

抗炎症活性を持つ乳成分の探索と解析

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 清水 誠

要 旨

腸管の炎症反応を制御する食品因子を牛乳中に探索するための新規 *in vitro* 実験系について検討した。本実験系では、腸管上皮細胞が炎症時に分泌するインターロイキン-8 (IL-8) に注目し、①ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 が各種ストレスに应答して分泌する IL-8 量の測定、②IL-8 分泌を調節している IL-8 遺伝子の転写活性のレポーターアッセイによる測定、の2つを指標とした評価系を用いた。その結果、乳に含まれるアミノ酸であるタウリン、抗菌性タンパク質として知られるラクトパーオキシダーゼ、ある種の微生物酵素で消化したホエイタンパク質分解物に、炎症反応亢進下での IL-8 分泌の抑制、非炎症状態での IL-8 分泌の増強などの作用が見出された。一方、IL-8 遺伝子の転写活性制御を指標としたレポーターアッセイを用いた機能性成分検出の試みに関しては、乳タンパク質分解物にある程度の制御活性を見出すことが出来たが、その検出感度は充分でなく、このような手法で機能性因子を探索するためには、アッセイ用細胞の構築法や測定可能な食品成分の範囲などに関するさらなる検討が必要と考えられた。

キーワード: 腸管炎症、Caco-2、インターロイキン-8、レポーターアッセイ、炎症抑制因子、乳由来ペプチド

1. 研究の背景と目的

腸管は外界に接する器官であり、食品成分や環境中の有害物質などが直接接触するために、それらに対する様々な応答機能を有している。その一つが免疫応答である。腸管上皮細胞は外界から侵入する異物を取り込み、それを粘膜固有層の免疫細胞に提示して IgA 産生など防御的な免疫応答を誘導する。また、外界からの刺激に应答して炎症性サイトカインなどを分泌し、それによって好中球やマクロファージを誘引して腸管粘膜のバリアー機能を高める。このように腸管上皮は感染症などに対する防御の最前線としての機能を果たしている。一方で、このような免疫応答のバランスが破綻し、免疫細胞の働きが過度に活性化された場合には、腸管粘膜の炎症が起こることも知られている。近年患者数が増加しているクローン病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) はもとより、患者数が人口の 10% 以上に達するといわれる過敏性腸症候群 (IBS) にも腸の炎症が関わっているとされており、患者の QOL の著しい低下を引き起こすこれらの疾患は重大な社会問題になりつつある。

食品成分には腸管機能に様々な影響を及ぼすものが存在すると考えられる。したがって、「腸における防御機能の向上や炎症の抑制に関わる食品成分を見出し、その実態を明らかにすること」

は、腸の健康を維持する食品の設計や食生活の改善に資する情報を提供する上で有用であることが期待される。特に乳は、生体防御に関わる因子と炎症反応を抑制する因子を併せ持つ食品と考えられている。本研究の目的は、腸管上皮をターゲットとして、そこで起こる免疫反応（炎症反応）を調節する乳成分を新規な手法で探索し、解析しようというものである。

炎症反応の調節機能を測定するための手法は *in vivo* から *in vitro* の試験系まで多様である。ここでは、腸管上皮培養細胞を用いた実験系を中心に、炎症性サイトカインの分泌やその産生制御にかかわる転写因子の挙動を指標にして、炎症調節機能を持つ乳成分を探索することにした。具体的には、腸管炎症の誘発因子のひとつであるケモカイン IL-8（インターロイキン-8）の産生、および IL-8 の産生調節に関わる遺伝子のプロモーター領域の活性化を指標に、これらが乳成分によってどのような影響を受けるかについて検討した。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

ヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2、HT29 は American Type Culture Collection より購入した。細胞の培養には接着細胞用 100 mm プラスチックディッシュを用いた。培養は 5% CO₂ を含む 37°C インキュベーター内で行った。1 日おきに培地を交換し、細胞がコンフルエントに達したら随時、継代作業をおこなった。実験に用いる細胞は 24 ウェルプレートに撒き、2-3 日おきに培地交換をしながら 14 日間培養して十分に小腸上皮様に分化させてから用いた。

2.2 IL-8 量の測定

24 ウェルプレート上で 14 日間培養して十分に小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞に、各種乳由来試料と添加した。24 時間培養した後に培養上清液を回収し、細胞から分泌された IL-8 の濃度を酵素抗体法（ELISA）によって測定した。なお、炎症状態の細胞モデルとして、2mM 過酸化水素あるいは TNF- α (10ng/ml) で処理した細胞に対する各種試料の影響も調べた。

2.3 IL-8 mRNA 発現量の測定

Real-time RT-PCR を用いて mRNA 量を測定した。

2.4 レポーターアッセイ用細胞の作成

IL-8 転写活性を評価するために、IL-8 のプロモーター領域を組み込んだレポーターベクター（pGL3-IL-8）を作成した。ベクターの構築に関する詳細は結果の項において述べる。コラーゲンコートした 12 ウェルプレートに Caco-2 細胞を 1 ウェルあたり 1.0×10^5 個播き、一晚培養し約 60% コンフルエントにした後、pGL3-IL-8 をトランスフェクションした。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法あるいはリポフェクタミン法を用いた。

2.5 ルシフェラーゼアッセイ

試料添加 24 時間後、細胞を溶解させ、遠心により不溶物を取り除いてから上清をサンプルとして用いた。ルシフェラーゼアッセイの測定は Dual-luciferase reporter assay system (Promega) を用いた。測定時間は 10 秒に設定した。50 μ l の Luciferase assay reagent II に 10 μ l のサンプルを混合し、レポーター酵素であるホタルルシフェラーゼの活性を測定した。

2.6 消化処理

胃での消化を再現するために、2%タンパク質水溶液に塩酸を加えて pH を 2~4 に調整した。続いて、基質の 1/250 量のペプシンを加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。反応液に水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 6.5 に調整しペプシンを失活させてから、基質の 1/250 量のトリプシンを加えて 37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。その後、酵素反応を停止させるために 90 $^{\circ}$ Cで 10 分間加熱し、凍結乾燥した。

3. 結果と考察

3.1 タウリンの抗炎症作用

我々は、アミノ酸の中に腸管上皮細胞からの IL-8 分泌を抑制する作用を持ったものがあることを先に見出した。特にヒスチジン (Son ら、2005) やメチオニンは、それぞれ作用機構は違うものの顕著な抑制活性を示す。そこで、乳 (特に母乳) 中にも多く含まれるタウリンが同様な作用を持つかどうかについて検討した。Caco-2 細胞を 50ng/ml の濃度の TNF- α で処理すると IL-8 の産生量は著しく上昇するが、5 ~ 50 m M タウリンの存在下ではその産生量がタウリンの濃度依存的に減少した。また、IL-8 mRNA レベルも同様に減少した (図 1)。このことから、タウリンは、そ

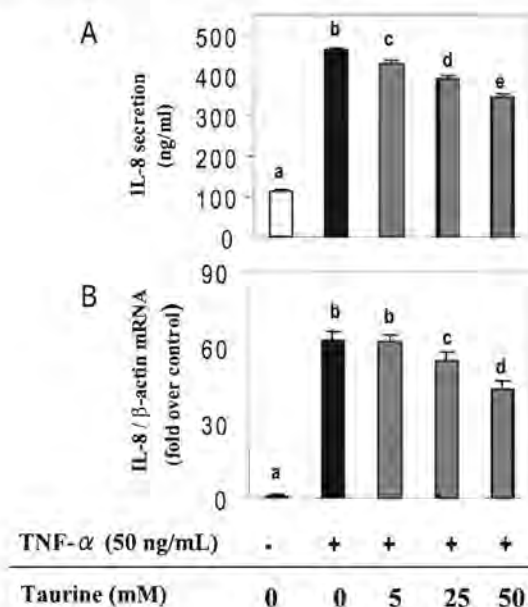


図 1 TNF- α 刺激によって誘導された Caco-2 細胞の IL-8 分泌亢進 (A) と IL-8 mRNA レベルの増加 (B) におよぼすタウリン添加の影響 (Zhao ら、2008)

の活性はそれほど高くはないものの、腸管上皮細胞において誘導される炎症反応を抑制する機能があることが示唆された。なお、この抑制には、IL-8 産生調節を主体的に担うと考えられている転写因子 NF κ B のタウリンによる活性化抑制が関わるものと推定される (Mochizuki ら、2005)。

ちなみに、タウリンの腸管炎症抑制作用は DSS (デキストラン硫酸 Na) 誘導性大腸炎モデルマウスを用いた実験でも確認することができ、その抑制メカニズムの一つは腸管におけるケモカイン産生の抑制であることが示唆されている (Zhao ら、2008)。

3.2 ラクトパーオキシダーゼの抗炎症作用

牛乳由来の糖タンパク質であるラクトパーオキシダーゼ (LPO) は、過酸化水素とチオシアン酸イオンから抗菌性のヒポチオシアネートイオンを生成する作用を持つことから、抗菌作用を持つ酵素として産業的にも利用されている。我々は、いくつかの乳タンパク質、ペプチドを検索する過程で、LPO に Caco-2 細胞からの IL-8 分泌を抑制する作用があることを見出した (Matsushita ら、2008)。Caco-2 細胞に過酸化水素と 10、50、250 μ g/ml の LPO を同時に添加し、24 時間培養後に上清中に分泌された IL-8 の量を測定した結果、LPO は過酸化水素によって誘導される IL-8 分

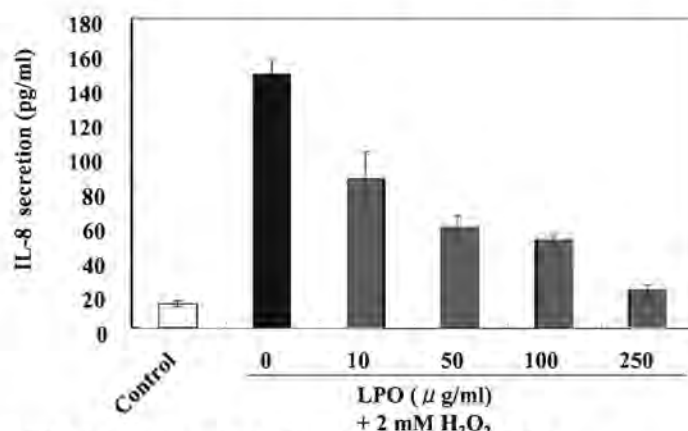


図2 過酸化水素により誘導される IL-8 分泌亢進に対する LPO の影響

Caco-2 細胞を、2mM 過酸化水素と LPO を添加した培地中で 24 時間培養した。培養上清を回収し、ELISA 法で IL-8 量を測定した。

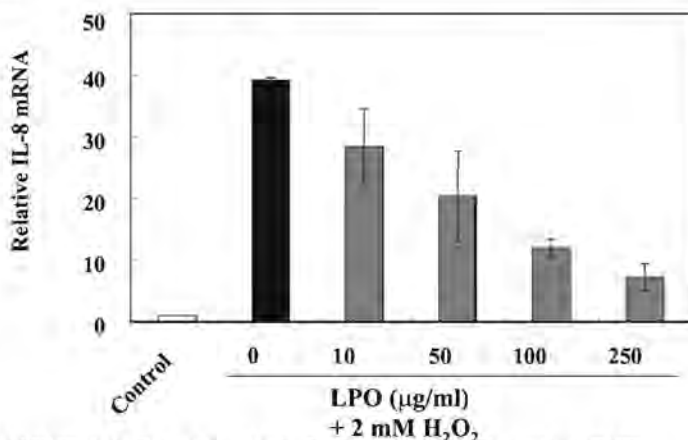


図3 過酸化水素により誘導される IL-8 mRNA 発現亢進に対する LPO の影響

Caco-2 細胞を、2mM 過酸化水素と LPO を添加した培地中で 3 時間培養した。細胞を回収し、RNA 抽出、cDNA 合成を行い、real-time RT-PCR 法で mRNA 量を測定した。

泌亢進を有意に抑制した (図 2)。一方、LPO のみを細胞に添加したときは、IL-8 分泌量に違いはみられなかった (データ省略)。LPO の抑制効果が、mRNA レベルでの調節によるものかどうかを調べるため、IL-8 mRNA 発現量の変化を real-time RT-PCR 法を用いて測定した。過酸化水素刺激により亢進する IL-8 の mRNA 発現は LPO を同時に添加することにより濃度依存的に抑制された (図 3)。

しかし、細胞を LPO で前処理 (3 時間) した後に LPO を取り除き、それから H₂O₂ を添加した場合、LPO 前処理による抑制効果はみられなかった。一方、Caco-2 細胞において IL-8 分泌を誘導する因子としては、過酸化水素以外に IL-1 β 、TNF- α 、PMA、フラジェリンが知られている。そこでこれらの刺激による IL-8 分泌亢進に対しても、LPO による抑制効果がみられるのかどうかを検討した。1 ng/ml IL-1 β 、100 nM TNF- α 、10nM PMA、100ng/ml フラジェリンをそれぞれ LPO と同時に細胞に添加したが、いずれの刺激因子による分泌亢進に対しても、LPO による抑制効果はみられなかった (データ省略)。上記の結果は、LPO が Caco-2 細胞自体に作用して、IL-8 分泌にいたる細胞内シグナル経路のどこかを阻害しているわけではないことを示唆している。むしろ、腸管上皮細胞を刺激する過酸化水素が LPO によって消去されたために、過酸化水素が誘導する腸管上皮細胞の IL-8 分泌が見られなくなったという解釈が妥当であろう。

ただし、LPO が微生物などの産生する過酸化水素を消去する活性を腸管内でも維持していれば、現実には腸管の炎症を抑制することにつながる。In vitro 消化系によって LPO の消化分解性を検討した結果では、pH2 におけるペプシン処理では LPO はほぼ完全に分解されるが、pH4 でのペプシン処理とそれに引き続くパンクレアチン処理は LPO の分解を引き起こさず、またその過酸化水素消去活性も維持されていることが明らかになった (データ省略)。食後の胃内 pH は一般に 3 - 4 程度で、強い酸性にはならないことが知られている。また高齢者などでは胃酸の分泌が低下し、やはり pH が下がらない。このような状況下では LPO は腸管内でのその酵素活性を維持している可能性がある。さらに LPO は 65°C、30 分間の加熱条件ではその活性を維持していた。このような結果から、LPO は比較的安定なタンパク質であり、経口摂取した場合にも何らかの抗炎症作用を示すことが期待される。森永乳業研究所のグループは LPO の経口投与が DSS 誘導大腸炎モデルマウスでの炎症抑制作用を持つことを見出しており、また LPO 投与が腸管における免疫関連遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性を指摘している (堀米、2007)。この in vivo における炎症抑制作用に LPO の抗酸化作用が関わっている可能性も否定できない。

3.3 ホエイタンパク質分解物の IL-8 分泌亢進作用

ナチュラルチーズ製造時に得られるチーズホエイから分離したホエイタンパク質を食品用微生物で分解して調製したホエイタンパク質分解物 (ホエーペプチド: WPep-1) を A 社より入手し、これが腸管上皮細胞株における IL-8 分泌に及ぼす影響を調べた。その結果、WPep-1 はそれ自身が腸管上皮細胞の IL-8 分泌を促進するという興味深い結果が得られた。Caco-2 細胞および HT29

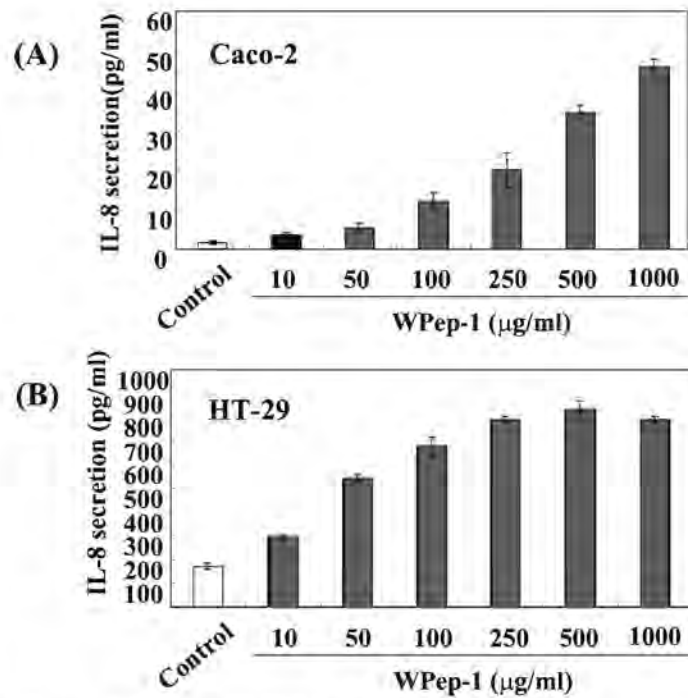


図4 WPeP-1が腸管上皮細胞のIL-8分泌に与える影響

(A) Caco-2細胞、(B) HT-29細胞を、WPeP-1を添加した培地で24時間培養した後、培養上清を回収し、ELISA法でIL-8量を測定した。

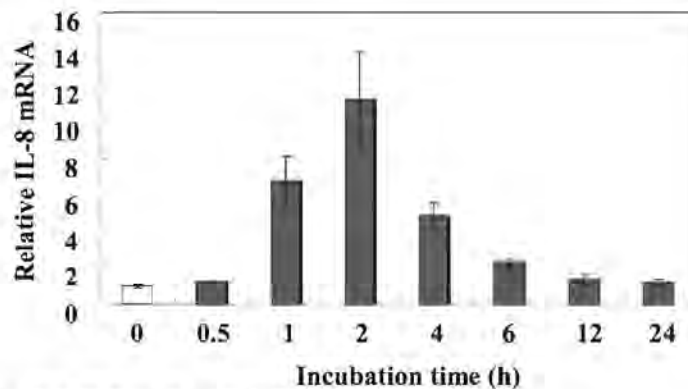


図5 WPeP-1がCaco-2細胞のIL-8 mRNA発現量に与える影響

Caco-2細胞にWPeP-1を500mg/mlの濃度で添加し、0-24時間培養した後に細胞を回収した。

細胞のいずれにおいても、WPeP-1は濃度依存的にIL-8分泌を増加させた(図4)。この作用は酵素分解する前の原料ホエイタンパク質には見られなかったことから、酵素分解で生じた何らかのペプチドによるものと考えられる。さらに、その分泌亢進作用がIL-8 mRNAレベルの上昇を伴っていることも見出されたことから、WPeP-1は転写レベルでIL-8産生を上昇させていることが示唆された(図5)。炎症という視点からは、IL-8の分泌は抑制すべき反応というように認識されているが、その一方で、IL-8の分泌亢進は、腸管感染した際に感染部位へ好中球などの免疫系細胞を誘引し防御体制を整えるという意味できわめて重要な生物反応である。このような乳ペプチドが腸管内で、腸内細菌酵素などの作用によって生じるとすれば、それらは感染されやすい新生児や高齢者における生体防御に何らかの貢献をしている可能性もあろう。なお、WPeP-1の上記のような作用は、ペプシン処理(pH 2)やトリプシン処理のような消化酵素の処理によって大きく低

下することから、消化酵素の活性が十分に高い健常者の場合にはこのような作用は期待されないかもしれない。しかし、どのような構造のペプチドがどのようなメカニズムでIL-8分泌亢進作用を引き起こしているのかは科学的な観点から興味深い。

3.4 レポーターアッセイによる評価

3.4.1 レポーターアッセイ系の構築

近年、食品因子の生体機能調節には、各種遺伝子の転写領域への働きかけに起因する遺伝子の発現調節が関わっていることが明らかになってきた。すなわち、食品因子が直接、あるいは何らかのシグナル経路を活性化することにより、標的遺伝子の発現調節部位への転写因子の結合を促進あるいは抑制するというプロセスが進行し、それが最終的に何らかの生体調節を引き起こすという仕組みである。食品因子のこのような作用を解析する手法の一つとしてはレポーターアッセイが有用である。

我々は、腸管での解毒代謝に関わる酵素やトランスポーターの転写調節に関わるとされている核内受容体 PXR (Pregnane X receptor) の応答配列を含むプロモーターを上流にもつルシフェラーゼ発現プラスミドを作製し、これを腸管細胞 LS180 に発現させたレポーターアッセイ用細胞を構築した。この細胞に各種食品因子を添加することによって、PXR を介して解毒代謝系トランスポーターの発現を調節する食品因子の探索が可能と考えられる。我々はこのような考えのもとで実験を行い、いくつかの食品因子が PXR を活性化し、ある種の解毒酵素・トランスポーターの発現を強く誘導することを見出した (Satsu ら、論文投稿中)。転写因子の活性を指標にするこのような手法が有効であることから、本研究では、腸管の炎症反応を調節する牛乳成分をレポーターアッセイを用いて探索するという新しい試みを進めることにした。

本研究では、標的とする転写因子として炎症反応のマスターレギュレーターである NFκB を選ぶことにした。最初に、NFκB 応答配列を含む IL-8 遺伝子のプロモーター領域 (図 6) をそのまま、あるいは一部を切り取ってルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、レポーターアッセイ用

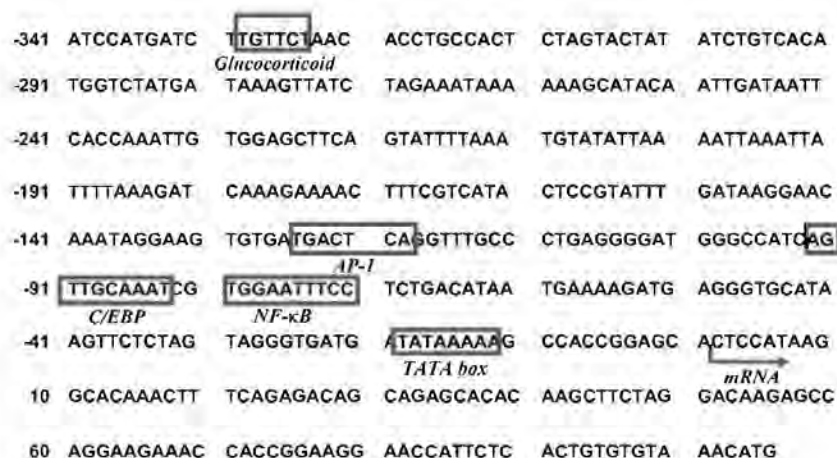


図 6 IL-8 遺伝子プロモーター領域の配列と転写応答部位

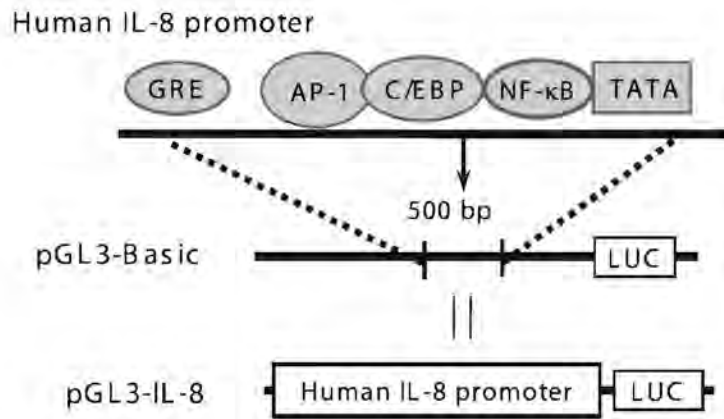


図7 ヒト IL-8 プロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ (LUC) 発現ベクター

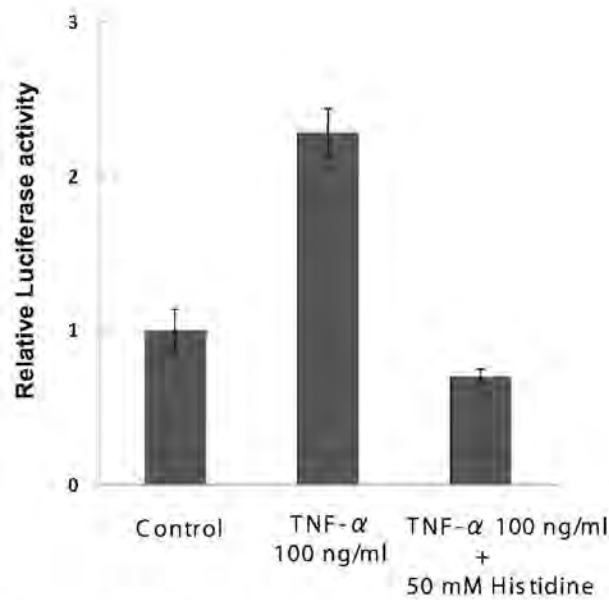


図8 TNF 処理によるルシフェラーゼ活性の上昇とヒスチジンによるその抑制

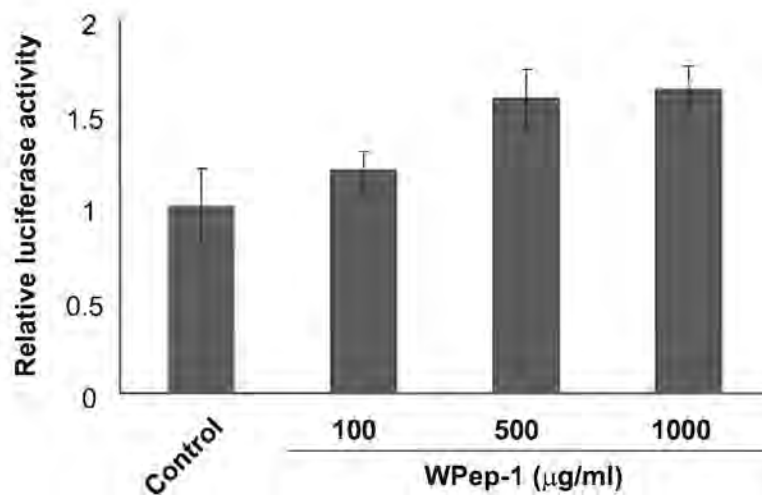


図9 WPeP-1 が IL-8 プロモーターの転写活性に与える影響 (レポーターアッセイ)

発現プラスミド (pGL3-IL-8) とした (図7)。さらに pGL3-IL-8 を Caco-2 にトランスフェクトし、各種試料を添加してレポーターアッセイを行った。

まず、このレポーターアッセイ系が機能しているかどうかを、細胞に刺激物質として TNF- α (100ng/ml) を加え、24 時間後のルシフェラーゼの活性発現を見ることによって検討した。Caco-2 細胞は遺伝子導入するのが難しい細胞と言われている。そこで、具体的には以下のような要因についても検討し、最適条件を求めた。

- ① トランスフェクション時の細胞濃度：条件検討の結果、細胞濃度は 5×10^4 個/ml とすることとした。
- ② トランスフェクトする DNA 量：12 ウェルプレートの場合は 1 ウェルあたり 0.3 μ g、24 ウェルプレートの場合は 1 ウェルあたり 0.1 μ g とするのがルシフェラーゼ活性の相対値を出す上で適当であると判断した。
- ③ TNF- α の添加のタイミング：トランスフェクトした状態の細胞にそのまま添加するよりも、一旦通常培地中で 24 時間培養した後に添加したほうが刺激物質に対する感度が上昇することを確認した。

上記のような検討の結果、TNF- α 処理によってルシフェラーゼ活性がコントロールの 2～5 倍程度に上昇する細胞を作成することが出来た。実際に TNF- α で刺激したときのルシフェラーゼ活性の上昇と、ヒスチジンでの抑制を確認した結果を図 8 に示した。

3.4.2 レポーターアッセイによる牛乳由来ペプチド画分の評価

3.3 節で見出された WPep-1 の IL-8 分泌促進活性 (図 4) がレポーターアッセイでも検出可能かどうかを見るために、まず Wpеп-1 をレポーターアッセイ用細胞に添加し、IL-8 転写活性が上昇するかどうかを確認した。TNF- α 刺激のような転写活性の急激な上昇は認められなかったが、WPep-1 の濃度依存的にルシフェラーゼ活性の上昇が観察され、WPep-1 の IL-8 分泌促進活性が転写レベルで確認された (図 9)。

牛乳カゼイン及びホエイタンパク質を消化酵素 (ペプシン及びパンクレアチン) で処理し、消化物 (カゼイン分解物、ホエイタンパク質分解物) を得た。これらとともに、B 社が調製したチーズホエイタンパク質の微生物酵素分解物 (WPep-2) を用い、それらが TNF- α 処理で上昇した IL-8 転写活性に影響を及ぼすかどうかを、pGL3-IL-8 導入 Caco-2 細胞によって検討した。カゼイン分解物は転写活性に影響を及ぼさなかったが、ホエイタンパク質分解物および WPep-2 には転写活性を低下させる傾向が認められた (図 10)。また、レポーターアッセイではなく、Caco-2 細胞の IL-8 分泌量を指標に各ペプチド試料の効果を観察したところ、ホエイタンパク質分解物および WPep-2 で有意な IL-8 分泌の抑制が見出された (図 11)。用いた試料濃度から判断しても、これらの分解物の活性はあまり高いものではないが、腸管内の乳タンパク質濃度は mg/ml のオーダーに達する可能性があることを考えると、牛乳・乳製品の摂取は腸管内での前炎症状態におけるケモ

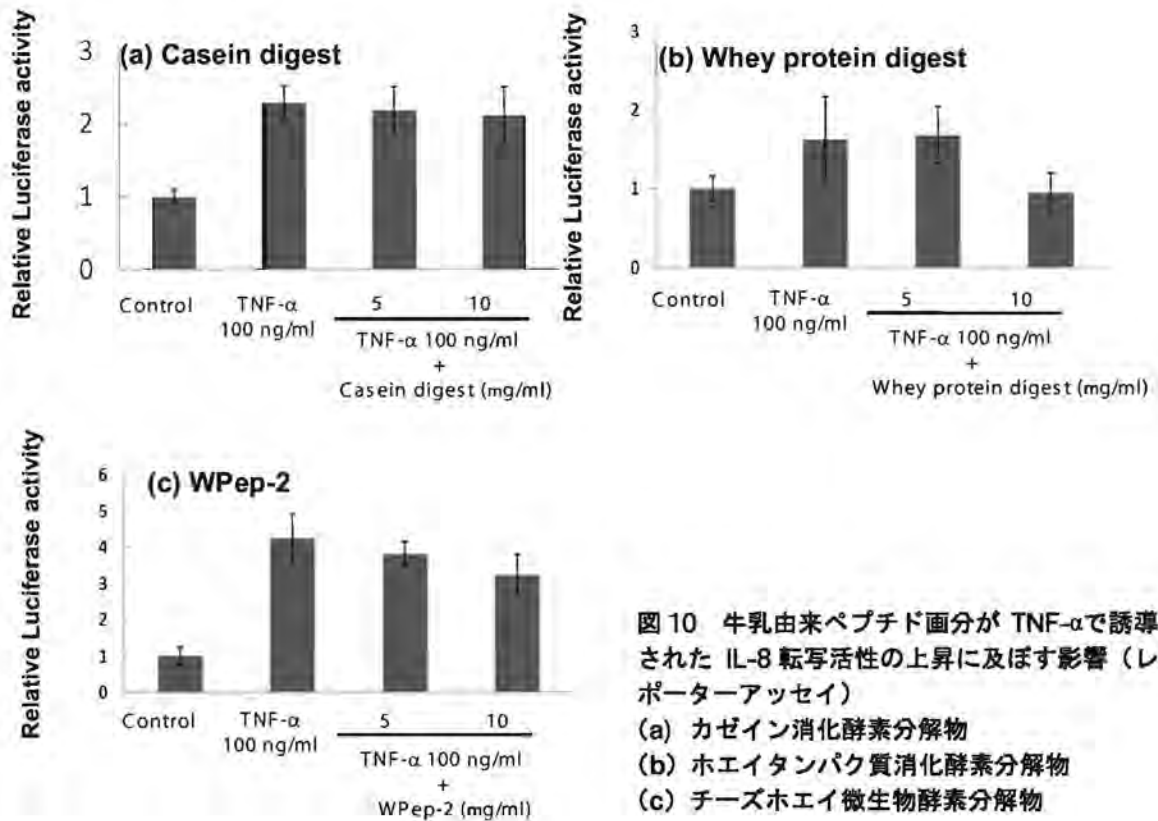


図 10 牛乳由来ペプチド画分が TNF- α で誘導された IL-8 転写活性の上昇に及ぼす影響 (レポーターアッセイ)

- (a) カゼイン消化酵素分解物
- (b) ホエイタンパク質消化酵素分解物
- (c) チーズホエイ微生物酵素分解物

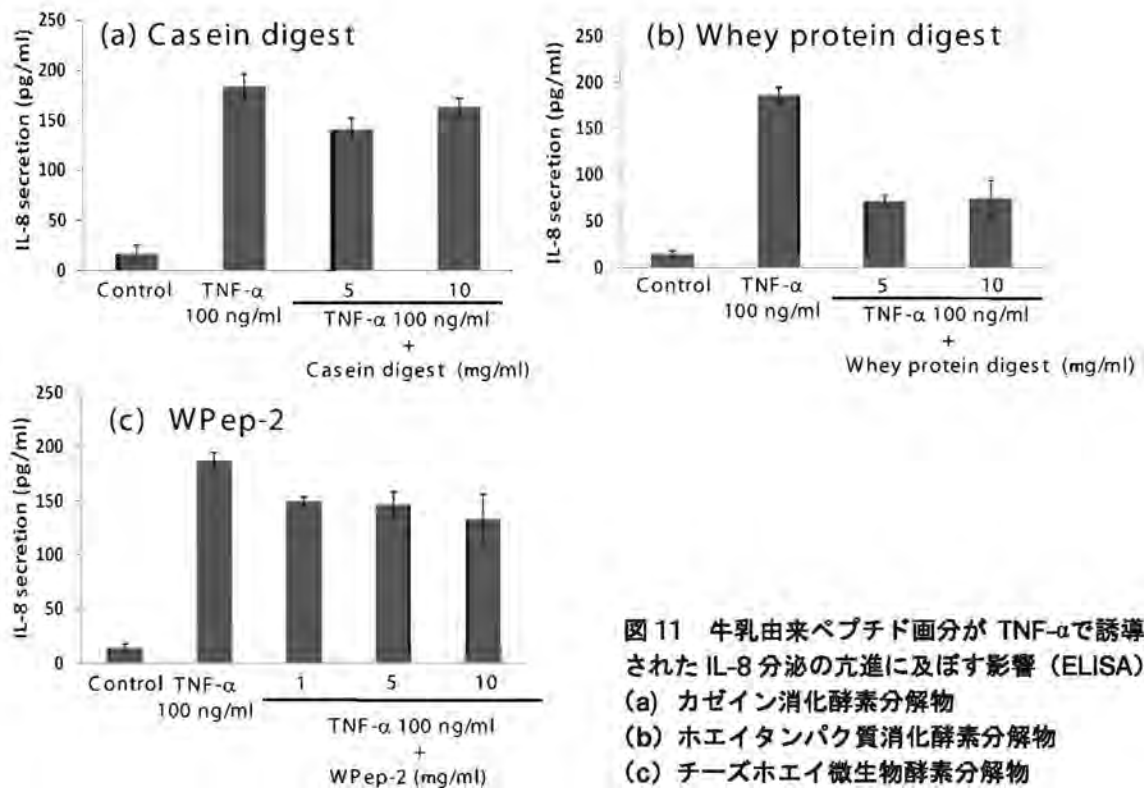


図 11 牛乳由来ペプチド画分が TNF- α で誘導された IL-8 分泌の亢進に及ぼす影響 (ELISA)

- (a) カゼイン消化酵素分解物
- (b) ホエイタンパク質消化酵素分解物
- (c) チーズホエイ微生物酵素分解物

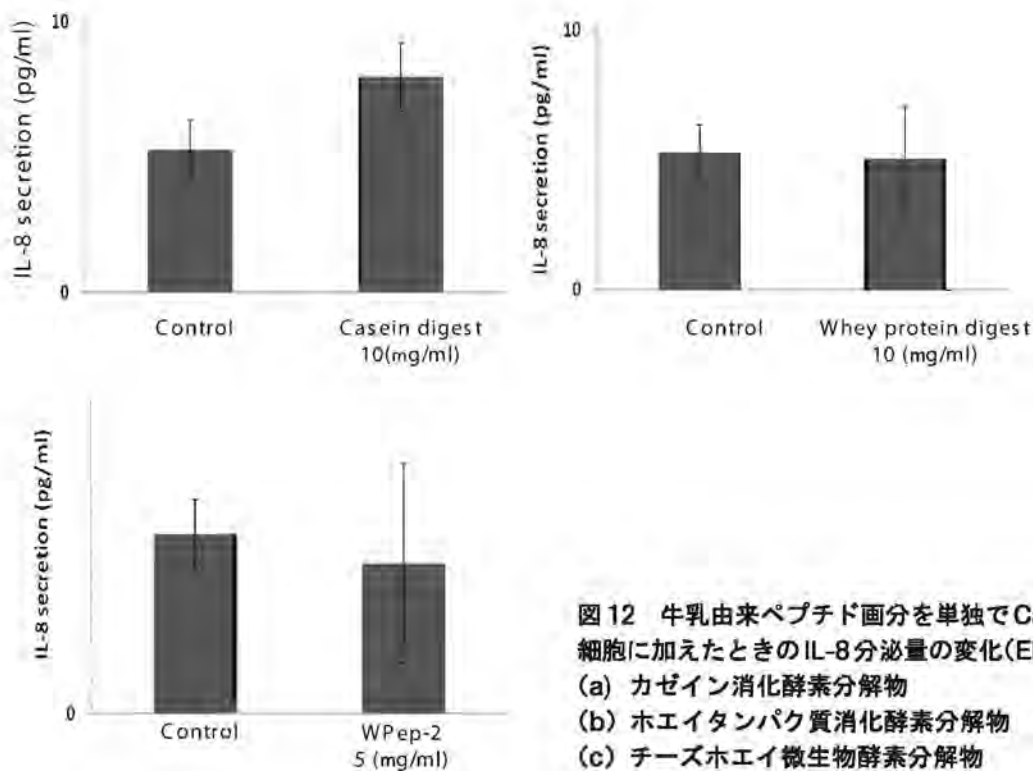


図12 牛乳由来ペプチド画分を単独でCaco-2細胞に加えたときのIL-8分泌量の変化(ELISA)
 (a) カゼイン消化酵素分解物
 (b) ホエイタンパク質消化酵素分解物
 (c) チーズホエイ微生物酵素分解物

カイン分泌に対して抑制的に働いている可能性がある。一方、TNF- α 刺激のない条件下で細胞に対するペプチド試料の効果を見た実験では、カゼイン分解物が、Caco-2細胞におけるIL-8産生を亢進することが確認された(図12)。このような結果が、牛乳タンパク質(ペプチド)はストレス下での炎症反応には抑制的に、非ストレス下では感染防御的に働いているということを意味しているとすれば興味深いことであり、このような視点からのより詳細な検討が必要であろう。

4. 総合考察

牛乳中の感染防御因子としては、IgG、IgAをはじめとする抗体類、鉄結合タンパク質であるラクトフェリンとその分解ペプチドであるラクトフェリシンが良く知られている。また、カルシウム吸収促進因子として知られているカゼインホスホペプチド(CPP)によるIgA産生促進(Ohtaniら、2000)、カゼイン由来ペプチドによるマクロファージの活性化(Migliore-SamourおよびJolles、1988)などの報告もあり、乳には新生児を感染から守る多様な防御因子が存在することは疑いのない事実となっている。一方で、ラクトフェリンなどのタンパク質による抗炎症効果(Lefrandら、2005)などが報告されている。

本研究では、乳成分が示すと期待される生体防御増強作用・炎症抑制作用を、腸管上皮細胞を用いたin vitro実験系で評価することを試みた。in vitro培養実験系による食品成分の機能性評価は、時として生体での応答性と相関の低い情報しか与えないことが危惧されているが、実際に食品成分と接触する可能性の高い腸管上皮の場合には、in vitro細胞培養系でも十分に意味のある情報を得られることが多い。本研究では、腸管上皮細胞培養系を第1次スクリーニングの手段とし

て用い、特に生体防御や炎症に関わるケモカインである IL-8 の転写活性を、炎症抑制性食品成分探索における標的とした。この実験系によって、作用メカニズムの推定が最初からある程度可能な機能成分を乳中に探索することが可能になると考えられる。これまでの実験データから、このようなアプローチは一定の有用性が期待されるものの、その感度に問題があり、現状では他の手法で十分評価できるケースが多いという結果となった。

本研究で用いたレポーターアッセイ系の検定用細胞である Caco-2 細胞は遺伝子導入の効率が低く、発現が容易ではない細胞であると言われている。そのために測定系の感度が十分に上がらなかったことが、転写調節活性を指標にした本探索系が十分に機能しなかった一つの理由と思われる。本研究は、あくまで腸管における乳成分の機能を探るのが目的であり、腸管細胞を用いたレポーターアッセイにこだわったが、他の細胞を用いてより感度の良い 1 次スクリーニング系を構築することも考える必要があるだろう。本探索系が十分に機能しなかったもう一つの理由は、乳タンパク質・ペプチドの場合には、そのまま細胞内に進入して転写因子等と相互作用する可能性が低く、おそらくは細胞表面の認識分子を介して、間接的に転写因子の動きを制御する、というメカニズム上の問題が挙げられる。我々が以前に行なった、転写因子 PXR の活性調節機能を持つ食品因子の探索では、レポーターアッセイ系が極めて有効であったが、この時の食品因子は細胞内に拡散輸送しやすいフラボノイドやテルペノイドなどの低分子化学物質であった。これらの成分中のあるものは細胞内に進入して転写因子と直接相互作用していることも最近明らかになりつつある。ペプチドなどではこのような直接的相互作用がおこりにくく、間接的な作用を見ることとなるため、レポーターアッセイ系での検出感度はさらに低くなったものと思われる。

「作用メカニズムをあらかじめ固定してそれを指標に有効成分を探索していく」という機能性成分探索法、特に「転写因子や核内受容体などが関わる反応系を機能評価のターゲットとする」という手法は、今後さまざまな形で発展していくと考えられる。そのような手法の持つ問題点の一部を本研究によって明らかにすることができたと考えている。

5. 参考文献

- Lefrand, D. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (22), 2549-59 (2005)
- Matsushita, A. et al., *Int. Dairy J.* In press (2008)
- Migliore-Samour, D. and Jolles, P., *Experientia*, 44, 188-193 (1988)
- Mochizuki, T. et al., *FEBS Lett.* 579 (14) : 3069-74 (2005)
- Otani H. et al., *Food Agric. Immunol.*, 12 (2), 167-173 (2000)
- Son, D-O. et al., *FEBS Lett.* 579, 4671-4677 (2005)
- Zhao, Z. et al., *Amino Acids*, in press (2008) DOI. 10.1007/s00726-007-0562-8
- 堀米綾子、ミルクサイエンス、56 (2) : 53-54 (2007)