食品のアレルギー性の変化やアレルギータンパク質の消化性に関する情報は乏しい。本研究において、15分間沸騰水浴中で加温した市販加熱殺菌牛乳中の β -LGのペプシンとパンクレアチンによる連続消化と消化後の抗原性を調べたところ、LTLT中の β -LGは、加温処理を行わないものに比べて、これらの消化酵素に対する抵抗性を失うとともに消化後の抗原性も大きく低下した。市販牛乳の加熱殺菌方法の違いのみならず、牛乳を含む加工食品の製造過程で行われる加熱処理の程度や牛乳

を用いた加熱調理の方法を選択または把握することにより β -LGの胃腸管での消化性が改善され、アレルギー症状の出現を抑えることができるかもしれない。

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¹⁰⁾。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。八木らは、過去に卵白特異的IgE抗体陽性と診断されたアレルギー疾患児に対して、卵白凍結乾燥粉末負荷試験を実施したところ、陽性患者14例中11例は固ゆで卵白負荷試験で陰性であることを認めた。つまり、この固ゆで卵白陰性患者11例は加熱卵白までは耐性を獲得していたと報告している¹¹⁾。個々の食物アレルギー患者の症状と耐性獲得の程度に応じて摂取可能な食品形態や加熱調理方法を考慮した柔軟な食生活指導が必要とされるであろう。市販加熱殺菌牛乳中の β -LGの消化性の検討と加熱調理の影響として沸騰水浴中で加温処理した市販牛乳中の β -LGの消化酵素に対する消化性の変化を明らかにした本研究成果がその一助になることを期待する。

本論文の要旨は、第34回日本小児アレルギー学会（東京）および第47回日本アレルギー学会総会（東京）において発表した。

文 献

- 1) 西美和：除去食・代用食の問題点。アレルギーの領域 14, 783-789, 1997.
- 2) 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8年度報告書, 1997.
- 3) 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.
- 4) Peddy, M., Kella, N.K.D. and Kinsella, J.E. : J. Agric. Food. Chem. 36, 737-741, 1988.
- 5) 金子哲夫：牛乳タンパク質の抗原性と低減化 In “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.
- 6) 坂井堅太郎, 小川路恵, 高嶋治子, 水沼俊美, 真鍋祐之：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。栄食誌 50, 147-152, 1997.
- 7) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during

- the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277, 680 – 685, 1970.
- 8) 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.
- 9) Heppell, L. M., Cant, A. J. and Kilshaw, P. J.: Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment: a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *British J. Nutr.* 51, 29 – 36, 1984.
- 10) 向山徳子：食物アレルギーの臨床。アレルギー科 13, 113 – 121, 1977.
- 11) 八木映子，宇理須厚雄，森田豊，近藤康人，鶴田光敏，矢崎雄彦，山田一恵：加熱卵白経口負荷試験の意義について。日本小児アレルギー学会誌 10, 24 – 31, 1996.

DIGESTIBILITY AND ANTIGENICITY OF β - LACTOGLOBULIN IN DIFFERENT HEAT PASTEURIZED COMMERCIAL COW'S MILKS DIGESTED BY PEPSIN AND PANCREATIN

Kentaro Sakai, Tomonori Nakao, Sachinobu Manabe^{*)}

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima

^{*)} *Department of Domestic Science, Kobe Women's University, Seto Junior College, Okayama*

Allergenicity of food proteins is generally dependent on their heat-stability and resistance to digestive enzymes. Using the methods of ELISA inhibition assay and immunoblots, we assessed peptic- and pancreatic-digestibility of β -lactoglobulin (β -LG) and its antigenicity after the treatment with digestive enzymes in three types of commercially available heat pasteurized cow's milks (low temperature long time-treated milk (LTLT), high temperature short time-treated milk (HTST) and ultra-high temperature-treated milk (UHT)). Digestibility of β -LG was resistant to both single and sequential peptic- and pancreatic-digestions in the LTLT and HTST, but not in the UHT. In the LTLT, boiling of the milk for 15 min lead β -LG to lost of the digestive resistance. These results suggested that the UHT may be superior than the LTLT and HTST in the point of gastrointestinal digestibility of β -LG, and that consideration of cooking for menus composed of the cow's milks may improve digestibility of β -LG in the stomach and intestines.

(Accepted : November 27, 1997)