

## 牛乳中に含まれる新生理活性物質の探索と同定

東京大学農学部農芸化学科 上野川 修一  
畜産物利用学研究室 教授  
東京大学 名誉教授 山内 邦男

### 〔目的〕

乳は新生哺乳動物の唯一の食品であり、多くの生理活性物質が含まれていると予想できる。しかしながら、それらは未同定であったり、生体内での活性が未知である場合が多い。本研究では牛乳中の成分について、培養小腸上皮細胞の増殖、分化に影響を及ぼす成分を検索した。体内に取り込まれた食品は小腸において消化、吸収されることから、乳などの食品成分が実際に体内でも小腸上皮細胞と直接相互作用し、何らかの機能を及ぼしている可能性がある。ここでは、ラット乳児由来の確立された小腸上皮細胞株 (IEC-6) を乳成分と共に培養することによって、細胞の増殖や分化への影響を調べた。器官や動物体を用いた実験とは異なり、培養系を用いることによって、上皮細胞と物質との相互作用を他の成分や細胞の影響を受けずに活性成分の検索をすることができると考えられる。IEC-6 は、細胞増殖因子として良く知られている EGF、トランスフェリンなどによって増殖し、TGF- $\beta$  によって分化が誘導されることも既に研究されており、小腸上皮細胞の増殖、分化を調べるうえで良いモデルになると期待できる。ここでは、この細胞の増殖を MTT アッセイで調べ、また分化の誘導をアルカリフォスファターゼ (ALP) 及びマルターゼの活性上昇を測定することによって検定した。また、乳成分としてヒトカゼイン及びそれを消化酵素によって分解したものの活性を調べた。

### 〔材料及び方法〕

ウシの全カゼインは、脱脂乳から等電沈殿することによって、調製した。これをトリプシン、キモトリプシンまたはペプシンによって分解した。IEC-6 をこれらの試料と共に 3 日間培養した。MTT アッセイは常法に従った。細胞を可溶化した後、蛋

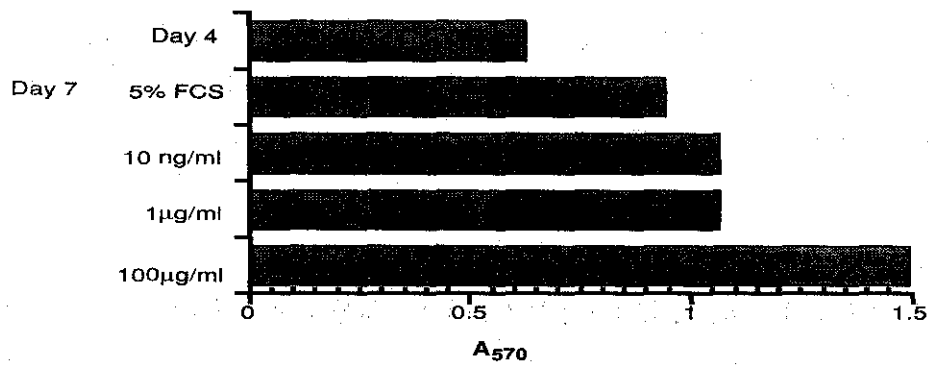
白質量を測定した。ALP活性は、p-ニトロフェニルリン酸から生成するp-ニトロフェノールの量を定量することによって、測定した。マルターゼ活性は、マルトースから生成するグルコースを定量することによって測定した。

#### 〔結果〕

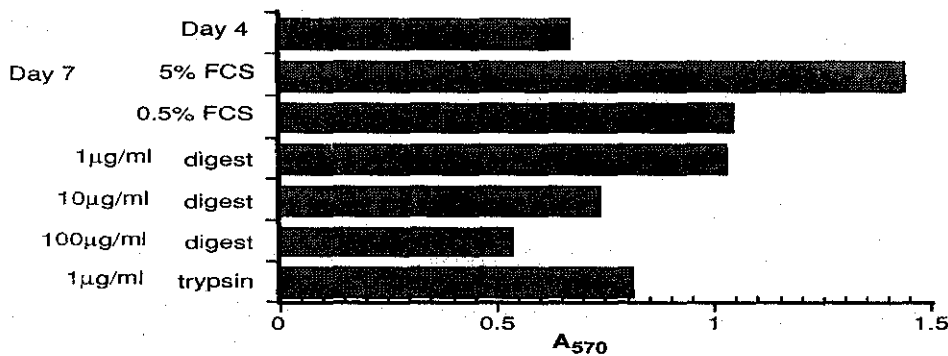
全カゼインは、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度でわずかな細胞増殖を引き起こした。トリプシン分解物については、細胞増殖の抑制が認められたが、コントロールとして設定したトリプシンとトリプシンインヒビターのみを細胞と共に培養した場合にも増殖抑制が観察され、トリプシン分解物だけにこの活性があるかどうかは判定できなかった。キモトリプシン分解物及びペプシン分解物は細胞増殖を抑制した。またペプシン分解物によるマルターゼの活性の上昇が認められた。

#### 〔考察〕

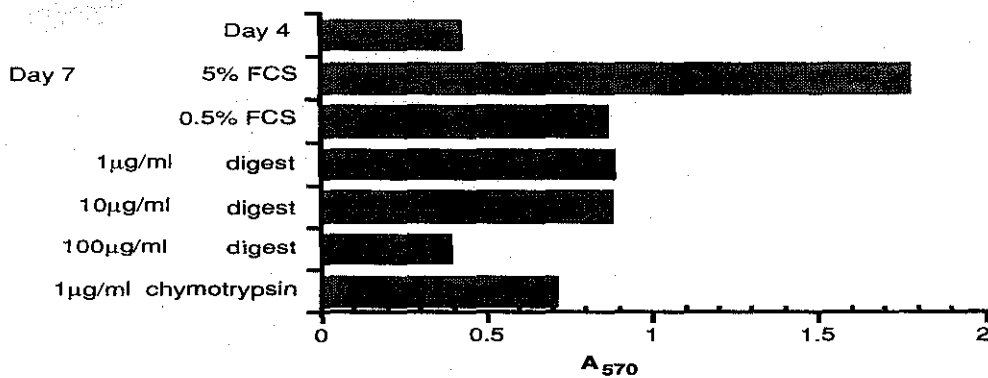
全カゼイン画分により細胞増殖の促進が認められたが、ここで用いたカゼインは精製されたものではないので、カゼイン画分中に含まれる未知の成分であり、内生的な増殖因子である可能性もある。一方、マルターゼ活性の上昇は細胞が分化したことを示唆しており、ペプシン分解物中には細胞分化を引き起こすペプチドが含まれている可能性がある。すなわちそのようなペプチドは、カゼインを摂取してから消化管内で消化酵素であるペプシンによって分解されてから、生成することになる。したがって、牛乳中には、小腸の機能に関わる因子が様々な形で存在することを示している。今後このような成分を同定し、作用機構を分子レベルで解明し、また動物体に与えることによって生じる影響を解析することによって、数々の知見が得られると考えた。



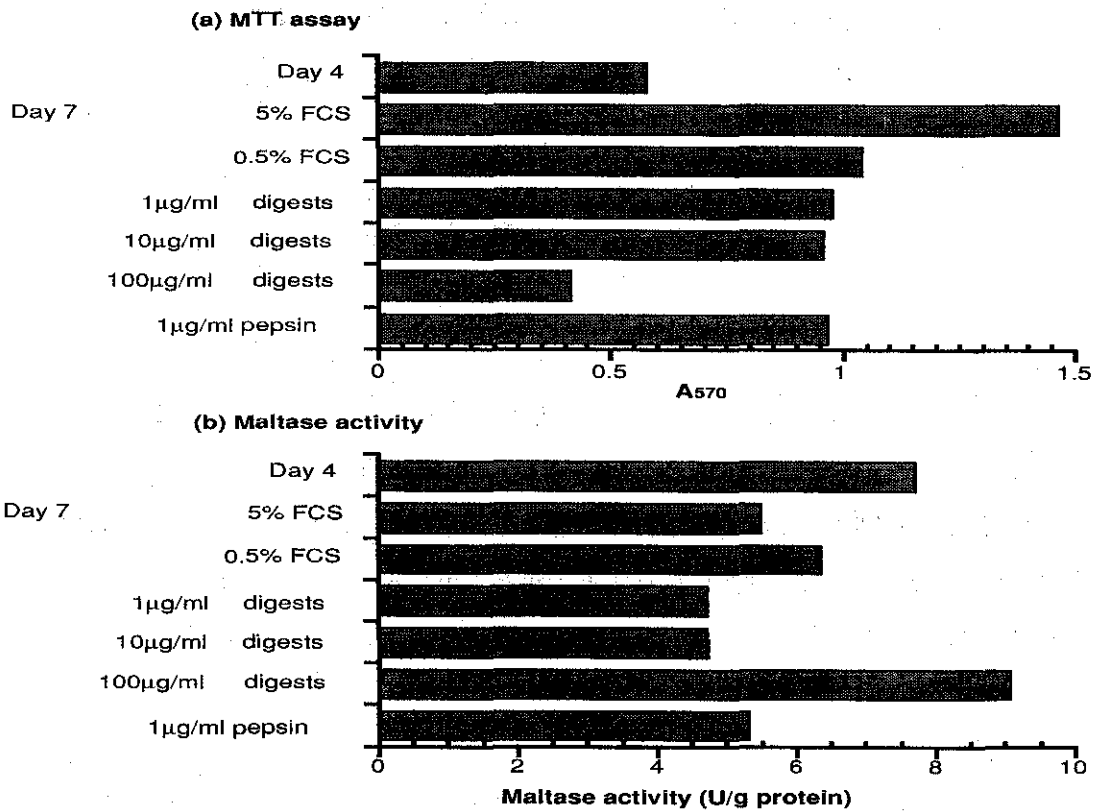
**Fig. 1 Cell growth of IEC-6 cultured with bovine whole casein**  
Casein was added on day 4 at indicated concentrations and MTT assay was performed on day 7.



**Fig. 2 Cell growth of IEC-6 cultured with trypsin digest from bovine casein**  
Digests were added to cell cultures on day 4 and MTT assay was performed on day 7. Cells were cultured with 5% FCS, or with 0.5% FCS and digests (or trypsin).



**Fig. 3 Cell growth of IEC-6 cultured with chymotrypsin digests from bovine casein**  
Samples were added to cell cultures on day 4 and MTT assay was performed on day 7. Cells were cultured with 5% FCS, or with 0.5% FCS and digests (or chymotrypsin).



**Fig. 4 Cell growth and maltase induction of IEC-6 cultured with pepsin digests from bovine whole casein**

Samples were added to cell cultures on day 4 and assays were performed on day 7. Cells were cultured with 5% FCS, or with 0.5 % FCS and digests (or pepsin).