

# グルテンフリー製品について-1

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)

Key Words: グルテンフリーパン、グルテンフリービール、小麦デンプン、グルテン不足小麦、大麦

本論文「グルテンフリー製品について-1」は“Celiac Disease and Gluten” (by Herbert Wieser, Peter Koehler and Katharina Konitzer) 2014 の第4章 Gluten-Free products の一部を翻訳紹介するものである。

## 概要

グルテンフリー製品は、トウモロコシ、米、モロコシ、ヒエなどのグルテンを含まない穀物や、ソバ、アマランサス、キノアなどの擬似穀物でできている場合がある。さらに、小麦、ライ麦、または大麦からのグルテン含有材料でも、デンプンの徹底的な洗浄、飲料のペプチダーゼ処理、またはグルテン欠乏株の使用などの特殊な処理によってグルテンフリーにすることができる。特にパンやビールの食感や風味の特性を改善することは依然として課題があるが、栄養価の改善においてはかなりの進歩が達成されている。Codex Alimentarius Standard 118-1979によると、グルテンフリー製品のグルテンレベルは20mg/kgを超えてはならない。オーストラリアとニュージーランドを除いた、欧州連合、カナダ、および米国の食品表示法は、主にコーデックスに準拠している。Crossed Grain のシンボルは、セリアック病 (CD) 患者向けの製品を識別するために国際的に認められている。グルテンフリー製品の安全性を保証するために、グルテン定量のためのいくつかの分析方法が開発された。食品マトリックスからグルテンタンパク質を適切に抽出した後、特定の抗体に基づく酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) が、グルテンの定量に最も広く使用されている。特定のマーカーとしてのグルテンペプチドのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、カラムクロマトグラフィー、または

質量分析などの非免疫化学的方法は、有望な代替手段である。ただし、さまざまな食品マトリックス中のグルテンの正確な定量は、ターゲット分析物としてのグルテンの複雑さのために依然として課題を提起し、分析方法を校正するための適切な標準物質が緊急に必要とされている。

グルテンフリーダイエット (GFD) の厳格な生涯遵守は、現在、セリアック病 (CD) の唯一の効果的な治療法である。したがって、小麦、ライ麦、大麦、およびパン、その他の焼き菓子、パスタ、ビールなどのオート麦から製造されたグルテン含有食品はすべて避ける必要がある。これは、これらの製品をグルテンフリーの代替品に置き換えるか、グルテンフリーにされた小麦、ライ麦、大麦、およびオート麦からの製品を消費することによって管理できる。

## 1. グルテンフリー原料からの製品

「Codex Stan118-1979 (セクション 3.1 を参照) によると、グルテンを含まない食事療法の食品には、消費時に 20mg を超えるグルテン/kg が含まれていてはならない。グルテンフリーのダイエット製品の製造に使用される原材料は、主に無毒の穀物 (トウモロコシ、米、モロコシ、ヒエなど) と擬似穀物 (アマランサス、ソバ、キノアなど) である。食事調査によると、GFD の患者は、ビタミン B 群、鉄分、カルシウム、繊維の推奨量よりも少ない量を摂取す

ることがよくある<sup>1,2)</sup>。この理由は、伝統的に、胚芽とふすまの画分が除去された米とトウモロコシの精製粉、または純粋なデンプンもグルテンフリー食品のベース材料として使用されているためである。これは、患者が可能な限り強化された製品を摂取することを奨励するために、GFDの栄養価に重点を置く必要があることを示唆している。アマランサス、キノア、ソバなどの擬似穀物は、タンパク質の品質が高く、カルシウムや鉄などの繊維やミネラルが豊富に含まれているため、グルテンフリー製品の栄養成分として推奨されている<sup>3)</sup>。これらのグルテンフリーの穀物を精製されていない形でGFDに組み込むと、多様性が増すだけでなく、栄養価も向上する。

いくつかの研究では、パン、パスタ、菓子製品などの擬似穀物を含むグルテンフリー製品の処方が成功したことが報告されている。しかし、これらの製品の商品化はまだかなり限られており、擬似穀物を含む製品はごく少数しか入手できない。これらの種子のグルテンフリー成分としての機能性を十分に活用して、栄養的にバランスの取れた口当たりの良い製品を製造するには、さらなる研究が必要である<sup>3)</sup>。オート麦をGFDに含めることについては、まだ議論の余地がある。明らかに、CDに苦しんでいるほとんどの人はオート麦を許容する。汚染されていないオート麦を摂取すると、GFDの栄養価が大幅に向上し、CD患者に適した食品の範囲が広がる<sup>4,5)</sup>。一部のセリアック病協会は、GFDにオート麦を含めることを推奨しているが、特別な注意が必要である。今日、グルテンフリー製品の配合は非常に多様であり、さまざまな粉（例えば、無毒のシリアル、擬似穀物、栗から）、デンプン（例えば、米、トウモロコシ、ジャガイモ、キャッサバから）、タンパク質（例えば、牛乳、卵、大豆から）、および親水コロイド（例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カラギーナン、キサントガム）<sup>6)</sup>である。

グルテンフリー穀物と擬似穀物の栄養プロファイルを改善する可能性には、GFDに成分として含める前の種子発芽がある<sup>7)</sup>。ただし、この方法は、製品の食感や味に悪影響を与える可能性がある。グルテンフリー製品の食感と香りを改善するために、微生物発酵（サワードウの形など）が推奨されている<sup>8)</sup>。

繊維の取り込みを改善するために、オオバコの殻、セルロース、またはテンサイ、柑橘類、エンドウ豆、野菜、リンゴ、または竹からの繊維を添加することにより、グルテンフリー製品を強化することができる<sup>9)</sup>。一般に、市場に出回っているグルテンフリーのダイエット製品の品質と入手可能性は、過去数十年にわたって継続的に改善されてきた。Gallagherは、グルテンフリーのビスケット、クッキー、ケーキ、パスタ、ピザの品質を向上させるさまざまな配合を発表している<sup>10)</sup>。それにもかかわらず、多くのCD患者は、例えばグルテンを含む対応物と比較して風味、食感、および口当たりが悪いため、依然として満足していない。次のセクションで説明するように、小麦パンと大麦ビールの改良は、GFDの最も重要な側面の1つであり、食品技術者、パン屋、醸造業者にとっての課題である。

### 1-1. グルテンフリーのパン

小麦パンの独特の品質は、グルテンタンパク質（グリアジンとグルテニン）の特別な特性の結果である。それらは小麦粉に高い吸水能力を提供する；凝集性、粘度、弾力性、およびガス保持能力を備えた生地；高容積と多孔質クラムのパン<sup>11)</sup>。要するに、小麦グルテンは多くの人からベーカリー製品の心臓部であると考えられている<sup>12)</sup>。他のすべての穀物粉は、標準化された条件下で焼くと、容量が少なく、細孔が小さく、弾力性のないクラムを含む低品質のパンを生成する（図4.1）。望ましいグルテン特性のすべてを模倣することは非常に困難である。グルテン

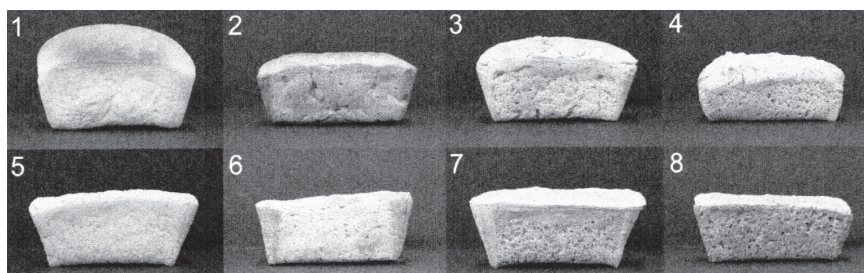


図 4.1 標準的な条件下で焼いた異なる穀物および擬似穀物からのパンの外観  
1. 小麦；2. ライ麦；3. オオムギ；4. オート麦；5. 米；6. トウモロコシ；7. ソバ；8. モロコシ

を置き換えるには、グルテンの多くの機能を置き換えるために、許可された粉、タンパク質、親水コロイド、および特別な技術を組み合わせて使用する必要がある<sup>11,13)</sup>。通常、グルテンを含まないパンの製造に使用される基本材料は、デンプンを含む粉または安全な供給源（トウモロコシ、米、ポテトなど）からのデンプンである。小麦デンプンは、グルテン含有量が100mg/kg未満で、最終製品のグルテン含有量が20mg/kgを超えない限り、全国レベルで許可される。グルテンタンパク質による吸水能力と生地粘度を模倣するために、いくつかの親水コロイドが推奨されている。これらの化合物は親水性炭水化物ポリマーであり、水結合剤として機能し、レオロジー生地の特性とパンのテクスチャーを改善し、デンプンの老化を遅らせる<sup>11)</sup>。

ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カラギーナン、キサントガム、グアーガム、およびアルギン酸ナトリウムは、グルテンフリーのパンの製造に使用される化合物の例である。グルテンタンパク質の代わりに、他のタンパク質源を追加する必要がある。カゼイネート、スキムミルクパウダー、ホエイプロテイン濃縮物などの乳製品、大豆製品、卵タンパク質、コーンプロテイン（ツェイン）が推奨されている<sup>11)</sup>。これらのタンパク質は、食感を高めるだけでなく、グルテンフリーのパンの栄養特性を改善する。ただし、乳糖不耐症（牛乳）とアレルギーの可能性（大豆、卵、牛乳）は、これらのグルテン代替品の使用に制限する要因である。乳酸菌とグルテンフリーのサワードウ、トランスグルタミナーゼ、ペプチダーゼ、ラッカーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素の使用、および高静水圧での処理は、グルテンフリーのパンの品質を向上させるためのさらなる可能性がある<sup>4,11)</sup>。最近、オオバコは、パンの香りと食感への影響が最も少ないグルテン代替品として説明されている<sup>14,15)</sup>。官能分析は、CD患者と健康な対照の両方の間で高い受容率を示した。要するに、さまざまな方法は、グルテンフリーのパン製造における単一の成分がグルテンとその機能性に取って代わることができないことを示している<sup>13)</sup>。

グルテンフリーのパン作りのプロセスは、標準的な小麦パンのプロセスとは大きく異なる。グルテンフリーの生地は、小麦生地よりも凝集性と弾力性が

はるかに低くなっている<sup>13)</sup>。それらは非常に滑らかで、より粘着性があり、ペースト性が少なく、取り扱いが難しい。ほとんどのグルテンフリー生地は、より高い水レベルを含む傾向があり、ケーキのバターに匹敵するより流動的な構造を持っている。小麦生地より短い混合、発酵とベーキング時間が必要である。パンの容量はほとんど少なく、パンクラムは固く、クラストは柔らかくなる<sup>13)</sup>。短い貯蔵寿命、急速な劣化、乾燥した口当たり、および不満足な味も、グルテンフリーのパンの欠点のいくつかである。グルテンフリーのパンの品質を改善するための数え切れないほどの努力にもかかわらず<sup>8)</sup>、最適化された配合とプロセスに関する継続的な研究が依然として必要である。

## 1-2. グルテンフリービール

ビールの醸造は、世界の多くの地域で約5000年前にさかのぼることができる。ビールはパンと一緒に、古代文化の食事の重要な部分であった。大麦と、部分的には小麦は、伝統的にビールの主成分として使用されてきた。通常、大麦と小麦麦芽をベースにした従来のビールには、グルテンフリー製品の許容しきい値レベルをはるかに超えるグルテンが含まれている<sup>16)</sup>。グルテンフリービールに関しては、米、トウモロコシ、ヒエなどの安全な穀物、およびソバ、キノア、アマランサスなどの擬似穀物からのモルトとビールの生産に焦点が当てられている<sup>17)</sup>。多くの研究は、従来のビールと同様の製品を得るために、麦芽製造と醸造のプロセスを適用された原材料に適合させる必要があることを示した。現在、モロコシ、ヒエ、ソバのビールだけが成功しているようで、市場に出回っている。ただし、代替成分で作られた製品のフレーバーは、まだ多くのCD患者に受け入れられない可能性がある。従来のビールに匹敵する製品を開発するには、さらに集中的な研究が必要である。異なるオオムギ品種の免疫原性の有意差は、低レベルのグルテンを含むオオムギ栽培品種の繁殖の可能性を高める<sup>18)</sup>。

## 2. グルテンフリーにされた製品

グルテンを含む穀物から作られた製品は、特別な処理によってグルテンフリーになる場合がある。これらの製品のグルテン含有量は、20mg/kg未満のレ

ベルに下げる必要があり、一部の国では、合計で 20 ~ 100mg/kg のレベルに下げる必要がある<sup>19)</sup>。グルテンフリーの穀物ベースの製品とは、主に小麦デンプン、小麦粉と生地、および飲料である。

### 2-1. 小麦デンプン

小麦からのデンプンは、グルテンフリーで「レンダリング」されたグルテンフリー食品の最初の成分である。CD (Celiac disease) の必須処理として GFD (Gluten-free diet) が導入されて以来、グルテンフリーの焼き菓子の製造のベース材料として頻繁に使用されてきた。小麦デンプンは、その優れた特性から、グルテンフリーの焼き菓子の材料として今でも高く評価されている。生地の準備中に最大 45% の水分を吸収し、生地の連続ネットワークで不活性フィラーとして機能し、ガス透過性の構造を作成した。ベーキングでは、大小の顆粒の組成が良好であるため、小麦デンプンを使用することで最高の生地密度に到達する。他のすべてのデンプンは、空気の取り込みが多い生地を作成する<sup>13)</sup>。また、小麦デンプンを使用することで、パンの量が最大になる。ただし、小麦デンプンには、20mg/kg 未満から 500mg/kg を超えるまで、濃度が大きく異なる可能性のある残留グルテンが含まれている場合がある。これは、そのレベルがデンプンの製造プロセス (洗浄ステップなど) に依存するためである。

グルテンフリーの焼き菓子の製造に小麦デンプンが広く使用されていることが、1981 年に制定され 1983 年に改正されたグルテンフリー食品の最初の改訂コーデックス基準草案 (Codex Stan 118-1979) の背景であった<sup>20)</sup>。当時、分析方法である窒素 (N) の測定は小麦デンプンに限定されており、しきい値は乾物ベースで N=0.05% に設定されていた。ただし、小麦デンプン中の N の一部のみがプロテイン N である。別の部分は、リン脂質などの非タンパク質 N 含有化合物に属する。タンパク質画分には、グルテンタンパク質に加えて、表面関連タンパク質 (プロチオニン、ヒストン、フリアビリンなど) などの非グルテンタンパク質が多数含まれている<sup>21)</sup>。結果として、小麦デンプンの N 含有量はグルテン含有量とわずかに相関しているだけであり、真のグルテン含有量を反映していない<sup>22)</sup>。マルトデキストリン、グルコースシロップ、デキストロースなどの小

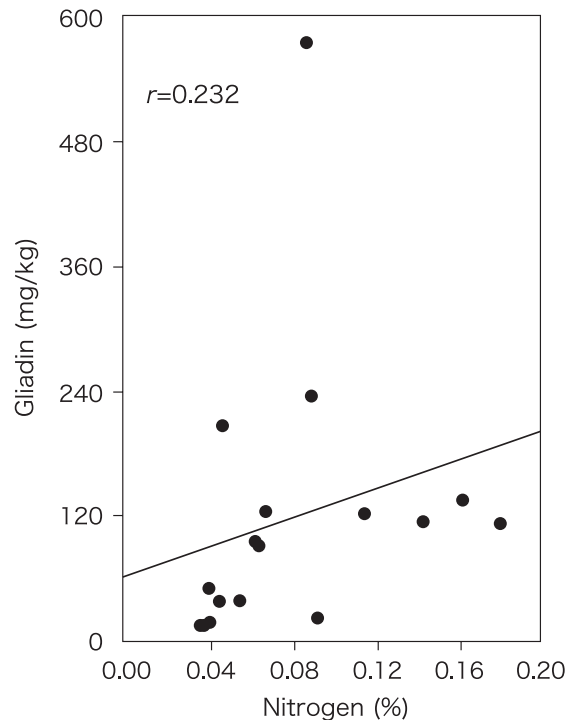


図 4.2 異なる小麦デンプンにおける窒素とグリアジン (Gliadin) の含有量との間の相関

麦デンプン誘導体についても同じことが言える。例として、ケルダール法で測定された N 含有量とゲル浸透液体クロマトグラフィー<sup>22)</sup> を図 4.2 に示す。さらなるドラフト改訂基準は、N 含有量に基づく閾値を排除し、免疫化学的方法によって決定されたグルテン含有量の閾値に置き換えた。現在のコーデックス基準を満たす小麦デンプンベースのグルテンフリー製品は、前向き無作為化試験によって、CD 患者にとって自然な GFD と同じくらい安全であることが示された<sup>23)</sup>。小麦デンプン誘導体でも同等の結果が得られた<sup>24)</sup>。

### 2-2. 酵素処理製品

酵素処理によって原材料や食品中のグルテンを無害化するための多くの提案がなされてきた<sup>25)</sup>。乳酸菌 (乳酸菌) は非常に複雑なペプチダーゼ系を持っていることが知られている。サワードウは特に乳酸菌が豊富で、それらのいくつかはプロリンに富むタンパク質とペプチドを加水分解することができる特定のペプチダーゼを持っている<sup>26)</sup>。

4つのサワードウ菌株:

- (1) *Lactobacillus alimentarius*,
- (2) *Lactobacillus brevis*,
- (3) *Lactobacillus sanfranciscensis*,

(4) *Lactobacillus hilgardii* は、プロリンに富むタンパク質とペプチドを加水分解するために必要なペプチダーゼの完全な組み合わせを持っていることが知られている<sup>27)</sup>。これらの乳酸桿菌は、小麦(30%)と無毒のオート麦、ヒエ、ソバ粉の混合物を含む発酵生地を作るために使用された。長期発酵(24時間)により、グリアジンのほぼ完全な加水分解が達成された。焼いた後、パンはCD患者の *in vivo* 二重盲検チャレンジに使用された。パン酵母で発酵させ、約2gのグルテンを含むパンを陽性対照として使用した。17人の患者のうち13人は、コントロールパンの摂取後、腸透過性の著しい変化を示した。サワードウパンを食べさせたとき、同じ13人の患者の腸透過性の値はベースライン値と有意に異ならなかった。サワードウ乳酸菌とビフィズス菌の混合物であるプロバイオティクス VSL #3 製剤も、長時間の発酵中に小麦粉の毒性を低下させる能力を示した<sup>28)</sup>。これらの結果は、小麦粉、選択された乳酸菌、無毒の粉、および長い発酵時間を使用するパンのバイオテクノロジーが、小麦を含む小麦粉から無毒のパンを製造するための新しいツールであることを示した。同じアプローチがパスタ作り<sup>29,30)</sup> やライ麦粉や大麦粉の処理<sup>31)</sup> にもうまく適応した。サワードウ乳酸菌の加水分解活性を高めるために、さらなる努力がなされた。真菌のプロリルペプチダーゼとともに、小麦粉生地の長期発酵中に、選択された乳酸桿菌の新しい混合物が使用された<sup>32)</sup>。さまざまな免疫化学的および非免疫化学的分析方法により、グルテンタンパク質のほぼ完全な分解が明らかになり、CD毒性の *in vitro* 試験は陰性でした。パン作りの品質は、従来のパン酵母パンと同様だった。

サワードウ乳酸菌と真菌ペプチダーゼで製造された加水分解小麦粉から作られた焼き菓子の60日間の食事は、CD患者にとって毒性が無かった<sup>33)</sup>。グルテンフリーにされた小麦サワードウから製造された甘い焼き菓子も、CD患者にとって安全であることが示された<sup>34)</sup>。発芽小麦から調製されたサワードウを使用することにより、さらに高いグルテン分解能力を達成することができた<sup>35)</sup>。要約すると、サワードウ乳酸菌の適用は、汚染グルテンの除去とグルテンフリーの焼き菓子の生産に有望であるように思われる。しかし、サワードウ発酵はグルテンのテクノ機能特性を無効にするため、無害化された材料は主にグルテンフリーのレシピの栄養価と風味に富んだ成分として有用である可能性がある。発芽中の穀物から抽出されたペプチダーゼ調製物は、クワス(微アルコール飲料)や麦芽ビールなどの穀物ベースの発酵飲料への適用によって最近示されたように、食品中のグルテン分解の有望な候補でもある<sup>36)</sup>。これらは、グルテン分解ペプチダーゼの高活性を含む発芽ライ麦のふすま抽出物で処理された。飲料を0.1%の抽出物と50°Cで4時間インキュベートすると、競合R5酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)で測定されたグルテン当量が大幅に減少した(図4.3)。飲料を1%の抽出物で処理した後、グルテンは検出されなくなった。グルテン含有飲料は、微生物トランスグルタミナーゼ(mTG)で処理することによって無害化することもできる<sup>37)</sup>。飲料(例えば、大麦ベースのビール)は、ストレプトミセス・モバラエンシスに由来するmTGとともにインキュベートされる。これにより、残留グルテンペプチドの架橋と不溶性コンジュゲートの形成が起り、ろ

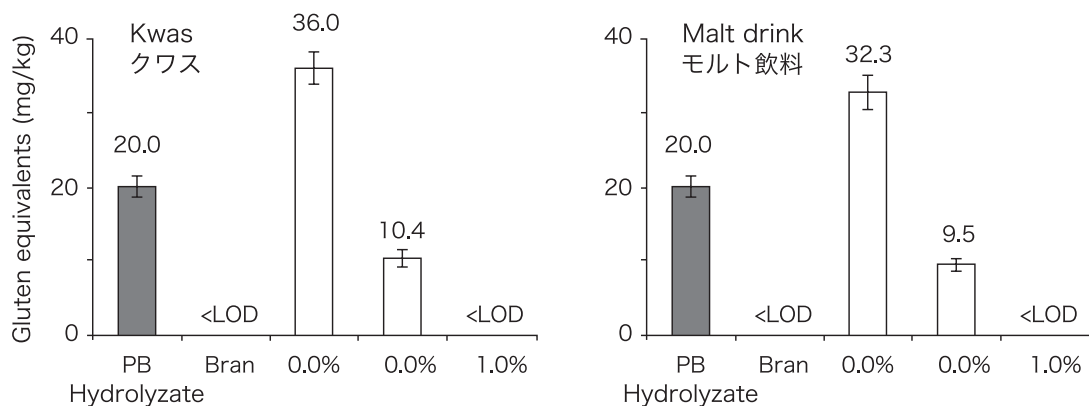


図 4.3 発芽ライ麦のふすまからのペプチダーゼによる飲料のグルテン含有量の減少 (PB, Prolamin 大麦; LOD, 検出限界)<sup>36)</sup>

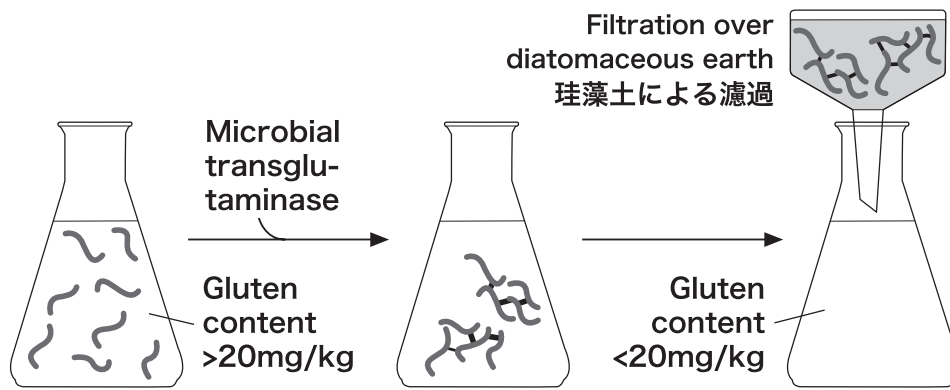


図 4.4 部分的に加水分解されたグルテンを含む飲料を解毒するための微生物トランスグルタミナーゼの使用の概略図<sup>25)</sup>

過によって除去できる (図 4.4)。プロセスが適切な方法で実行された場合、結果として得られるビールのグルテンレベルは 20mg/kg 未満に減少し、グルテンフリーと表示できる。グルテン毒性を防ぐ mTG の可能性は、小麦粉への応用にまで拡大された。Gianfrani らは、免疫原性グリアジンペプチド  $\alpha$  (56–68) を mTG およびリジンまたはリジンメチルエステルとインキュベートすると、架橋が形成されて免疫応答が阻害されることを発見した<sup>38)</sup>。したがって、小麦粉を mTG およびリジンメチルエステルで処理した。グリアジンを生成物から単離し、ペプシンおよびトリプシンで消化し、T 細胞反応性を示さない T 細胞アッセイによって試験した。2012 年に、CD 患者におけるそのような変化した小麦の影響は、ランダム化された単一盲検の 90 日間の試験 (3.7g グルテン/日) によって研究された<sup>39)</sup>。臨床的再発 (症状、腸透過性、血清学、組織学、インターフェロン (IFN)  $-\gamma$ ) は、通常的小麦粉を投与された CD 患者と比較して、改変小麦を投与されたグループで減少した。したがって、食品グレードの酵素 (mTG) と適切なアミン (リジンメチルエステル) によるグルテン含有食品のアミド交換を使用して、グルテン毒性をブロックすることができる。修飾タンパク質の最終的な機能特性は評価されていないが、分子量分布は維持されており、これはペプチダーゼによる分解よりも大きな利点である。

### 2-3. グルテンが不足している小麦と大麦

最も広く栽培されている作物である小麦は非常に多様で、世界中の植物育種家によって 25,000 以上の異なる栽培品種が生産されている。六倍体の *Triticum aestivum* (ゲノム AABBDD) はパンコムギ

として世界的に使用され、四倍体の *Triticum durum* (ゲノム AABB) はパスタコムギとして使用されている。数百のグルテンタンパク質が単一の小麦品種にあり、それらのほとんどは CD の病因に寄与している。ほとんどすべてのグルテンタンパク質は、各ゲノムの 1 番染色体と 6 番染色体にコードされている。一般的な小麦のグリアジンは、染色体 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, および 6D にコードされている<sup>40)</sup>。

6 つの主要な遺伝子座は、最初の (Gli-1) および 6 番目の (Gli-2) 相同グループの染色体の短腕の遠位端にマッピングされている。特定の遺伝子座は、Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1, Gli-A2, Gli-B2, および Gli-D2 と呼ばれる。HMW-グルテニンサブユニット (HMW-GS) は、同族グループ 1 染色体 (Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1 遺伝子座) の長腕の Glu-1 と呼ばれる遺伝子座に存在するパラログスな x 型および y 型遺伝子のペアによってコードされる。LMW-グルテニンサブユニット (LMW-GS) は、それぞれ染色体 1A, 1B, および 1D の短腕にある Glu-A3, Glu-B3, および Glu-D3 遺伝子座の遺伝子によって制御されている<sup>42)</sup>。CD 患者にとって毒性のない小麦系統を探す最初の試みは 1970 年代に行われた。有毒な A-グリアジンが染色体 6A にコードされているという知識に基づいて、毒性試験のために十分な量のコムギ系統チャイニーズスプリング (ヌルアイソミック 6A-テトラソミック 6B) を栽培した。2 人の CD 患者は、ヌルアイソミック 6A 小麦粉から毎日 65g のパンを受け取り、16 日後のキシロースと脂肪の吸収をテストしても効果は示されなかった<sup>43)</sup>。さらなる研究では、130g のパン/日でチャレンジされた 3 人の追加の患者が関与した。しかしなが

ら、小腸粘膜のその後の評価は、明確な組織損傷が試験期間の終わりに起こったことを示した。Ciclitira のグループも同じ結論に達した<sup>44)</sup>。

その結果、次の疑問が生じた：(1) すべてのグリアジンとグルテニンに感受性の高い患者に粘膜損傷を引き起こす可能性があることを知った上で、CDの原因となる遺伝子の削除された新しい小麦品種を構築することは可能か？(2) そのような栽培品種でパンを作り、有毒穀物入れずに生産されたパンよりもそれがCD患者にとって望ましいだろうか？<sup>44,45)</sup>。今日でも、これらはまだ話題になっている問題である。無毒または低毒性の小麦系統を見つけるための次のアプローチが1995年に調査された。Frisoniと同僚は2つの小麦系統— $\alpha$ -と $\beta$ -グリアジン（電気泳動的移動度上の命名法に基づく）の低い1つと $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、および $\omega$ -グリアジンの低いもう一つ別のものを元の栽培品種と比較した<sup>46)</sup>。各グリアジン画分のペプシントリプシン消化物は、セリアック粘膜を伴う *in vitro* 器官培養システムでCD毒性についてテストされた。すべてのグリアジン画分を含むコムギと比較してこの異なったグリアジンサブフラクションを持つ欠損コムギ系統では、有意に低い毒性が見られた。2つの欠陥のある系統の間の違いは顕著ではなかった。Frisoniとその同僚によると、これらの結果はCD治療の新しいチャンスを示唆している。

T細胞検査と抗体ベースのアッセイは、異なる小麦品種に存在するT細胞刺激ペプチドの量に大きな変動が存在することを示した<sup>47)</sup>。そのような情報は、CD患者による消費に適した小麦品種を選択して育種するために使用できると結論付けられた。以下の研究は、T細胞刺激エピトープの量が減少した小麦に焦点を当てた。染色体6Dの短腕のGli-2遺伝子座内にある遺伝子は、ほとんどの $\alpha$ -グリアジンをコードしている<sup>48)</sup>。したがって、33-merペプチドなどの $\alpha$ -グリアジン由来の免疫優勢ペプチドは、二倍体ヒトツブコムギ(AA)および四倍体(AABB)デュラムコムギのグルテンには存在しない。

個々のグルテン遺伝子座を削除することによるエピトープのレベルと技術的特性への影響は、コムギ品種チャイニーズスプリングの一連の削除系統を使用して分析された<sup>49,50)</sup>。結果は、Dゲノムの第1

染色体の短腕から $\omega$ -および $\gamma$ -グリアジンとLMW-GS遺伝子座を除去すると、技術的特性を維持しながら刺激性エピトープが除去されることを示した。多数の四倍体デュラムコムギ系統に関する研究は、グルテン由来のCD活性エピトープの曝露量が、集団におけるCDの有病率と症状の重症度の一般的な低下に寄与するという仮定に基づいていた。結果は、刺激性 $\alpha$ -グリアジンエピトープのレベルが低下した系統が存在することを示した<sup>51,52)</sup>。*Triticum monococcum*に由来するグリアジンは、グルテン感受性T細胞株を誘導できないことが示された。したがって、著者らは、これらのグリアジンもIFN- $\gamma$ の産生および組織学的損傷において無害であると結論付けた<sup>53)</sup>。いくつかのグリアジンとグルテニンが自然に欠失した実験的な小麦系統(C173)は、寛解下でチャレンジされたCD患者の十二指腸粘膜生検を使用して *in vitro* でテストされた<sup>54)</sup>。結果は、C173が絨毛対陰窩比を減少させないが、炎症性サイトカインIFN- $\gamma$ およびインターロイキン-2の放出、ならびに上清中の抗トランスグルタミナーゼ(TG)2抗体の産生を増加させることを示した。したがって、C173はCD患者には適さない可能性がある。コムギ品種間のCD特異的エピトーププロファイルの実質的な違いは、A、B、およびDゲノムの遺伝学的の違いに起因する可能性がある<sup>48,55)</sup>。11の六倍体コムギ栽培品種からの3000を超える発現 $\alpha$ -グリアジン配列を分析して、それらがCDに関与する可能性のあるエピトープをコードするかどうかを決定した<sup>56)</sup>。

結果は、すべてのT細胞刺激性エピトープを欠く単一の $\alpha$ -グリアジンが存在しないことを示した。したがって、従来の育種では無毒の小麦を生産することは不可能である。ただし、3つのゲノム間で顕著な変動が観察された。Dゲノム $\alpha$ -グリアジンが圧倒的に免疫原性が高く、Aゲノム $\alpha$ -グリアジンは中程度の免疫原性プロファイルを示し、Bゲノム $\alpha$ -グリアジンは免疫原性が最も低かった。Miteaらは、AゲノムとBゲノムにコードされた $\alpha$ -グリアジンの遺伝情報を組み合わせることにより、非免疫原性 $\alpha$ -グリアジンをコードする新しい遺伝子を生成できる可能性があることを提案した<sup>56)</sup>。RNA干渉(RNAi)は、過去数十年で最もエキサイティングな発見の1つである<sup>57)</sup>。この発見は2006年にノーベ

ル生理学・医学賞を受賞し、遺伝子の特定のサイレンシングのための非常に貴重なツールになった。RNAiを用いた遺伝子工学により、小麦品種フロリダで $\alpha$ -グリアジンのサイレンシングが成功したが、得られたラインのレオロジー生地の特性やベーキング品質に大きな影響はなかった<sup>58)</sup>。Van Herpenらは、わずかに異なるRNAi戦略を適用した。DQ8制限エピトープ $\alpha$ 206-217を含む特定の $\alpha$ -グリアジンを栽培品種Cadenzaで標的とし、他の $\alpha$ -グリアジンは変更しなかった<sup>59)</sup>。別の研究では、 $\gamma$ -グリアジンの有意なサイレンシングがコムギ品種のコリンウズラで達成され<sup>60)</sup>、グリアジンの発現は異なるトランスジェニック系統で強くダウンレギュレーション（発現低下）される可能性がある<sup>61)</sup>。

総グルテンタンパク質をこれらの系統から抽出し、CD患者の腸病変に由来する4つの異なるT細胞クローンを刺激する能力についてテストした。結果は、グリアジンのダウンレギュレーションを使用して、CD特異的免疫原性のレベルが低いコムギ系統を取得できることを示した。しかし、そのような戦略は、特にヨーロッパ諸国の消費者による遺伝子組み換え小麦に対するかなりの国民の反対に直面する可能性がある。全体として、グルテン欠乏小麦の開発へのアプローチに関して多くの疑問が生じるだろう。Codex Alimentariusおよびさまざまな国内規制では、製品にグルテンフリーのラベルを付けるために20mg/kgのグルテンしきい値が要求されている。これは、小麦粒または小麦粉のグルテン含有量

(約100,000mg/kg)を1/5000分の1に減らす必要があることを意味する。研究によると、現在の実験用小麦系統には少量のグルテンが含まれている可能性があるが、これらの研究では、この小麦がCD患者にとって十分に安全であるという証拠は提供されていない<sup>62)</sup>。CDセーフ小麦を開発できれば、収量やベーキング特性が低下する。したがって、従来の小麦は非常に安価で堅牢な工業製品であり、これらの特別に改変された穀物が市販の小麦株にとって代わる可能性は低いため、このようなアプローチの経済効率は限られている<sup>63)</sup>。それらは代替の小規模生産システムでのみ栽培され、より高い価格は、重篤な状態の患者を対象とした製品のニッチ市場を超えて使用するには法外なものになる可能性がある<sup>64)</sup>。

最後に大事なことを言い忘れたが、そのような小麦ラインからの焼き製品は、有毒な穀物なしで生産されたグルテンフリー製品よりも品質が望ましいだろうか？オオムギは、純粋な近交系品種が利用できる二倍体穀物であるため、解毒への遺伝的アプローチでの使用に魅力的である。タナーと同僚は、B-およびC-ホルデインを欠く大麦系統を提示した<sup>65)</sup>。経口ホルデインチャレンジによって活性化された末梢血単核細胞を用いた試験は、これらの系統の免疫原性が野生型オオムギの免疫原性と比較して20分の1に減少したことを示した。したがって、ホルデインを含まない大麦の作成が可能かもしれない。



## References

1. Hallert C., Grant C., Grehn S., Granno C., Hulten S., Mithagen G. *et al.* Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; **16**: 1333-1339.
2. Thompson T., Dennis M., Higgins L.A., Lee A.R., Sharrett M.K. Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? *J Hum Nutr Diet.* 2005; **18**: 163-169.
3. Alvarez-Jubete L., Arendt E.K., Gallagher E. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends Food Sci Technol.* 2010; **21**: 106-113.
4. Huettner E.K., Arendt E.K. Recent advances in gluten-free baking and the current status of oats. *Trends Food Sci Technol.* 2010; **21**: 303-312.
5. Pawlowska P., Diowksa A., Kordialik-Bogacka E. State-of-the-art incorporation of oats into a gluten-free diet. *Food Rev Int.* 2012; **28**: 330-342.
6. Zannini E., Miller-Jones J., Renzetti S., Arendt E.K. Functional replacements for gluten. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012; **3**: 227-245.
7. Omary M.B., Fong C., Rothschild J., Finney P. Effects of germination on the nutritional profile of gluten-free cereals and pseudocereals: a review. *Cereal Chem.* 2012; **89**: 1-14.
8. Zannini E., Pontonio E., Waters D.B., Arendt E.K. Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; **93**: 473-485.
9. Hager A.S., Axel C., Arendt E.K. Status of carbohydrates and dietary fiber in gluten-free diets. *Cereal Foods World.* 2011; **56**: 109-114.
10. Gallagher E. Formulation and nutritional aspects of gluten-free cereal products and infant foods. In: Arendt E.K., dal Bello F., eds. *Gluten-free cereal products and beverages.* New York (USA): Academic Press; 2008: 321-346.
11. Arendt E.K., Morrissey A., Moore M.M., dal Bello F. Gluten-free breads. In: Arendt E.K., dal Bello F., eds. *Gluten-free cereal products and beverages.* New York (USA): Academic Press; 2008: 289-319.
12. Engleson J., Atwell B. Gluten-free product development. *Cereal Foods World.* 2008; **53**: 160-184.
13. Houben A., Hoehstaetter A., Becker T. Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *Eur Food Res Technol.* 2012; **235**: 195-208.
14. Zandonadi R.P., Botelho R.B.A., Araujo W.M.C. Psyllium as a substitute for gluten in bread. *J Am Diet Assoc.* 2009; **109**: 1781-1784.
15. Cappa C., Lucisano M., Mariotti M. Influence of Psyllium, sugar beet fibre and water on gluten-free dough properties and bread quality. *Carbohydr Polym.* 2013; **98**: 1657-1666.
16. Hernando A., Garcia E., Llorente M., Mujico J.R., Lombardía M., Maeki M. *et al.* Measurements of hydrolysed gliadins in malts, breakfast cereals, heated/hydrolysed foods, whiskies and beers by means of a new competitive R5 ELISA. In: Stern M., ed. *Proceedings of the 19th meeting of the working group on prolamins analysis and toxicity.* Zwickau (Germany): Verlag Wissenschaftliche Scripten; 2005: 31-37.
17. Nic Phiarais B.P., Arendt E.K. Malting and brewing with gluten-free cereals. In: Arendt E.K., dal Bello F., eds. *Gluten-free cereal products and beverages.* New York (USA): Academic Press; 2008: 347-372.
18. Comino I., Real A., Gil-Humanes J., Piston F., de Lorenzo L., de Lourdes-Moreno M. *et al.* Significant differences in coeliac immunotoxicity of barley varieties. *Mol Nutr Food Res.* 2012; **56**: 1697-1707.
19. Codex document ALINORM 08/31/26. Appendix iii. Draft revised codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Rome: Codex Alimentarius Commission WHO; 2008.
20. Codex Standard 118-1979. Codex standards for gluten-free foods. Joint FAO/WHO food standards program. Rome: Codex Alimentarius Commission, WHO; 1981.
21. Kasarda D.D., Dupont F.M., Vensel W.H., Altenbach S.B., Lopez R., Tanaka C.K. *et al.* Surface-associated proteins of wheat starch granules: suitability of wheat starch for celiac patients. *J Agric Food Chem.* 2008; **56**: 10292-10302.
22. Wieser H., Seilmeier W. Determination of gliadin and gluten in wheat starch by means of alcohol extraction and gel permeation chromatography. In: Stern M., ed. *Proceedings of the 17th meeting on prolamins analysis and toxicity.* Zwickau (Germany): Verlag Wissenschaftliche Scripten; 2003: 53-57.
23. Peraeaho M., Kaukinen K., Paasikivi K., Sievaenen H., Lohiniemi S., Maeki M. *et al.* Wheat-starch-based gluten-free products in the treatment of newly detected coeliac disease: prospective and randomized study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; **17**: 587-594.
24. Kaukinen K., Salmi T., Collin P., Huhtala H., Kaerjane-Lahdesmäki T., Maeki M. Clinical trial: gluten microchallenge with wheat-based starch hydrolysates in coeliac disease patients - a randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate safety. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; **28**: 1240-1248.
25. Wieser H., Koehler P. Detoxification of gluten by means of enzymatic treatment. *J AOAC Int.* 2012; **95**: 356-363.
26. di Cagno R., de Angelis M., Lavermicocca P., de Vincenzi M., Giovannini C., Faccia M. *et al.* Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol.* 2002; **68**: 623-633.
27. di Cagno R., de Angelis M., Auricchio S., Greco L., Clarke C., de Vincenzi M. *et al.* Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol.* 2004; **70**: 1088-1096.
28. de Angelis M., Rizzello C.G., Fasano A., Clemente M.G., de Simone C., Silano M. *et al.* VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim Biophys Acta.* 2006; **1762**: 80-93.

29. di Cagno R., de Angelis M., Alfonsi G., de Vincenzi M., Silano M., Vincentini O. *et al.* Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *J Agric Food Chem.* 2005; **53**: 4393-4402.
30. de Angelis M., Cassone A., Rizzello C.G., Gagliardi F., Minervini F., Calasso M. *et al.* Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases. *Appl Environ Microbiol.* 2010; **76**: 508-518.
31. de Angelis M., Coda R., Silano M., Minervini F., Rizzello C.G., di Cagno R. *et al.* Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *J Cereal Sci.* 2006; **43**: 301-314.
32. Rizzello C.G., de Angelis M., di Cagno R., Camarca A., Silano M., Losito I. *et al.* Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol.* 2007; **73**: 4499-4507.
33. Greco L., Gobetti M., Auricchio R., di Mase R., Landolfo F., Paparo F. *et al.* Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011; **9**: 24-29.
34. di Cagno R., Barbato M., di Camillo C., Rizzello C.G., de Angelis M., Giuliani G. *et al.* Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; **51**: 777-783.
35. Loponen J., Sontag-Strohm T., Venaelaeninen J., Salovaara H. Prolamin hydrolysis in wheat sourdoughs with differing proteolytic activities. *J Agric Food Chem.* 2007; **55**: 978-984.
36. Koehler P., Wieser H. Peptidases for degradation of gluten and possible use in dietary therapy. In: Stern M., ed. Proceeding of the 24th meeting of the working group on prolamin analysis and toxicity. Zwickau (Germany): Verlag Wissenschaftliche Scripten; 2011: 95-98.
37. Marx S, Otterbach-Noae J, Langer O, Zotzel J. International patent 2008 WO 2008090126 A1 20080731.
38. Gianfrani C., Siciliano R.A., Facchiano A.M., Camarca A., Mazzeo M.F., Costantini S. *et al.* Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology.* 2007; **133**: 780-789.
39. Mazzarella G., Salvati V.M., Iaquinto G., Stefanile R., Capobianco F., Luongo D. *et al.* Reintroduction of gluten following flour transamidation in adult celiac patients: a randomized, controlled clinical study. *Clin Dev Immunol.* 2012; **2012**: 329150.
40. Metakovsky E.V., Branlard G.P., Graybosch R.A. Gliadins of common wheat: polymorphism and genetics. In: Wrigley C., Bekes F., Bushuk W., eds. Gliadin and glutenin - the unique balance of wheat quality. St. Paul (USA): AACC International; 2006: 35-84.
41. Shewry P.R., Halford N.G., Lafandra D. The high-molecular-weight subunits of glutenin. In: Wrigley C., Bekes F., Bushuk W., eds. Gliadin and glutenin - the unique balance of wheat quality. St. Paul (USA): AACC International; 2006: 143-169.
42. Juhasz A., Gianibelli M.C. Low-molecular-weight glutenin subunits: insights into this abundant subunit group present in glutenin polymers. In: Wrigley C., Bekes F., Bushuk W., eds. Gliadin and glutenin - the unique balance of wheat quality. St. Paul (USA): AACC International; 2006: 171-212.
43. Kasarda D.D., Qualset C.O., Mecham D.K., Goodenberger D. M., Strober W. A test of toxicity of bread made from wheat lacking  $\alpha$ -gliadins coded for by the 6A chromosome. In: McCarthy C.F., Fottrell P.E., eds. Perspectives in coeliac disease. Lancaster (UK): MTP Press; 1978: 55-61.
44. Ciclitira P.J., Hunter J.O., Lennox E.S. Clinical bread made from nullisomic 6A wheats patients. *Lancet.* 1980; **2**: 234-236.
45. Shewry P.R., Tatham A.S., Kasarda D.D. Cereal and coeliac disease. In: Marsh M.N., ed. Coeliac disease. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications; 1992: 305-348.
46. Frisoni M., Corazza G.R., Lafandra D., de Ambrogio E., Filipponi C., Bonvicini F. *et al.* Wheat deficient in gliadins: promising tool for treatment of coeliac disease. *Gut.* 1995; **36**: 375-378.
47. Spaenij-Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., van Veelen P., Drijfhout J.W., Jonker H., van Soest L. *et al.* Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology.* 2005; **129**: 797-806.
48. Molberg O., Uhlen A.K., Jensen T., Solheim-Flaete N., Fleck testing of in coeliac enstein B., Arentz-Hansen H. *et al.* Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: implications for celiac disease. *Gastroenterology.* 2005; **128**: 393-401.
49. van den Broeck H.C., van Herpen T.W.J.M., Schult C., Salentijn E.M.J., Dekking L., Bosch D. *et al.* Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biol.* 2009; **9**.
50. van Broeck H.C., Gilissen L.J.W.J., Smulders M.J.M., van der Meer I.M., Hamer R.J. Dough quality of bread wheat lacking  $\alpha$ -gliadins with celiac disease epitopes and addition of celiac-safe avenins to improve dough quality. *J Cereal Sci.* 2011; **53**: 206-216.
51. van den Broeck H., Hongbing C., Lacaze X., Dusautoir J.C., Gilissen L., Smulders M. *et al.* In search of tetraploid wheat accessions reduced in celiac disease-related gluten epitopes. *Mol Biosyst.* 2010; **6**: 2206-2213.
52. van den Broeck H.C., de den Jong H.C., Salentijn E.M.J., Dekking L., Bosch D., Hamer R.J. *et al.* Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed in increased prevalence of celiac disease. *Theor Appl Genet.* 2010; **121**: 1527-1539.
53. Vincentini O., Maialetti F., Gazza L., Silano M., Dessi M., de Vincenzi M. *et al.* Environmental factors of celiac disease: cytotoxicity of hulled wheat species *Triticum monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* and *T. aestivum* ssp. *spelta*. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; **22**: 1816-1822.
54. Carroccio A., di Prima L., Noto D., Fayer F., Ambrosiano G., Villanacci V. *et al.* Searching for wheat plants with low toxicity in celiac disease: between direct toxicity and immunologic activation. *Dig Liver Dis.* 2011; **43**: 34-39.

55. van Herpen T.W.H.M., Goryunova S.V., van der Schoot J., Mitreva M., Salentijn E., Vorst O. *et al.* Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*. 2006; **7**.
56. Mitea C., Salentijn E.M.J., van Veelen P., Goryunova S.V., van der Meer I.M., van den Broeck H.C. *et al.* A universal approach to eliminate antigenic properties of  $\alpha$ -gliadin peptides in celiac disease. *PLoS One*. 2010; **5**: e15637.
57. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; **391**: 806-811.
58. Becker D., Wieser H., Koehler P., Folck A., Muehling K.H., Zober C. Protein composition and techno-functional properties of transgenic wheat with reduced  $\alpha$ -gliadin content obtained by RNA interference. *J Appl Bot Food Qual*. 2012; **85**: 23-33.
59. van Herpen T.W.J.M., Riley M., Sparks C., Jones H.D., Gritsch C., De Koning E.H. *et al.* Detailed analysis of the expression of an alpha-gliadin promoter and the deposition of alpha-gliadin protein during wheat grain development. *Ann Bot*. 2008; **102**: 331-342.
60. Gil-Humanes J., Piston F., Hernando A., Alvarez J.B., Shewry P.R., Barro F. Silencing of  $\gamma$ -gliadins by RNA interference 34 (RNAi) in bread wheat. *J Cereal Sci*. 2008; **48**: 565-568.
61. Gil-Humanes J., Piston F., Tollefson S., Sollid L.M., Barro F. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; **107**: 17023-17028.
62. Stoven S., Murray J.A., Marietta E.V. Latest *in vitro* and *in vivo* models of celiac disease. *Expert Opin Drug Discov*. 2013; **8**: 445-457.
63. Rashtak S., Murray J.A. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012; **35**: 768-781.
64. Gilissen L.J.W.D., van Meer J.M., Smulders M.J.M. Beyond toxicity. In: Fasano A., Troncone R., Branski D., eds. *Frontiers in celiac disease*. Basel (Switzerland): Karger; 2008: 139-147.
65. Tanner G.J., Howitt C.A., Forrester R.I., Campbell P.M., Tye-Din J.A., Anderson R.P. Dissecting the T-cell response to hordeins in celiac disease can develop barley with reduced immunotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; **32**: 1184-1191.