

牛乳ムチンの生理機能評価

岐阜大学農学部 生物資源利用学科 教授 金丸 義 敬

I. 研究目的

研究の背景 牛乳は、市乳や加工乳、及び種々の乳飲料の製造に不可欠である一方、チーズやバター、ヨーグルトをはじめとする畜産食品ばかりでなく、製パンや製菓など多方面の食品製造にも利用されている最も重要な畜産資源の一つである。牛乳に含まれるタンパク質成分もまた、それらの乳化性、起泡性、ゲル形成などの物理的機能を中心とする食品加工上の有用性に基づいて多面的に利用されている。同時に、そのような食品加工上の牛乳タンパク質の利用性についての研究がこれまで数多く行われてきた結果、数々の利点が明らかにされ、牛乳の需要の広がりにも役立ってきている。しかしながら、乳牛の泌乳量がきわめて高いレベルを維持することが出来るようになってきている一方で、わが国の牛乳の消費はあまり拡大されてはいないのが現状である。これは、米や大豆、あるいは魚介類を中心とするわが国の食文化の伝統から、動物性食品材料としての牛乳を食生活の中心に据えるようなかたちで消費拡大を図ることがきわめて困難であるという理由による。このようなわが国の食生活上の特徴を考慮しながら、なおかつ牛乳の需要を拡大するための方策の一つは、カゼインのみならず、乳清タンパク質などの分離可能な牛乳タンパク質について、食品加工とは異なる新しい視点からの有用性を明らかにすることで、牛乳の価値をより一層明確にしていくことであろう。

そのような牛乳の消費拡大を目指すための新しい視点として大きな可能性を秘めているのは、近年注目されるようになってきている食品の生体調節機能における牛乳タンパク質の有用性である。すなわち、乳における本来の生理機能に立脚した生体調節機能に基づく機能性食品素材としての牛乳の有用性を明らかにすることであり、すでに多数の研究がこのような観点から精力的に行われ、いくつかの牛乳タンパク質の生理機能が評価されている。しかしながら、これまでに見い出された生理機能の多くは実際に体内で発揮されるかどうかという最も重要な点で疑問視されるものが多く、機能性食品素材としての牛乳の再評価につながったものは多くない。

ところで、これまでほとんど知られていない牛乳タンパク質に高分子量ムチン様糖タンパク質(ミルクムチン)がある。ミルクムチンは、乳に含まれるムチン型糖鎖を結合した巨大な糖タンパク質会合体であり、歴史的には人乳で早くからその存在が知られ、これまでPEM、NPGP、episialin、HMGP等のさまざまな名称で呼ばれてきたものである。人乳ムチンは乳がん関連抗原構造を発現するから、主として医学分野の研究者達から注目され、乳腺細胞のがん化に伴うミルクムチンの抗原構造の変化を明らかにしようとする研究や、乳がん検診のためのがん特異的モノクローナル抗体の作製を目的とする多数の研究が行われてきている。一方で、この人乳ムチンは病原ウイルスや細菌の増殖を強力に阻害する作用を持つことや、動物細胞の増殖を制御する機能を持つことも報告されている多機能性の

糖タンパク質であり、母乳の固有な生体防御機能と密接に関連していることが指摘されている。われわれは、この人乳ムチンと類似の性質を示す成分が牛乳中にも存在していることを初めて明らかにし、また、抗病原微生物作用や抗がん作用などの生体防御機能の面でも類似した多機能的な性質を示すことを明らかにしつつある。そのような多機能性の生体防御作用を持つタンパク質としてはよく知られているラクトフェリン(Lf)があるが、牛乳ムチンは結合糖鎖を介して種々の生理機能を発揮すると考えられる点で、Lfとはまったく異なる新しい可能性を持つ牛乳タンパク質であると云える。このような牛乳ムチンが示す潜在的な生理機能の有用性を明らかにすることは、牛乳の利用拡大につながる重要な研究課題の一つであると考えた。

研究目的 本研究は、牛乳ムチンの生理機能の有効性を、培養細胞系と動物実験系とを用いて、以下の諸点について詳細に評価することを直接の目的としている。

- 1) 抗ウイルス作用：乳飲みマウスに経口投与した際のヒトロタウイルス感染に対する阻害作用について、他の感染阻害剤と比較することによって、ウイルス経口感染予防剤としての能力をin vivoで評価するとともに、動物培養細胞を用いて感染阻害作用のメカニズムをin vitroで解析する。
- 2) 抗がん作用：経口投与した際の坦がんマウスの腫瘍退縮作用について、すでにその作用が明らかにされているカワラタケ抽出物であるPSKなどと比較することによって、経口抗がん剤としての能力をin vivoで評価するとともに、培養がん細胞の増殖阻害作用のメカニズムをin vitroで解析する。
- 3) 血清コレステロール低下作用：ラットに経口的に投与した際の血清コレステロール値の低下作用について、すでにその作用が明らかにされている大豆タンパク質などと比較することによって、コレステロール上昇抑制剤としての能力をin vivoで評価するとともに、腸培養細胞を用いて食事性コレステロールの吸収抑制作用についてin vitroで解析する。
- 4) 成長促進作用：ラットに経口的に投与した際の体重増加促進作用について、すでにその作用が示されているブタの胃ムチンなどと比較することによって、成長促進剤としての能力をin vivoで評価するとともに、腸培養細胞の増殖促進作用についてin vitroで解析する。

II. 研究結果

1. 牛乳ムチンの調製とそのタンパク質化学的特徴

計画の概要：分画分子量100万の膜を装着した限外ろ過により乳清タンパク質を分画・濃縮後、Sephacryl S-300カラムを用いたゲルろ過を繰り返し、void容に溶出する高分子量の糖タンパク質画分(F1)として牛乳ムチンを調製し、タンパク質化学的な特徴付けを行う。

結果：3-15%グラジエントゲルを用いて牛乳の乳清タンパク質をSDS-PAGEで分析すると、 α -ラ

クトアルブミン(α -LA)や β -ラクトグロブリン(β -LG)はゲルの下端に泳動される(結果は図示していない)。これらの主要タンパク質を含まない微量な牛乳乳清タンパク質を濃縮した場合どのような機能が認められるかに興味があった。そこで、 α -LAや β -LGの除去を検討した。

遠心分離によって脱脂した牛乳から定法に従ってカゼインを沈殿させて酸ホエーを得た。これをpH6.0に調整後、膜処理した。すなわち、分画分子量100万のUF膜を使って濃縮、ダイヤフィルトレーションを行い、この処理で保持されたタンパク質を凍結乾燥し、高分子量タンパク質濃縮物とした。図1に牛乳からの高分子量タンパク質濃縮物(HWPC)調製の概略を示した。

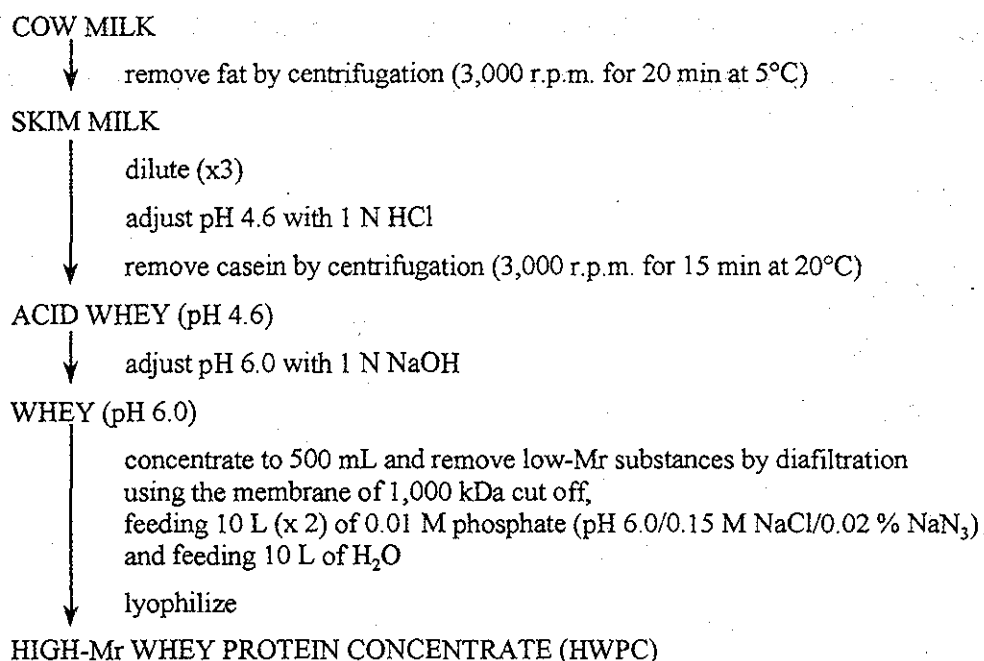


図1. 牛乳からの高分子量ホエータンパク質濃縮物(HWPC)調製の流れ図

SDS-PAGE分析やHPLC分析から(結果は図示していない)、得られたHWPCは α -LAや β -LGを含まず、高分子量のタンパク質成分が分画されている事が確認された。HWPC中では、糖タンパクとしてLfやFSC以外にIgMがゲルの上端に、ラクトフォリン(Lph)がゲルの下端に認められるようになった。さらに、Lfよりかなりゆっくり移動する150~180kDaの分子量を持つPAS-Iや約120kDaの分子量を持つ成分(120Kと呼ぶ)、Lfよりわずかに遅く移動する成分である80kDaのPAS-IVが糖含量の高い成分として極めて明瞭に検出されるようになり、人乳とはかなり異なるプロフィールをもつことが明らかとなった。また、この条件ではゲルに侵入できないような成分も存在している可能性が考えられることから、より大きなポアをもつ1.5%アクリルアミドと1%アガロースの混成ゲルによる分析も行っている(結果は図示していない)。すでに明らかにしているように、ゲルの先端付近に泳動される極めて高分子量の成分がHWPC中に存在していることが認められた。

このような図1に従って調製したHWPCを、さらにSephacryl S-300のゲルろ過によって分画した。従来このステップはSephacryl S-300を用いていたが、より迅速な分離を第一条件とするために高流

速の得られるゲルを使用した。その結果を図2に示した。溶出ピークに従って四つの画分を得た。SDS-PAGE分析(結果は図示していない)により、LfはBSAやその他の比較的低分子量の成分とともに最後に溶出するピーク中に見いだされた。IgGは最後から二つ目のピーク、また、最後から三番目のピーク中にはIgMとともにLphが主に検出された。一方、最初に溶出した非常に高分子量の画分であるF1には主としてPAS-I、120KやPAS-IVが含まれ、IgM、IgA、IgGといった免疫グロブリンやLfやBSAなどの主要な牛乳乳清タンパク質は α -LAや β -LGとともに、この画分には含まれないことが明らかにされた(図4参照)。また、従来の主要成分以外にもSDS-PAGE/PAS染色の方法によって明瞭に検出されるいくつかの糖タンパク質が牛乳乳清中に存在すること、しかもそれらの成分は通常のゲルろ過条件では極めて高分子量のピークに溶出され、いずれも巨大な構造体として存在していることが示された。われわれはこのF1を牛乳ムチンと呼ぶことにし、さらに検討を加えた。

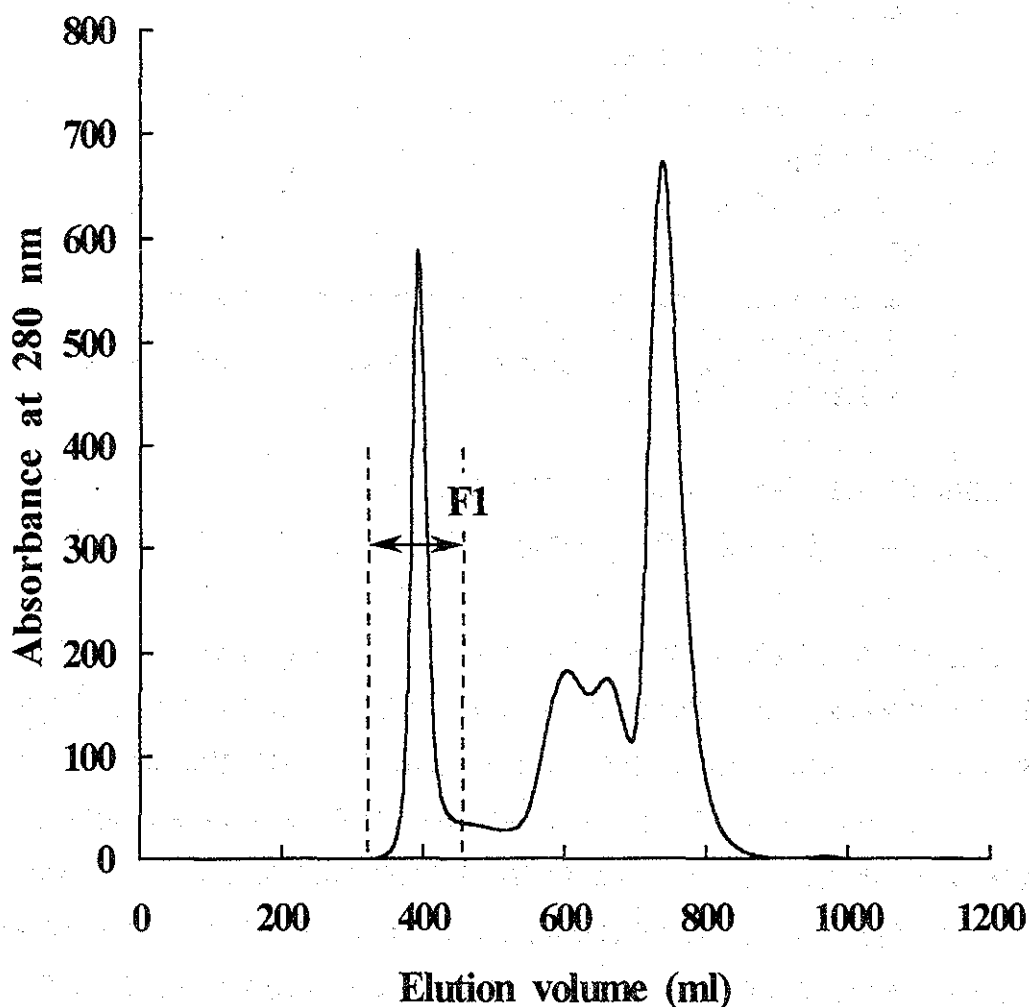


図2. Sephacryl S300ゲル濾過によるHWPCの分画。HWPC 2gを45mlの0.05M Tris-HClバッファー(pH8.0)に溶解し、40mlをカラムにアプライした。流速は540ml/hrで溶出した。

F1は通常のバッファー条件によるゲルろ過ではさらに進んだ分画は困難である。そこで、0.1% SDS含有バッファー中でのSepharose 6Bによる分画を試みた。図3に示したように、SDS存在下でも

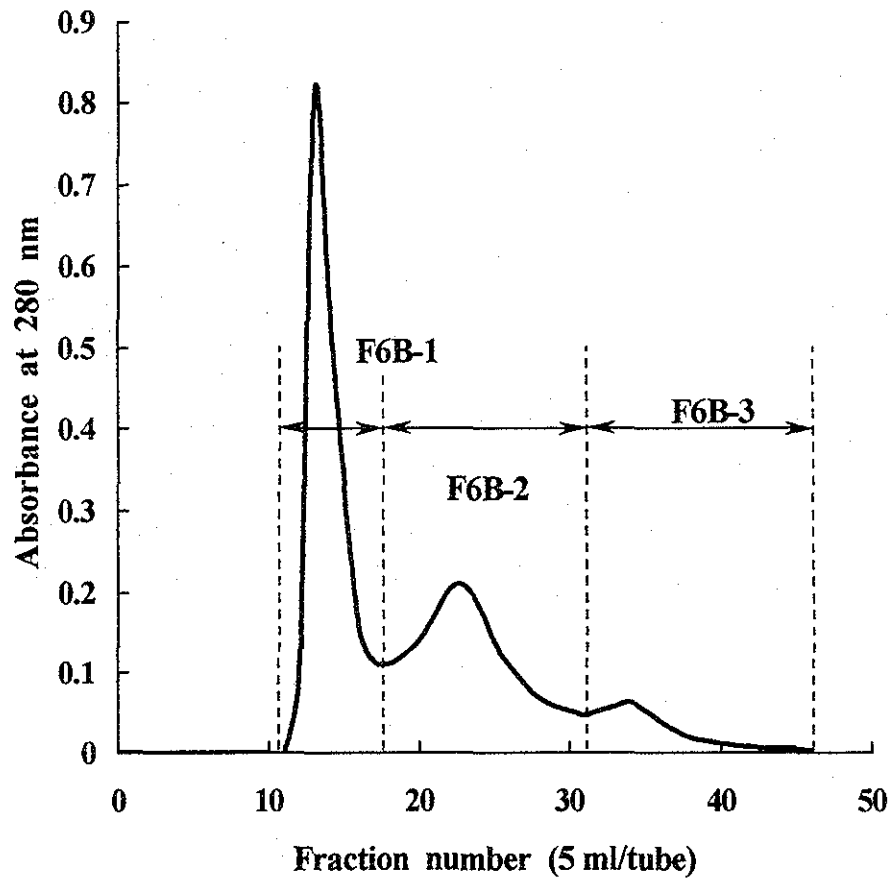


図3. SDS含有バッファーを用いたSepharose CL-6Bゲル濾過におけるF1の分画。100mgのF1を0.1%SDSを含む0.1Mリン酸バッファー(pH7.8) 6 mlに溶解し、カラムにアプライした。流速は20ml/hrで溶出し、5 mlずつ分取した。

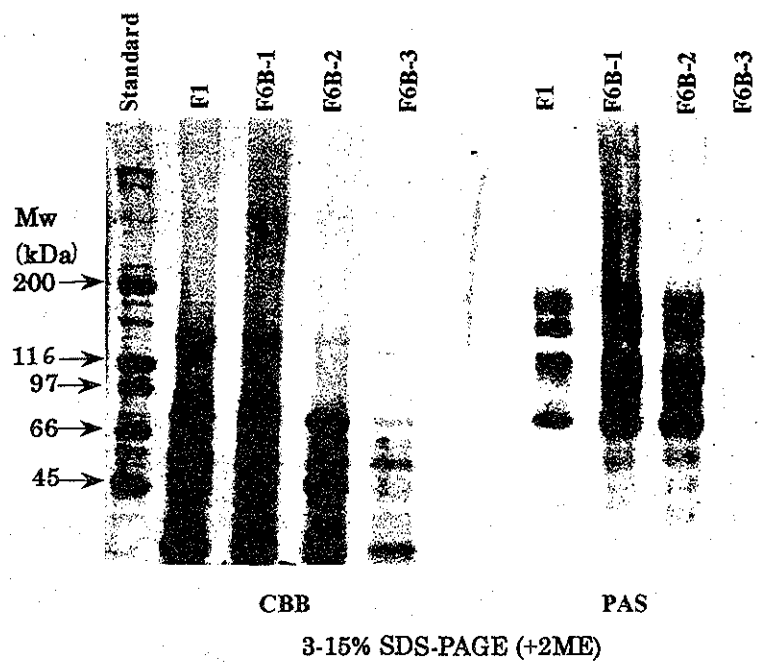


図4. F1とそのSepharose CL-6B分画物のSDS-PAGE。3-15%ポリアクリルアミドグラディエントゲルを用いた。電気泳動は30mAの定電流で行い、ゲルはCBBおよびPASで染色した。サンプルは5%メルカプトエタノール添加のサンプルバッファーに溶解し、5分間煮沸した。

解離が難しい成分による大きなピーク (F6B-1) がvoid容に見られ、それに引き続いて溶出するF6B-2とF6B-3の分画物を得た。これらの画分にはどのような成分が含まれているかをSDS-PAGEによって分析した(図4)。F6B-1にはタンパク質として約80kDaと55kDa、それにゲルの下端付近に主要な染色が、また、糖タンパク質としてはPAS-I、120K、そしてPAS-IVが検出された。F6B-2ではF6B-1とほぼ同様の泳動パターンが見られたが、約80kDaと45kDaの成分、それにゲルの下端に主として染色が認められた。これに対して、F6B-3ではいずれの染色においても特に目立つバンドは認められなかったが、タンパク質として約80kDa、65kDa、55kDaとゲルの下端に染色が認められた。F6B-3では糖タンパク質も80kDa付近に極めてわずかに確認されたのみであった。

同様のSDS含有バッファーを用いてSephacryl S-200のゲルろ過でF1を分画した結果を図5に示した。この場合、主要なピークはvoid容に認められ、他のピークの溶出は明瞭ではなかったが、図示したように四つの画分をそれぞれ集めて、成分分析を行った。10~20%ポリアクリルアミドグラデ

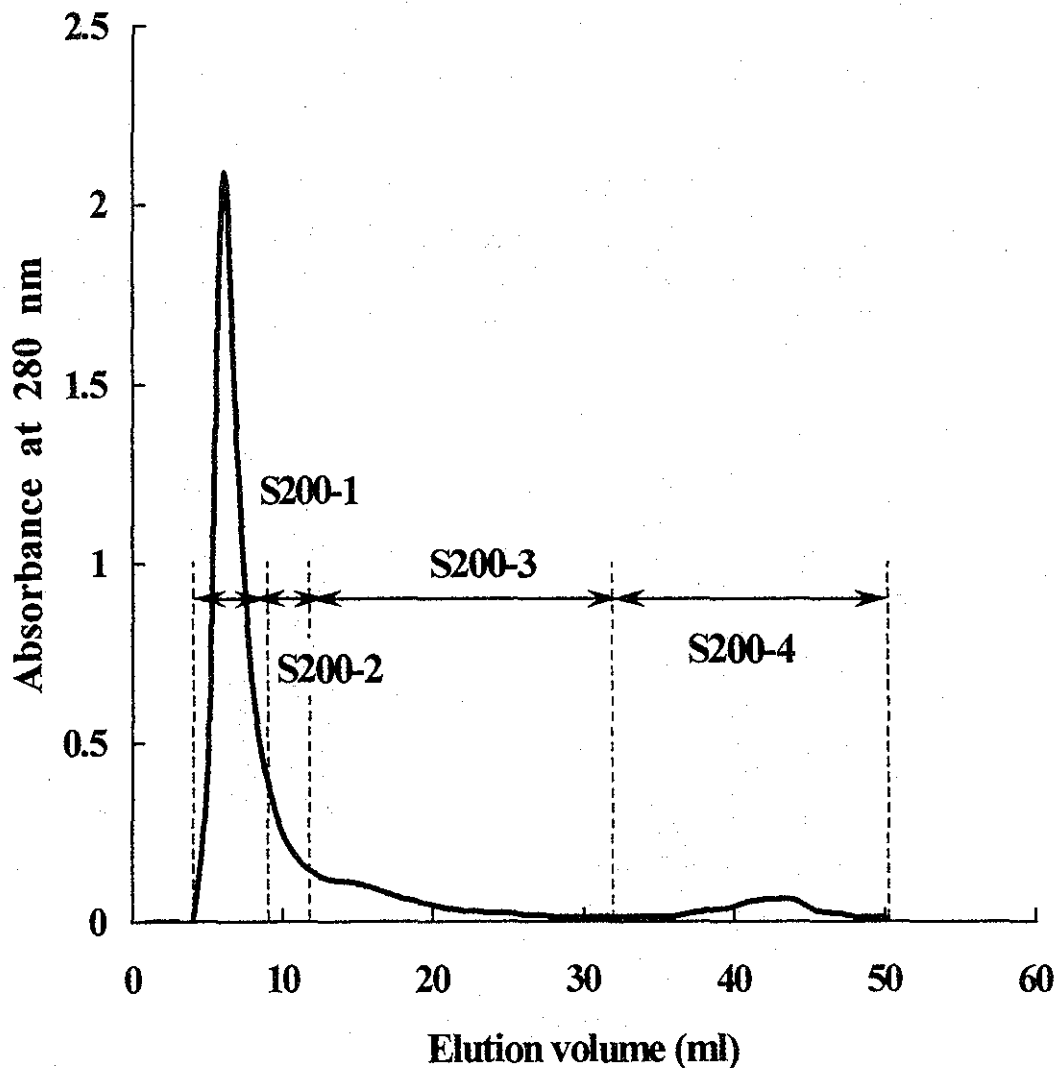


図5. SDS含有バッファーを用いたSephacryl S200ゲル濾過によるF1の分画。100mgのF1を0.1%SDSを含む0.1Mリン酸バッファー(pH7.8)10mlに溶解し、カラムにアプライした。流速は72ml/hrで溶出し、2mlずつ分取した。

イエントゲルを用いたSDS-PAGEによる分析結果が図6である。Void容ピークであるS200-1とそのすぐ後に溶出したS200-2はほとんど同じ染色パターンを示し、これらの画分はほぼ同様の成分を含んでいることが示された。両者とも、タンパク質として80kDa、55kDa、30kDaと20kDaのバンドが分離され、80kDaと30kDaのバンドが最も顕著であった。一方、PAS染色は80kDa以上の領域で極めて顕著であり、主要な糖タンパク質としてPAS-I、120K、PAS-IVがこの部分で複数のバンドとして染色を受けていると考えられた。S200-3では約20kDaの成分がタンパク質バンドとして極めて顕著に検出され、この成分はPAS染色によっても強く染色された。また、S200-4では20kDa以下に二本のタンパク質バンドが認められたが、PAS染色では検出される成分は認められなかった。

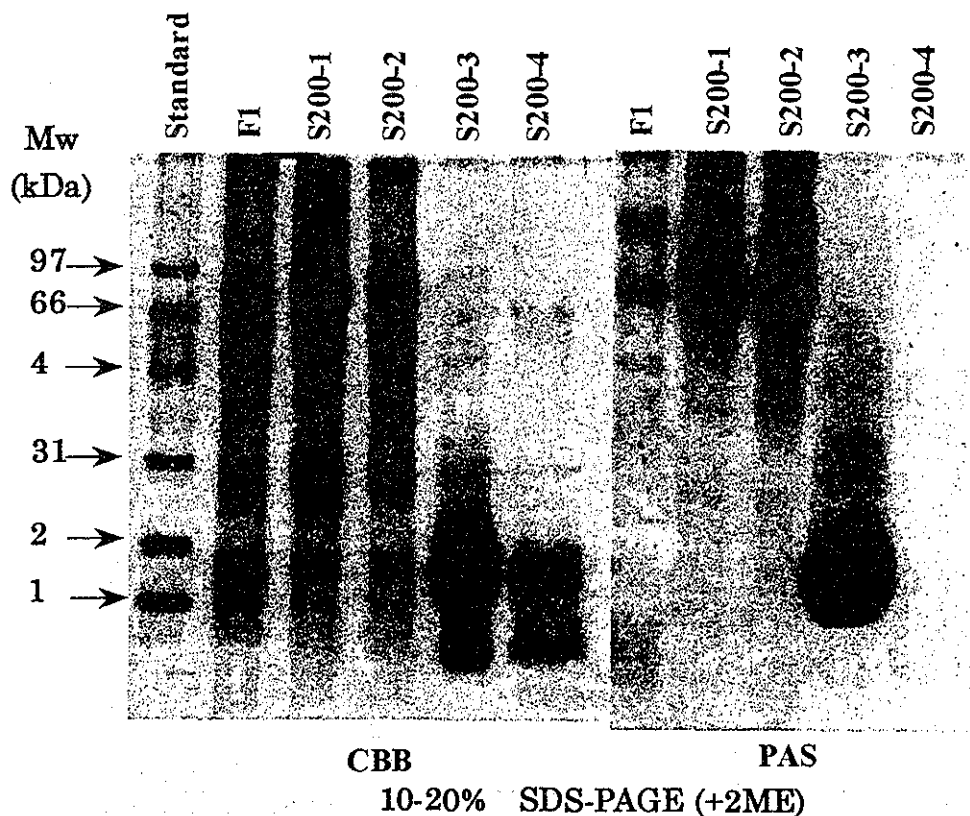


図6. F1とそのSephacryl S200分画物のSDS-PAGE。10-20%ポリアクリルアミドグラディエントゲルで分離した。電気泳動は30mAの定電流で行い、ゲルはCBBおよびPASで染色した。サンプルは5%メルカプトエタノール添加のサンプルバッファーに溶解し、5分間煮沸した。

Sephacryl S-200分画物のHPLCゲルろ過分析の結果を図7に示した。分画前のF1は保持時間13分のvoid容に明瞭なピークを持ち、引き続き15分付近に肩を示す溶出パターンを示した。このF1からSephacryl S200のvoid容画分として得られたS200-1はF1と同様にG5000PW_{XL}ゲルろ過でもvoid容にピークを示したが、これとともに保持時間18分付近を中心とした広い範囲に広がるピークの溶出が見られた。S200-2の溶出パターンはS200-1と類似していたが、void容ピークが顕著でその後の広範囲に溶出するピークはそれほど顕著には認められなかった。すなわち、これらの画分にはSDSによって

も解離が困難な高分子量の成分が含まれていることが示唆された。S200-3は保持時間23分付近に極めて明瞭なピークを持っていたが、void容にピークの溶出は認められず、この画分に含まれる成分は本来低分子量であるが、F1では他の高分子量成分と会合していることが推測された。最も低分子量の画分としてF1から分画されたS200-4の溶出パターンは予期しなかったものである。すなわち、S200-3が保持時間23分にピークを示したことから、それにより長い保持時間にピークの溶出が予想されたが、実際のピークはvoid容である13分となった。すなわち、S200-4に分画された成分はSDS存在下で低分子量成分に解離するが、通常のバッファー条件下では極めて高分子量の会合体となっていると考えられる。

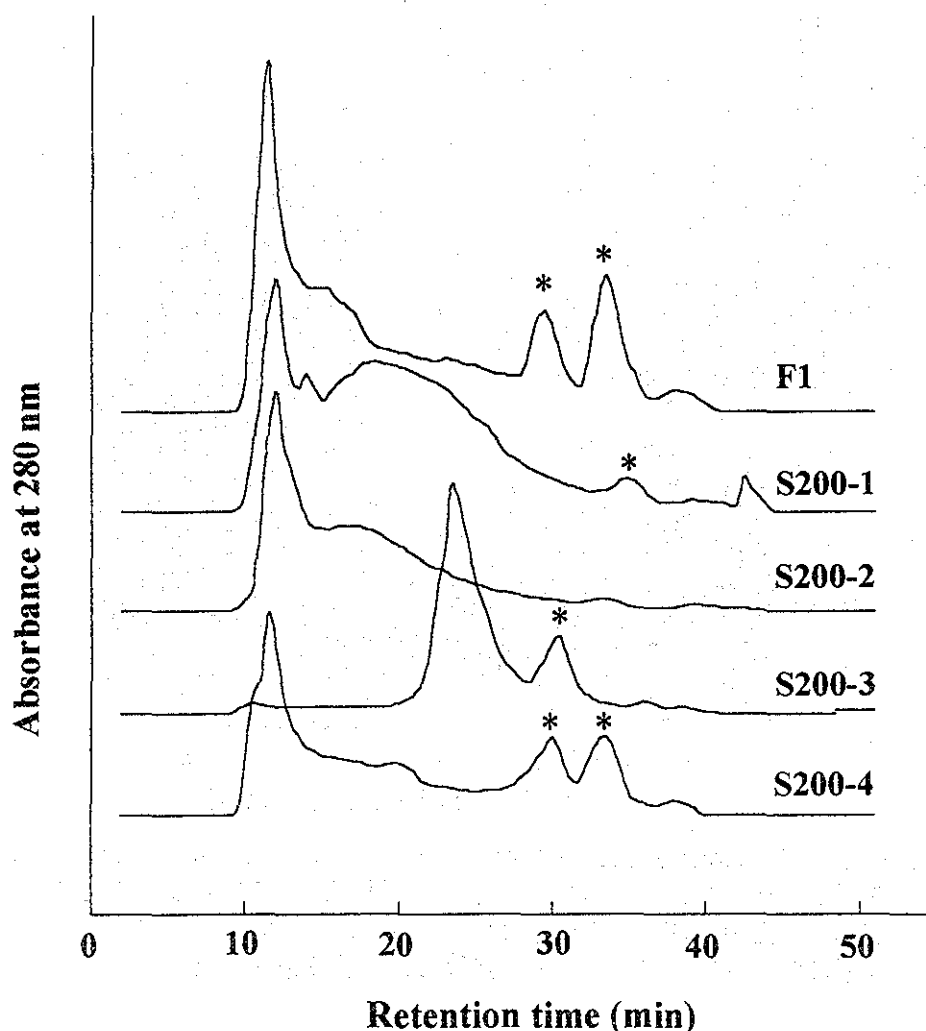


図7. Sephacryl S200ゲル濾過で得られたF1分画物のHPLC溶出パターン。カラムはTSK gel G5000PW_{XL}を使用した。溶出バッファーには0.1MのNa₂SO₄を含む0.05Mのリン酸バッファー(pH6.0)を用い、流速0.4 ml/minで溶出した。保持時間13分に見られるものがvoid容のピークである。*を付したピークはサンプルに混入した低分子塩類によるものと思われる。

以上の分析結果を総合すると、F1のプロフィールとして現在のところ次のようにまとめることが

出来る。

- ①F1には多様なタンパク質や糖タンパク質成分が含まれている。
- ②F1の最も主要なタンパク質バンドは80kDaに認められる。
- ③F1では15~18kDaのPAS-I、120kDaの120K、それに80kDaのPAS-IVが極めて顕著な糖タンパク質成分として含まれている。
- ④牛乳乳清中、あるいは通常のバッファー条件では、それらのほとんどは何らかのメカニズムで高分子量会合体を形成し、F1として分画される。
- ⑤SDS含有バッファー中で比較的高分子量画分に分画されるPAS-I、120K、PAS-IVの糖タンパク質がF1中に最も豊富な成分と考えられ、我々はこれを牛乳ムチンと呼んだ。

2. 抗ウイルス作用

1) マウスを用いた牛乳ムチンのヒトロタウイルス感染阻害作用の評価

計画の概要：妊娠14日目のBALB/cマウスを飼育して分娩に到らせる。母マウスとともに子マウスを5日間飼育後、一腹の子マウスを一群として、ウイルス感染させ、あらかじめ投与した牛乳ムチンの効果を観察する。すでに明らかにされているウイルス特異抗体のものと比較することによって、牛乳ムチンのウイルス経口感染予防効果を評価する。

結果：表1に投与実験の結果をまとめた。実験では濃度10mg/mLのF1を50 μ Lウイルスチャレンジの3時間前と1時間前にあらかじめ投与し、下痢発症予防効果について4日間検討した。

表1. F1の経口投与がヒトロタウイルスの下痢発症に与える影響

	1 day		2 day		3 day		4 day	
	d	s	d	s	D	s	d	s
Control (n = 8)	5 (62%)	2 (25%)	5 (63%)	0	6 (86%)	0	5 (71%)	2 (29%)
(n = 9)	7 (78%)	2 (22%)	8 (89%)	0	9 (100%)	0	9 (100%)	0
3 h before challenge (n = 5)	2 (40%)	1 (20%)	5 (100%)	0	5 (100%)	0	2 (40%)	3 (60%)
1 h before challenge (n = 7)	3 (43%)	0	5 (71%)	1 (14%)	5 (71%)	2 (29%)	6 (86%)	2 (29%)
1 h before challenge (n = 6)	4 (67%)	0	6 (100%)	0	6 (100%)	0	6 (100%)	0
1 h before challenge (n = 6)	3 (50%)	1 (17%)	5 (83%)	1 (17%)	6 (100%)	0	6 (100%)	0

d は diarrhea (下痢) を、s は soft stool (軟便) を示す。

F1 (10 μ g/mL) 50 μ L をウイルスチャレンジの1時間か3時間前に経口投与した。

いずれの投与群でもコントロール(等量のMEMをチャレンジの1時間前に経口投与した)と同様下痢の発症が見られ、この条件ではin vivoの感染予防効果は認められなかった。以降のin vitroの実験結果に述べているが、有効成分はF1中に微量に存在するものであるらしいので、今後は有効成分を出来るだけ純粋に取り出したものを用いてin vivoの実験を繰り返すことで、良好な結果が得られるものと考えている。

2) 腸培養細胞を用いた牛乳ムチンのヒトロタウイルス感染阻害作用機作の解析

計画の概要：ウイルスの宿主用としてサルの腎臓由来の細胞株であるMA104を培養し、感染阻害活性(中和活性)測定に用いる血清型1、2、3、4のヒトロタウイルス、Wa、KUN、MO、Hochiのそれぞれを感染させ、ストックウイルスとする。各血清型のヒトロタウイルスについて、牛乳ムチン及びその細分画標品の中和活性を測定し、また、ノイラミニダーゼやプロテアーゼ処理試料の活性を測定することにより、牛乳ムチンのヒトロタウイルス感染阻害作用のメカニズムを解析する。

結果：ヒトロタウイルスのin vitroの増殖阻害活性の測定法を図8に模式的に示した。今回の実験ではヒトロタウイルスWa株(血清型1)を用いた。トリプシンで30分間処理してウイルスを活性化した後、適当な濃度に希釈してマイクロプレートに移し、そこで用意しておいた種々の濃度の試料と混合し、30℃で一時間インキュベートした。これを宿主であるサルの腎臓細胞のMA-104と混合して、さらにスライドグラス上に移した。37℃で65時間インキュベートした後、アセトンで固定し、感染細胞を蛍光抗体で検出し、その数を蛍光顕微鏡でカウントした。

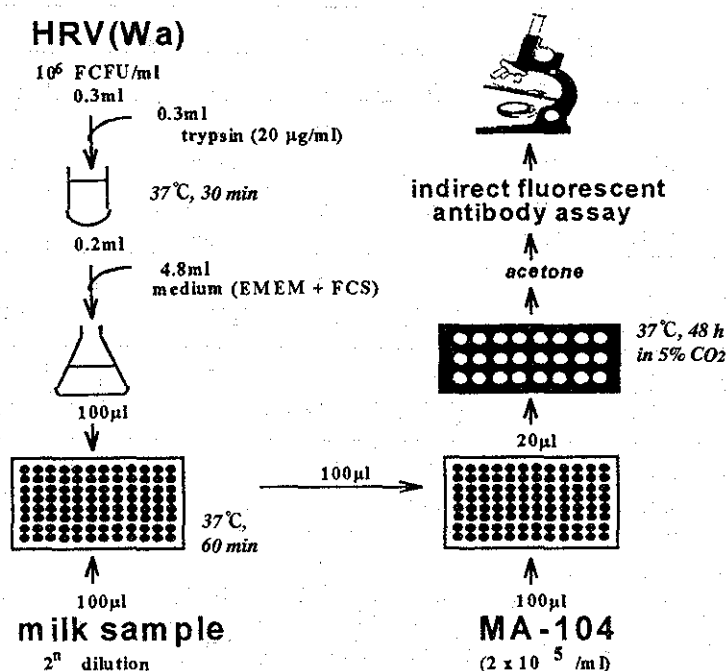


図8. ヒトロタウイルス感染阻害試験(中和試験)の概略

なお、活性は最少阻害濃度 (minimum inhibitory concentration、MIC) で表した。これは試料とインキュベートしたウイルスが示す感染細胞数と未処理のコントロールウイルスの感染細胞数を比較し、感染細胞数がコントロールの50%以下に減少した場合を中和活性ありと判断し、そのような中和活性を示す最も低い試料濃度を示している。この濃度が低ければ低いほど活性は高いことになる。

このような方法を用いて、他の糖タンパク質との比較の下に、牛乳ムチンのin vitroでの抗ロタウイルス活性について調べた結果を表2に示す。

表2. ヒトロタウイルスとウシロタウイルスに対する種々の糖タンパク質の中和活性

Glycoprotein	Wa	KUN	MO	NCDV
bovine F1 ¹⁾	17 ± 1	15	18 ± 4	120 ± 0
human F1 ¹⁾	23 ± 2	25	12 ± 0	ND
MFGM ²⁾	358 ± 129	ND	404 ± 52	ND
BSGM ³⁾	> 374	ND	561 ± 187	73 ± 0
PSM ⁴⁾	—	ND	—	—
OVM ⁵⁾	378 ± 3	ND	375 ± 0	281 ± 94
Glycophorin ⁶⁾	—	ND	—	< 50

1) Sepharose CL-2B void volume fraction of milk whey (see text).

2) Bovine milk fat globule membrane

3) Bovine submaxillary gland mucin (Sigma Chemical Co.)

4) Porcine stomach mucin (Sigma Chemical Co.)

5) Ovomucin (Taiyo Chemical Co.)

6) Purchased from Sigma Chemical Co.

表2の結果から、牛乳ムチンであるウシのF1がヒトのF1とともに、ヒトロタウイルスに対して強力な感染阻害作用を持つ事が示された。この活性は動物ロタウイルスに対して強い活性を持つとされるウシ顎下腺ムチンやオボムチンなどと比べてはるかに強力なものである。一方、ウシロタウイルスのNCDV株に対して牛乳ムチンはヒトロタウイルスに対する活性と比べて顕著な作用を示さず、ヒトロタウイルスと動物ロタウイルスの感染メカニズムには報告のような相当の違いがあることと一致した結果となった。

こういった牛乳ムチンの活性がどういった成分に起因しているのかを調べるために、SDS含有バッファーを用いたゲルろ過で分画したF1画分の活性について検討した。その結果を図9と10に示した。

Sepharose CL-6Bのゲルろ過で得たF6B-2~F6B-3の画分について、透析によってSDSを除き、凍結乾燥後、ヒトロタウイルスWa株に対する中和活性を調べた結果が図9である。この実験では、F1のMICの値が74.8µg/mLと、表1のほぼ3倍の値となっている。これは、より明確な結果をもたらすようにコントロールの感染細胞数が150近辺と、表2に結果を示した実験と比較して約3

倍となるように接種ウイルスを増やしたことが理由であり、F1自体の活性の低下を示すものではない。最初に溶出したF6B-1の活性がもとのF1のものより低下し、強力な活性成分はこの画分には含まれないものと考えられた。一方、強力な活性がF6B-2とF6B-3に認められた。特に、F6B-3の活性は16.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と、人乳のF1に比較しても非常に高いことが明らかとなった。この結果は、当初予想していたように活性の本体がF1中の主要な糖タンパク質であるPAS-I、PAS-IV、あるいは120Kによるものではなく、それらより低分子量の成分によるものであることを強く示唆した。

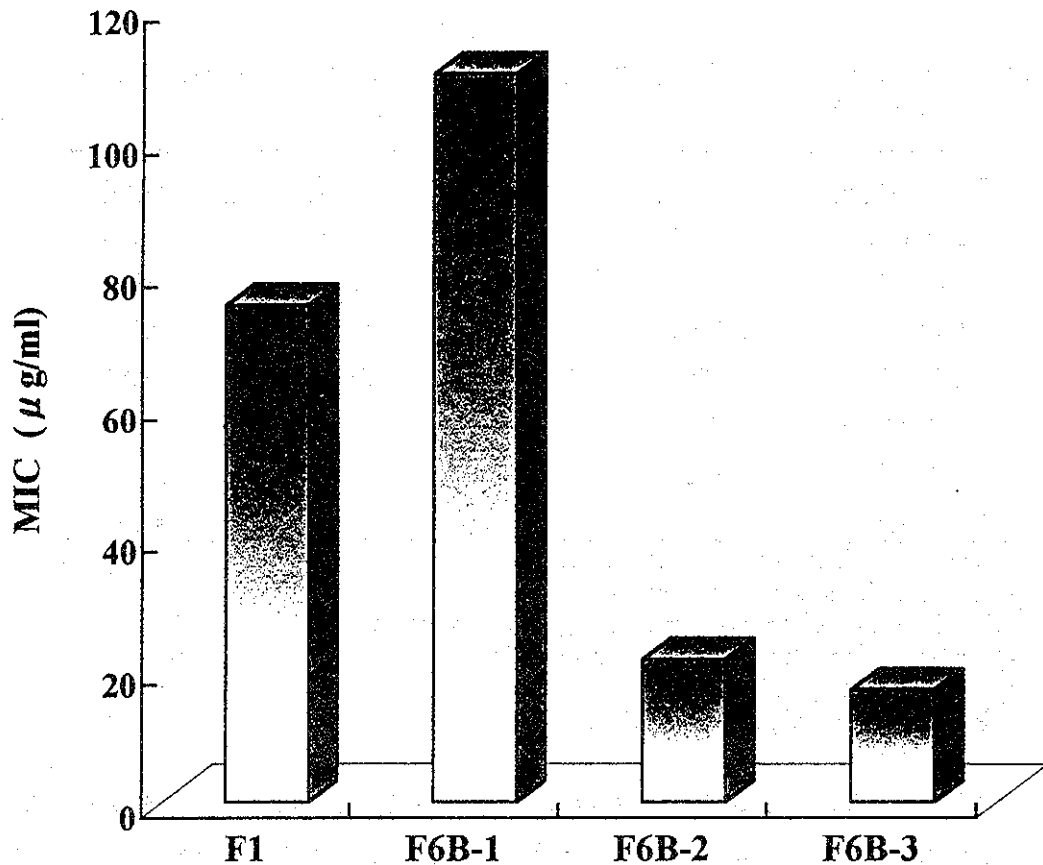


図9. Sepharose CL-6B分画物の抗ヒトロタウイルス活性の比較。中和活性試験では、ヒトロタウイルス Wa 株と各サンプルを37°Cで30分間混合した後、MA-104細胞に接種し、65時間インキュベートした。これをアセトンで固定した後、間接蛍光抗体法で感染細胞数を測定した。コントロールと比較して感染細胞数が50%となるサンプル濃度を最小阻害濃度(MIC)として表した。

そこで、SDS含有バッファーを用いてSephacryl S-200のゲルろ過によってF1から分画した画分のヒトロタウイルスWa株に対する中和活性を調べてみた。その結果が図10である。F1に比べてS200-1は活性が低下し、F6B-1とはほぼ同様の傾向を示したことから、図6のSDS-PAGEの結果をあわせて考えると、PAS-IやPAS-IV、それに120KといったF1の主要な糖タンパク質は活性には関与しないと結論付けられる。図9の結果を確認しているのが最も低分子量の画分であるS200-4に強力な活性が見出されたことである。その活性は5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とF1に比べ約15倍と極めて強力なものであった。SDS-PAGE(図6)からこの分画に含まれる成分は20kDa以下のバンドを示している。

また、HPLCゲルろ過ではSDSを除くとこの画分は極めて高分子量のピークに現れることから(図7)、F1中のヒトロタウイルス感染阻害活性成分は20kDaより小さな分子量を持つタンパク質で、通常は非共有結合によって会合し、巨大成分として存在しているものと考えられる。

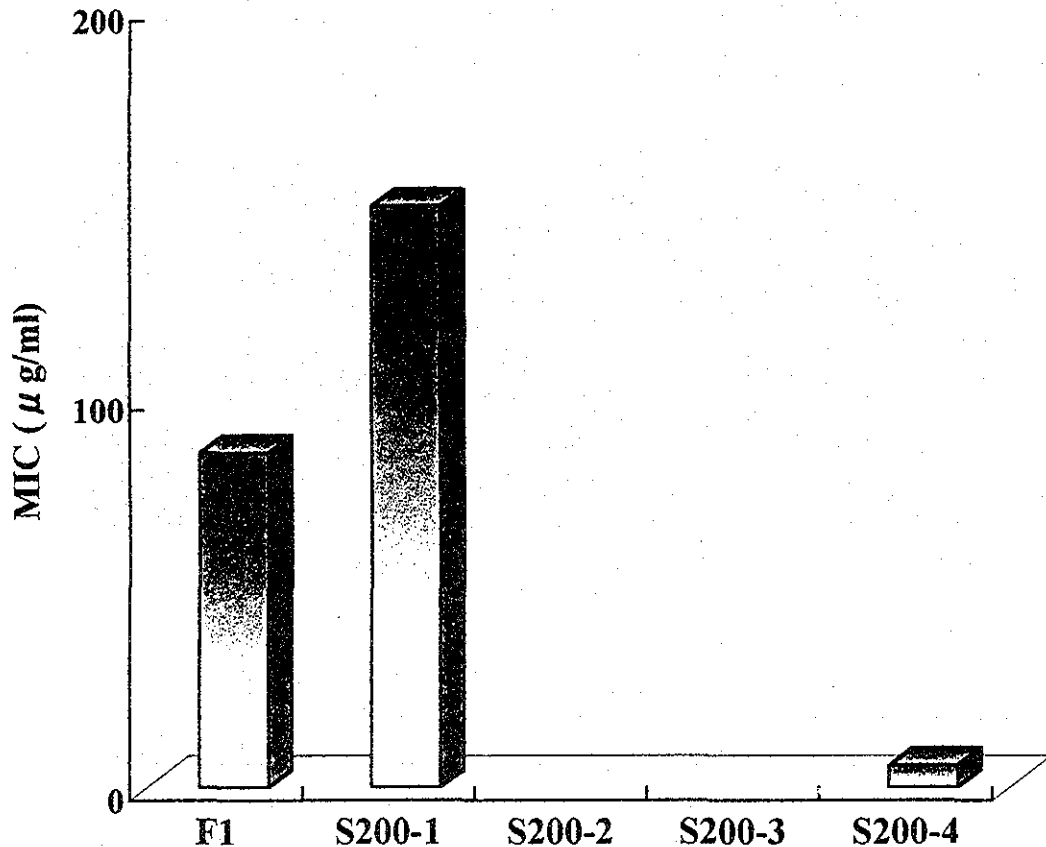


図10. Sephacryl S200分画物の抗ヒトロタウイルス活性の比較。中和活性試験では、ヒトロタウイルスWa株と各サンプルを37℃で30分間混合した後、MA-104細胞に接種し、65時間インキュベートした。これをアセトンで固定した後、間接蛍光抗体法で感染細胞数を測定した。コントロールと比較して感染細胞数が50%となるサンプル濃度を最小阻害濃度(MIC)として表した。

今後この活性成分をさらに純粋に精製して活性の特性をさらに詳細に調べるとともに、F1では認められなかったin vivoの下痢発症予防作用について、精製した活性成分で検討することを計画している。活性がF1よりはるかに強力であることから、in vivoの実験の見通しは十分明るいものと考えている。

3. 抗がん作用

1) マウスを用いた牛乳ムチンの抗がん作用評価

計画の概要：二重移植腫瘍系を用いて、原発腫瘍部位への牛乳ムチンの直接投与が転移部位の退縮に与える影響と、単一移植腫瘍系を用いて、牛乳ムチンの経口投与による腫瘍の退縮に与える影響について、すでに効果が明らかにされているPSKのものと比較した牛乳ムチンの抗がん作

用を評価する。

結果：BALB/cマウスに対してMeth-A腫瘍細胞を右側腹内に 10^6 個、左側腹内に 2×10^5 個それぞれ皮内移植し、原発腫瘍を持つ右側腹内に3日目から牛乳ムチンを一日当たり1mg、3日間連続投与した場合、原発腫瘍の退縮とともに、投与していない左側腫瘍の退縮を21日間観察した。実験の概要を図11に示した。また、結果を表3と図12にまとめた。

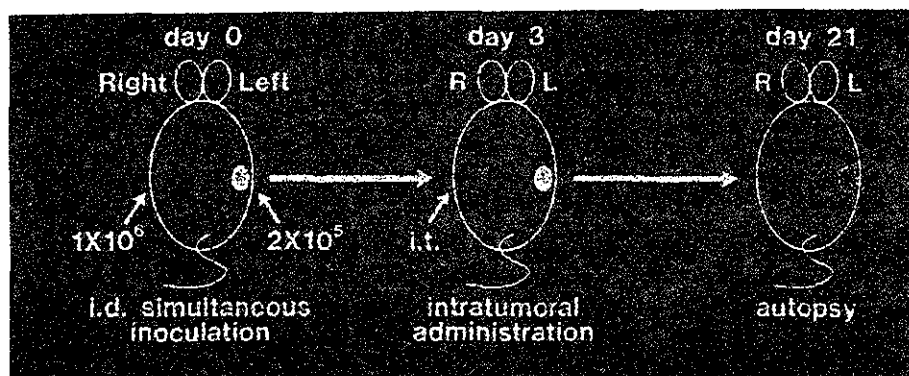


図11. 二重移植系による抗癌剤の効力評価

表3. 二重移植系を用いた牛乳ムチンの抗がん効果

	right tumor (1×10^6 cells)			left tumor (2×10^5 cells)		
	tumor-free/ tested	tumor diameter (mm \pm SD)	Tumor weight (g \pm SD)	tumor-free/ tested	tumor diameter (mm \pm SD)	tumor weight (g \pm SD)
Control	0/7	22.4 ± 1.5	3.8 ± 0.6	0/7	14.0 ± 2.3	1.5 ± 0.7
F1	3/7	2.5 ± 2.9	0.1 ± 0.2	2/7	7.0 ± 5.4	0.5 ± 0.7

表には21日目の観察結果をまとめた。

表3及び図12に示したように、牛乳ムチンとしてF1を三日間連続して原発部位である右側腫瘍部位に直接投与した後、この右側腫瘍には顕著な退縮が認められ、21日目には実験に供した7匹のマウス全てでほぼ腫瘍が消失し、そのうち3匹では腫瘍が完全に消失していた。このような抗腫瘍効果はすでにPSKやオボムチン、あるいはラクトフェリンにも認められているが、牛乳ムチンの効果はそれらに比較してかなり強力なものである。一方、転移腫瘍である左側腫瘍に与える影響にはマウス間にかんがりの変動が認められた。しかし、F1投与を直接行っていないにも関わらず、全般に腫瘍の退縮傾向が認められ、表3に示したように、21日後には完全に消失したマウスも見られた。このような転移腫瘍における消失効果はPSKやオボムチンには見られないもので、牛乳ムチンは生体の抗がん免疫カスケードを何らかの形で刺激する活性を持っているように思われ、今後さらに詳しく検討する価値のあるものと考えている。

経口投与による影響については今回の研究期間では検討することが出来なかったが、直接投与

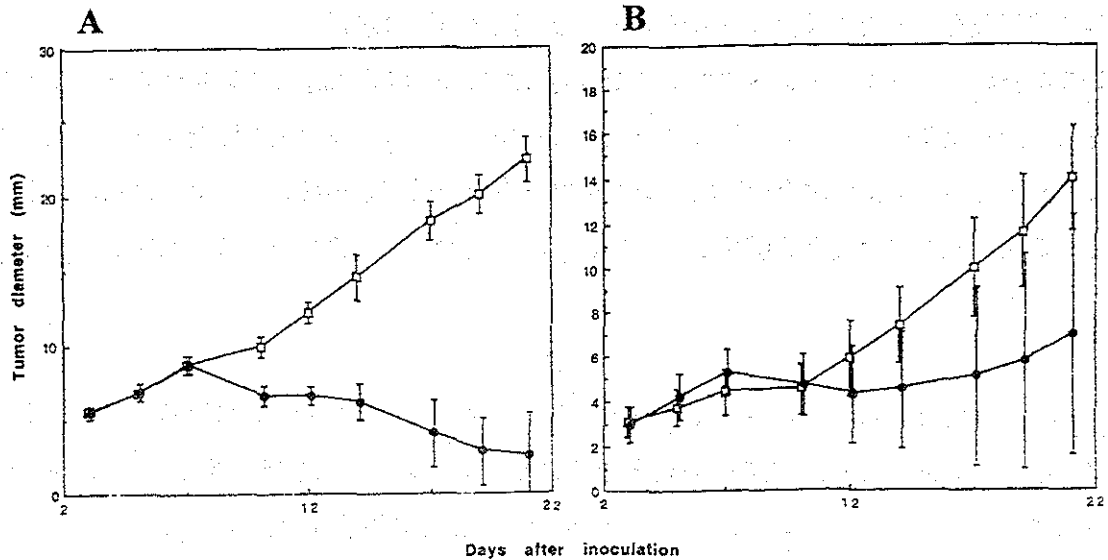


図12. 二重移植腫瘍系での牛乳F1の腫瘍内投与が腫瘍の退縮に与える影響。

(A)は右側(投与部位)腫瘍、(B)は左側腫瘍である。(□)はコントロール、(●)はF1投与のものである。値は一群7匹の平均値±標準偏差を示している。

による免疫カスケード刺激が示唆されていることから、興味ある結果が得られるものと期待している。

2) 培養細胞を用いた牛乳ムチンの抗がん作用の解析

計画の概要：BALB/cマウスに対してMeth-A腫瘍細胞を右側腹内に 10^6 個皮内移植し、原発腫瘍を持つ右側腹内に3日目から牛乳ムチンを3日間投与する。マウスから血清を採取し、活性化したマクロファージと好中球のマーカータンパク質であるIAP(immunosuppressive acidic protein)の血清レベルを測定する。これによって、牛乳ムチンの抗がん作用の機作を解析する。

結果：これに関する実験は現在検討中で、結果はまだ得ていない。

4. コレステロール低下作用

1) ラットを用いた牛乳ムチンの血清コレステロール低下作用の評価

計画の概要：90~110gのラットに牛乳ムチンを加えた食餌を与えて14日間飼育した場合の血中のコレステロール値に与える影響を観察する。食餌中にコレステロールを添加した場合と、無添加の場合のそれぞれで、血中コレステロールの値に変動が見られるかどうかを観察し、その値をすでに効果が知られている大豆タンパク質のものと比較することによって、牛乳ムチンの血清コレステロール低下効果を評価する。

結果：これに関する実験は現在検討中で、結果はまだ得ていない。

2) 腸培養細胞を用いた外因性コレステロール吸収阻害作用の解析

計画の概要：コンフルエントになるまで培養したCaco-2培養細胞にコレステロールとともに均質化した胆汁酸ミセルを加え、細胞に吸収されたコレステロールの量を測定する。牛乳ムチンを添加したミセルを加えた場合の吸収コレステロール量の低下を観察し、すでに効果が明らかにされている大豆タンパク質と比較することにより、外因性コレステロールの吸収抑制効果を評価する。

結果：実験では、はじめに最終濃度が1mMとなるようにクロロホルムに溶解したモノオレイン(0.0004278g/48mL)140 μ Lと0.02Ci/mLとなるようにエタノールに溶解させた 14 C-コレステロール70 μ Lを50mLチューブ二本分に取り、乾固させた。また最終濃度が1mMとなるようにクロロホルムに溶解したモノオレイン(0.0004278g/48mL)24 μ L、0.02 μ Ci/mlとなるようにエタノールに溶解させた 14 C-コレステロール48 μ Lを4mLエッペンドルフチューブ三本分にとり、乾固させた。50mLチューブにタウロコール酸を0.134425mgとりM-199培地50mLに溶解させた。この溶解液をモノオレインとコレステロールを含むチューブに移し、カゼインのトリプシン加水分解物(CT)、大豆タンパク質ペプシン加水分解物高分子量画分(IP)、あるいは牛乳ムチン(F1)を0.5mg/mL加え、ボルテックスミキサーにて二分間攪拌した後、超音波処理(out put30, 3min.)を行い、ミセル溶液とした。

48-well plateに培養したCaCo-2細胞のDMEMを吸引除去し、PBSで二回洗浄した。ここに調製したミセル溶液を0.1mg protein/0.2mL micelle/well加え、インキュベーター(5%CO₂, 37°C)で20分間インキュベートした。その後ミセル溶液をアスピレーターで吸引除去し、PBSで二回洗浄した。0.1%SDS溶液を0.5mL/well加えて細胞を剥がし、バイアルに移した。ここに7.5mLのAqua-sol-2を加え、液体シンチレーションカウンターによって細胞に吸収された 14 C-コレステロール量を測定した。

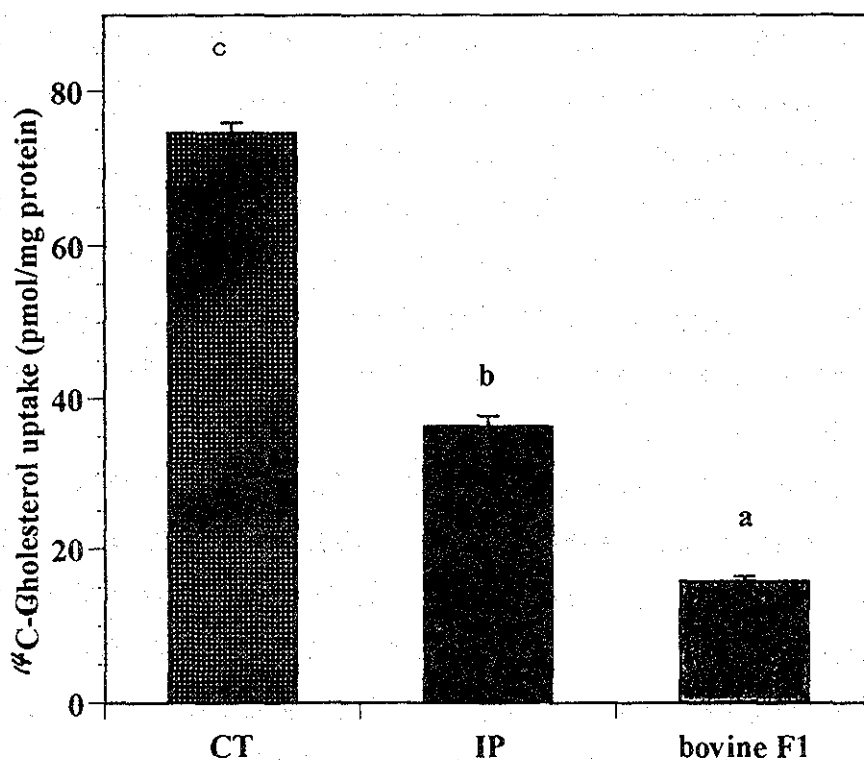
なお、結果の統計的分析には、Duncan's multiple-range testを用いた。

また本実験で用いたCTは明治乳業株式会社、IPは協和発酵株式会社から提供を受けたものである。

実験結果を図13に示した。ここでは三種類のタンパク質について比較した。CTはカゼインのトリプシン加水分解物、IPは大豆タンパク質のペプシン加水分解物、そしてF1である。極めて強力なコレステロール吸収抑制作用が牛乳ムチンに認められた。F1の作用は、すでに特定保険食品としてその効果が公に認められている大豆ペプチドに比較して、はるかに強力なものであった。現在のところ、抑制のメカニズムについては不明である。今後は、抗ウイルス作用と同様F1分画物を用いた実験を行うことにより、作用成分の特定を行うとともに、メカニズムに関して検討を行うことを計画している。

腸からの多量のコレステロールの吸収は血中コレステロールレベル上昇の一因となる。本実験

で用いた培養細胞系は吸収阻害作用を示す成分のin vitroでのスクリーニング結果を示している。上述のように、量的な制約からF1のin vivoでの実験はまだ実現していないが、図13に示した結果は、in vivoの実験が見通しの明るいものであることを示しているものと考えられる。



Cholesterol uptake in CaCo-2 cells

図13. 腸由来培養細胞系における牛乳ムチンによるコレステロール吸収抑制。CTはカゼインのトリプシン加水分解物、IPは大豆タンパク質のペプシン加水分解物、bovine F1は牛乳ムチン標品である。

5. 成長促進作用

1) ラットを用いた牛乳ムチンの成長促進作用評価

計画の概要：体重をそろえた60~80gの一群のラットに牛乳ムチンを加えた食餌を与えて14日間飼育した場合の体重増加に与える影響を観察する。すでに効果が知られているブタ胃ムチンのものと比較することによって、牛乳ムチンの成長促進効果を評価する。

結果：これに関する実験は現在検討中で、結果はまだ得ていない。

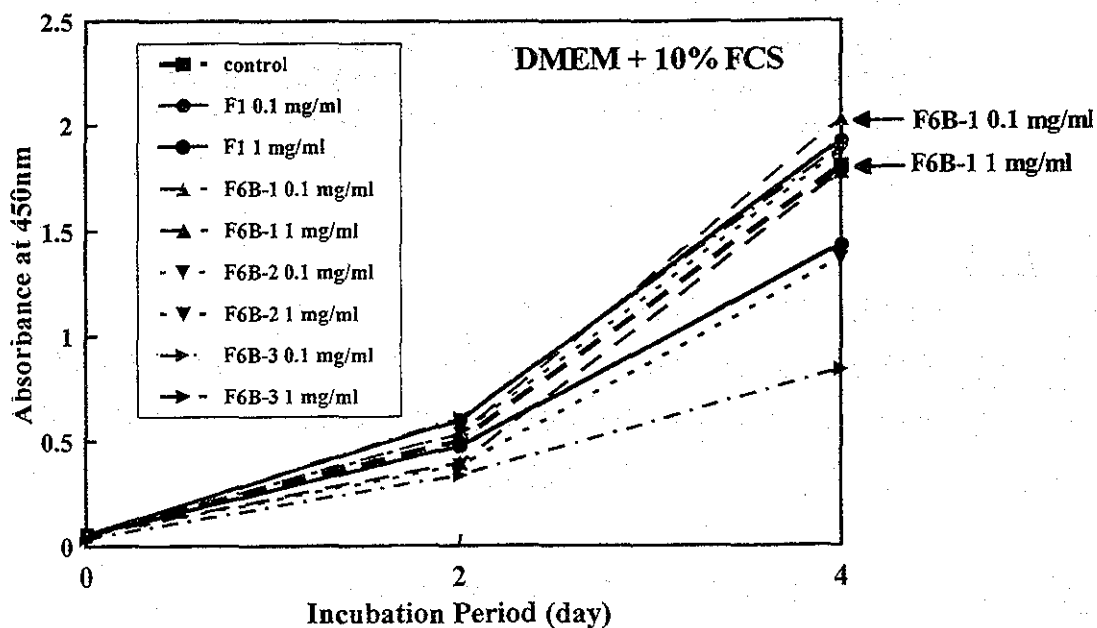
2) 腸由来培養細胞の成長促進作用の解析

計画の概要：腸培養細胞の増殖促進作用についてin vitroで解析する。

結果：腸培養細胞の成長に及ぼす牛乳ムチンの影響は、ラット小腸クリプト由来培養細胞であるIEC-6細胞を用いてWST-1試薬による比色法で調べた。すなわち、10cmディッシュ中でコンフルエントになるまで培養したIEC-6細胞をトリプシン処理し、10%FCSを含むDMEMに懸濁した。1000rpm、5分間遠心してから上清を除去し、 1×10^4 cells/cm²となるように細胞懸濁液を調製後、96ウェルプレートの各ウェルに100 μ Lずつ加えた。CO₂インキュベーター(5%CO₂、37 $^{\circ}$ C)で5時間前培養し、細胞がプラスチックプレートに十分接着したことを確認した後、100 μ Lの試験培地に交換した。CO₂インキュベーターで培養し、一日おきに培地交換した。測定日に試験培地を吸引除去し、各ウェルに10%FCSを含むDMEMを100mL、WST-1試薬(和光純薬工業Cell Counting Kit)を10mLずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間、CO₂インキュベーター中においた後、マイクロプレートリーダーにより450nm(参照波長600nm)の吸光度を測定した。試験培地は10%FCSを含むDMEMに指示した濃度のミルクタンパク質を含むように調製した。調製した牛乳ムチン標品の示す培養細胞成長への影響を図に示した。

試料を添加しないコントロールの培地に比べて、牛乳ムチンとその分画物のF6B-1を添加した培地のIEC-6細胞の成長に顕著な影響は認められず、添加濃度を増加すると、F1ではむしろ成長を抑制する方向に影響が現れた。しかし、F6B-1では0.1mg/mLのレベルではコントロールより増殖を刺激する傾向が認められ、1 mg/mLレベルでも抑制傾向は全く認められなかった。

今後は実験系の改良を行うことで、より正確な評価を可能とするとともに、成長に及ぼす牛乳ムチンの影響をin vivoで評価できるようにしたいと考えている。



Effect of F1 and its fractions on the proliferation of IEC-6 cells