

牛乳タンパク質による腸細胞増殖阻害と その感染予防及び治療への応用

岐阜大学農学部生物資源利用学科教授 金丸 義 敬

要 約

in vitro での培養腸細胞の増殖及びin vivo でのヒトロタウイルスによる乳飲みマウス下痢症に及ぼす牛乳の主要乳清タンパク質 -ラクトアルブミン (-LA) と -ラクトグロブリン (-LG) の影響を検討した。ネイティブモノマーの -LA は培養腸細胞の増殖を有意に促進させたが、還元条件下のSDS-PAGE で非解離性 (SDS 安定性) のダイマー/オリゴマーを含む状態では細胞死を誘導した。同様に、ネイティブダイマーの -LG は培養腸細胞の増殖を有意に促進させたが、SDS 安定性ダイマー/オリゴマーを含む状態では細胞増殖の停止を引き起こした。ロタウイルス感染後の乳飲みマウスへのネイティブモノマー -LA の経口投与は感染からの回復を穏やかに促進させた。一方、SDS 安定性ダイマー/オリゴマー含有 -LA の経口投与は下痢の劇的治癒をもたらした。同様に、ネイティブダイマー -LGの経口投与は感染からの回復を著しく促進させ、また、SDS ダイマー/オリゴマー含有 -LG の経口投与は有意な下痢の治癒効果を示した。以上から、in vitro で認められる牛乳乳清の主要タンパク質による細胞増殖制御作用は、促進及び阻害のいずれの場合においても、in vivo での有効な整腸作用につながるものと考えられる。

キーワード： -ラクトアルブミン、 -ラクトグロブリン、IEC-6 細胞、Caco-2 細胞、ロタウイルス下痢症動物実験モデル

1 . 目的

研究の背景

昨年度までの研究において、 -ラクトアルブミンと -ラクトグロブリンという二つの主要な牛乳乳清タンパク質が、腸培養細胞の増殖を強力に促進あるいは阻害するという意外な性質を示すことが浮き彫りとなった。いずれの場合も、促進もしくは阻害の作用は、分子形態の違いに起因するかたちで生じるらしい。すなわち、 -ラクトアルブミンではネイティブモノマー、 -ラクトグロブリンではネイティブダイマーの状態にある場合、細胞増殖を強力に促進させる。一方、還元条件下のSDS-PAGE において非解離性 (SDS安定性) のダイマー/オリゴマーを伴う状態にある場合、両者とも細胞増殖を強力に阻害する。しかし、この細胞増殖阻害作用の内容は両者で異なり、 -ラクトアルブミンは細胞を傷害し、細胞死 (アポトーシス) を誘導するのに対して、 -ラクトグロブリンは細胞の増殖を停止させる一方で、機能上の分化を誘導する働きを持つらしい。

新生動物の腸細胞は機能的に未熟で、成長に伴って徐々に成熟へと向かうと考えられるが、その過程での乳タンパク質の影響は重大である。乳タンパク質は一方で未熟な細胞を速やかに成熟状態へと分化させる働きを持つことも要求されるであろうし、他方で未熟細胞が感染やがん化といった不都合な状態に陥った場合、それらを速やかに排除する働きを示すことも要求されるだろう。そういった観点から眺めた場合、我々が新たに見出した二つの主要牛乳タンパク質による腸細胞の成長調節は乳成分の作用としてきわめて合理的なものと考えられる。従来 α -ラクトアルブミンや β -ラクトグロブリンの乳における存在意義は、前者がすでによく知られているように乳糖合成における必須の補助タンパク質として、後者は不明な点が多いものの脂溶性成分の輸送体として位置付けられている。我々の発見はこの二つの乳タンパク質の機能に細胞成長調節作用という新たな側面を付加する必要性を強く示唆しており、乳タンパク質の生物機能を正しく理解する上できわめて重要と考えられる。

研究の目的

本研究は α -ラクトアルブミンと β -ラクトグロブリンという二つの主要牛乳タンパク質の腸細胞成長調節作用を主として次のような二つの観点から検討しようとするものである。

- 1) 培養細胞系における活性・分子構造相関の検討：電気泳動やクロマトグラフィーなどのタンパク質分離技術や種々の生化学的手法を用いて分子レベルで、また共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメトリーといった手法を用いて細胞レベルで、腸細胞成長調節作用の特性を分子構造との関連から明らかにする。
- 2) 動物実験系における感染の予防及び治療に対する効果の評価：ヒトロタウイルス感染の動物実験系を用いて、感染前後の経口投与が下痢の発症及び下痢からの回復に及ぼす影響を具体的に評価する。

平成16年度は、細胞増殖促進作用を示すネイティブモノマー(α -ラクトアルブミン)もしくはネイティブダイマー(β -ラクトグロブリン)から増殖阻害作用を示すSDS安定性ダイマー/オリゴマー含有状態への変換について検討し、また、そういった促進性もしくは阻害性タンパク質の経口投与がヒトロタウイルスにより引き起こされる乳飲みマウスの下痢症からの回復に及ぼす影響について検討した。

2. 材料及び方法

2.1. 材料

(1) 細胞

ATCCより購入し、液体窒素中に保存されていたラット小腸由来株化細胞 EC-6 及びヒト結腸癌由来株化細胞Caco-2を使用した。細胞は、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEMを用いて37℃、

5%CO₂、条件下で培養した。継代は、3～5日毎に行った。すなわち、コンフルエントに達した細胞表面を10mlのPBSで洗い、上清を吸引除去した後、5mlのPBSで細胞表面を再び洗った。4mlのトリプシン-EDTA-2Na 溶液（0.25%のトリプシンと0.3%のEDTA-2Na を含むPBS溶液）を入れ、dish を静かに揺らして均一になるように攪拌し、細胞が円球化するのを顕微鏡で観察してから、DMEM を4ml添加した。メスピペットで繰り返し攪拌し、細胞懸濁液を50 ml の遠心チューブに移した。再びメスピペットでよく懸濁した後、1000rpm で5分間遠心分離した。上清を吸引除去し、10%FCS を含むDMEM を10ml加えて懸濁した。攪拌後すぐに200 μl をとり、Neubauer 型血球計算盤を用いて細胞数を計算した。細胞の生死はトリパンブルー染色で調べた。

(2) タンパク質

-LA 及び -LG はホルスタイン乳牛の常乳から調製した。簡単に述べると、生乳から定法に従って脱脂乳を得た後、1 N のHCl を加えてpH を4.6に調整し、カゼインを凝固沈殿させた。3000rpm、20分間、20 の遠心分離により上清の乳清を分離した。限外濾過（分子量300万カットオフの膜）によって乳清タンパク質を分画し、低分子量タンパク質を含む過液を回収し、蒸留水に対する48時間の透析を経て、凍結乾燥した（低分子量乳清タンパク質濃縮物、LWPC）。このLWPCをさらにゲルろ過に供することによって、両タンパク質を分離した。

2.2. 方法

2.2.1. WST-1 法

10cm dish 中でコンフルエントになったIEC-6 細胞をトリプシン処理し、10%のFCS を含むDMEM に懸濁した。1000 rpm で5分間遠心して上清を吸引除去した後、 1×10^4 cells/cm²になるように細胞懸濁液を調製し、96穴プレートに100 μl ずつ播いた。5% CO₂、37 で5時間前培養し、細胞が接着したことを確認した後、100 μl の試験培地に交換した。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、10% FCS を含むDMEM を各ウェルに100 μl、WST-1試薬（和光純薬工業、Cell Counting Kit）を10 μl ずつ加え、37 で2時間、5% CO₂ インキュベーターで培養した後、マイクロプレートリーダーにより450nm で吸光度を測定した。

2.2.2. 乳飲みマウスでのヒトロタウイルスによる下痢からの回復に及ぼす牛乳タンパク質の影響

本実験で用いた方法は、一匹の母親マウスから生まれた同腹マウスを一群とし、生後5日齢の乳飲みマウスへのヒトロタウイルスMO株（ 2×10^7 FCFU）の経口接種によって引き起こされる下痢の発症に関して、ウイルス接種前1時間の時点で経口投与したサンプルの感染予防効果を調べるために開発された方法に基づいている。今回の実験ではこれを修正し、ウイルス接種による下痢発症後、

すなわちウイルス接種後 1 日目、感染を確認してから経口摂取させたサンプルによる下痢からの回復期間の短縮について、毎日の糞の観察によって評価した。Fig.1 にその方法を模式的に示している。

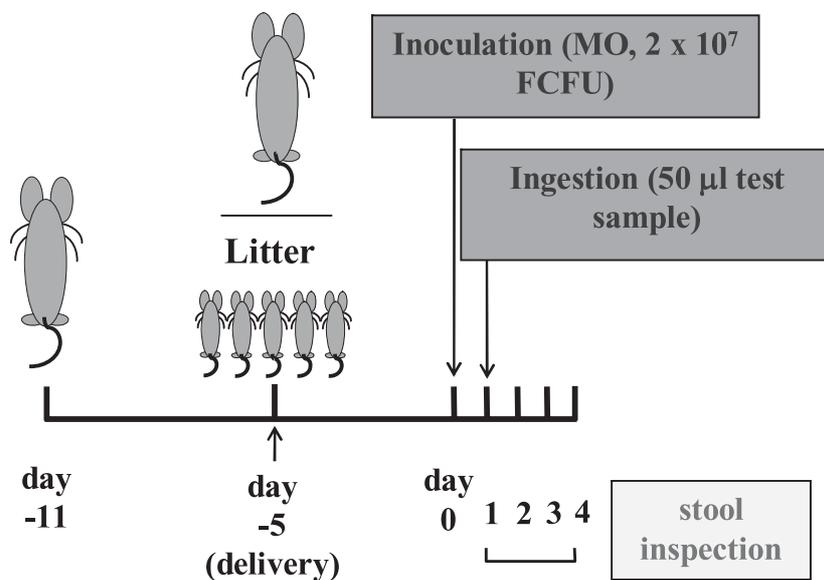


Fig . 1 . ヒトロタウイルスが引き起こす下痢からの回復を評価するための動物モデル

2 . 2 . 3 . クロマトグラフィー

Sephacryl S100 もしくはSuperdex 75 のゲル濾過クロマトグラフィーによる分画はAKTA Explorer 10S によって自動処理した。

2 . 2 . 4 . 電気泳動

電気泳動には、Laemmli の方法に従ってSDS-PAGE を用いた。

3 . 結果と考察

3 . 1 . ネイティブモノマー -ラクトアルブミン及びネイティブダイマー -ラクトグロブリンの分離

通常の生理条件下では、 -ラクトアルブミンはモノマー状態、 -ラクトグロブリンはダイマー状態をとることが知られている。市販の精製牛乳タンパク質を用いた前年度までの研究から、ネイティブ状態にある場合、両タンパク質とも腸細胞の増殖において強力な促進作用を発揮することが指摘されている。こういった作用が通常の方法によって分離されるそれらの乳清タンパク質にも観察されることを確認するために、ホルスタイン乳牛の常乳からネイティブ状態にある両タンパク質をそれぞれ分離した。

定法によって得た常乳の乳清を限外濾過し、低分子量乳清タンパク質濃縮物 (LWPC) を得た。これをSephacryl S100 のゲルろ過に供し、分子サイズに基づく乳清タンパク質の分離を行った。そ

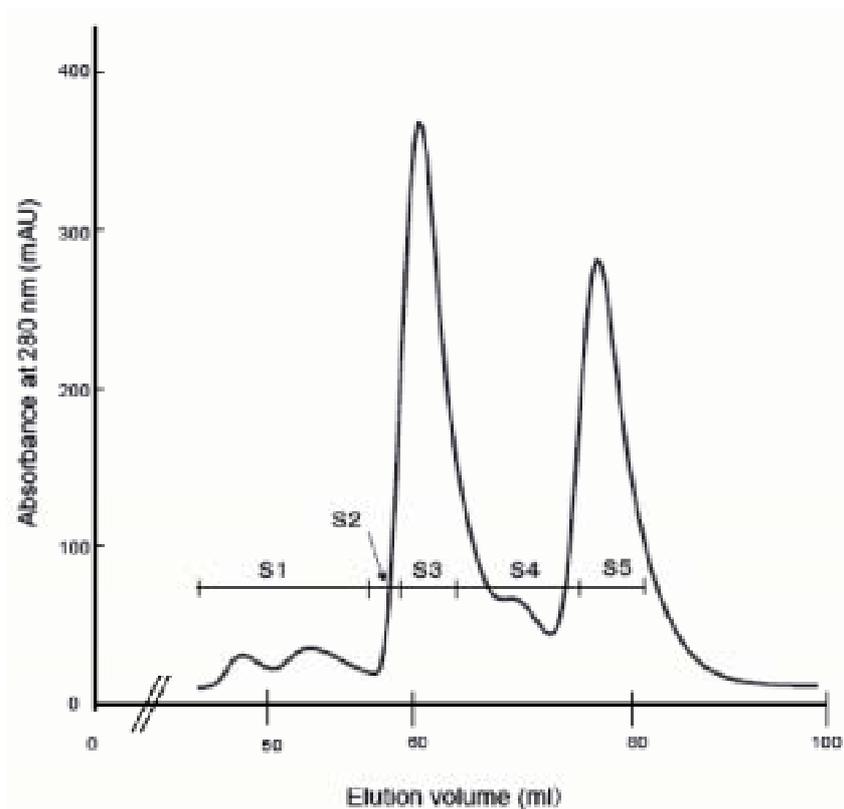


Fig. 2 . 低分子量乳清タンパク質濃縮物 (LWPC) からの γ -ラクトアルブミンネイティブモノマー及び γ -ラクトグロブリンネイティブダイマーの分離。Sephacryl S 100 カラム (5 x 60 cm) にLWPCを供し、乳清タンパク質を分離した。S3 に γ -ラクトグロブリンネイティブダイマー (37K) が、また、S5 に γ -ラクトアルブミンネイティブモノマー (14K) が溶出した。

の結果をFig.2に示している。図中に指摘しているように5つのフラクションを得たが、このうち、S3 とS5 がそれぞれ分子量37K と14K に相当し、それぞれネイティブ状態の γ -ラクトグロブリンダイマーと γ -ラクトアルブミンモノマーであると考えられた。

得られた5つのフラクションについてSDS-PAGE/イムノプロットングによってそれぞれの分子の同定とサイズ及び純度を確認した。結果をFig.3 に示している。CBB 染色 (Fig.3、上) ではS3 に分子量18K のバンド、S5 には分子量14K のバンドが主として認められた。同一試料に関して、抗ウシ γ -ラクトアルブミン特異的抗血清及び抗ウシ γ -ラクトグロブリンモノクローナル抗体を用いたイムノプロットングを行った。抗ウシ γ -ラクトアルブミンを用いた結果 (Fig.3、中間) では、S4 及びS5 に強い反応性バンドが認められた。特に、S5 には14K の反応が顕著に認められ、18K のバンドも付随的に認められた。18K バンドはS4において主要な抗ウシ γ -ラクトアルブミン抗血清反応バンドであった。特異抗血清に対して比較的強い反応性を示すこの18K 成分の実体は現在のところ不明である。CBB 染色結果ではS5 中でこの18K バンドが相対的に微量なことから、このS5 に関してゲルろ過を繰り返すことによって最終精製ネイティブモノマー γ -ラクトアルブミンを得た。

一方、抗ウシ γ -ラクトグロブリンモノクローナル抗体を用いたイムノプロットング (Fig.3、下) では、予期されたようにS3に強い反応性を持つ18K のバンドが現れた。すなわち、このバンドは、

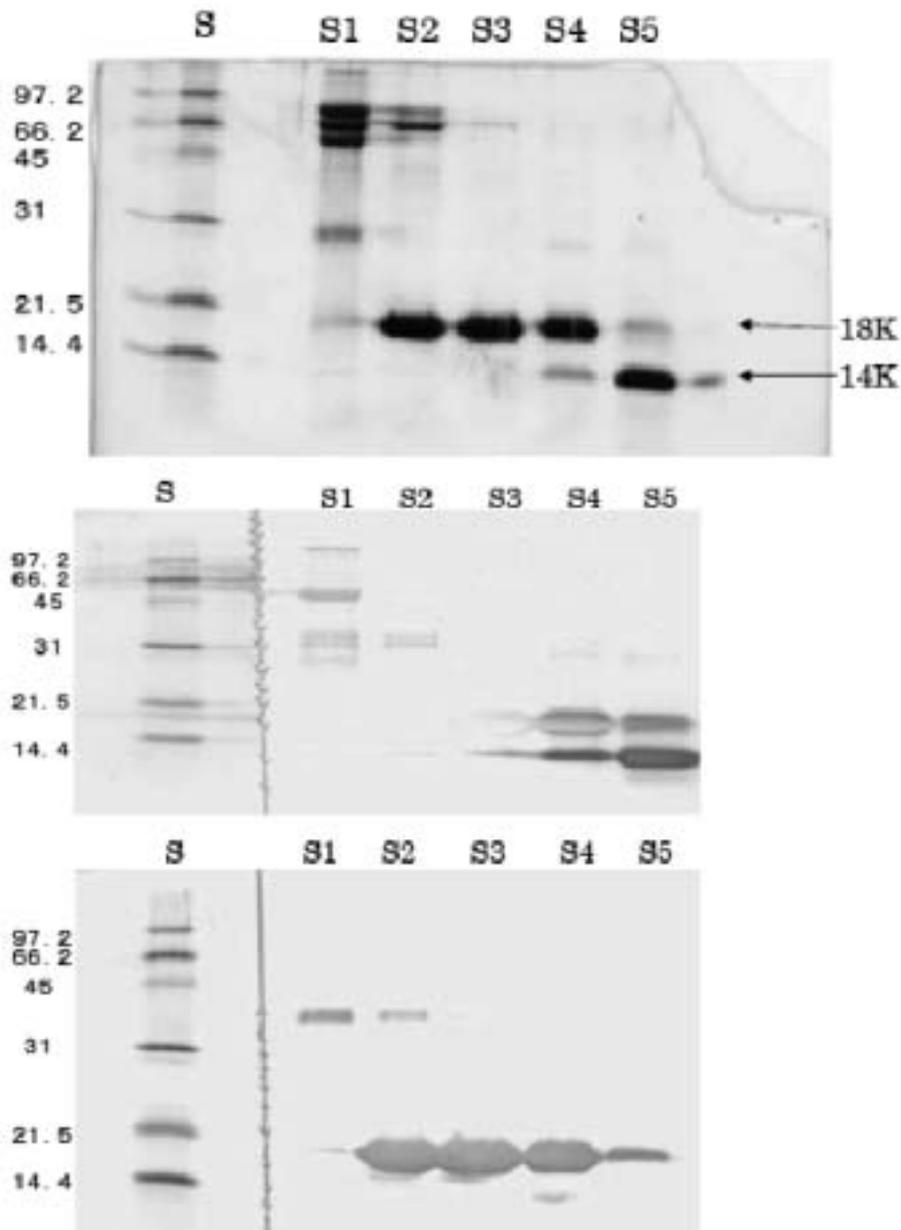


Fig. 3. Sephacryl S100 で分離したS1~S5フラクションのSDS-PAGE/イムノプロットングパターン
 上はCBB染色したもの、中間は抗ウシ β -ラクトアルブミン特異抗血清で処理したもの、下は抗ウシ β -ラクト
 グロブリンモノクローナル抗体で処理したもの。S は分子量マーカーである。

ゲルろ過では37K のピークに溶出したダイマーを形成するネイティブ分子が還元条件下のSDS-
 PAGE でモノマーに解離した結果と考えられた。S3 には他のバンドがほとんど認められず、このS3
 に関してゲルろ過を繰り返すことによって最終精製ネイティブダイマー β -ラクトグロブリンを得た。

3.2. ネイティブモノマーもしくはネイティブダイマーからのSDS安定性ダイマー/オリゴマー の生成

昨年までの研究から、腸細胞増殖を強く阻害する作用を示す牛乳タンパク質は、還元条件下の
 SDS-PAGE において非解離性 (SDS 安定性) のダイマー/オリゴマーの生成を伴うことが指摘され
 ている。上記のように分離したネイティブモノマー (β -ラクトアルブミン) もしくはネイティブダ

イマー（ α -ラクトグロブリン）は、Fig.3 に示されているように、SDS 安定性ダイマー/オリゴマーを含まない。そこで、SDS 安定性ダイマー/オリゴマーの生成を促す適当なバッファー条件を検討した。

種々のバッファー中で数時間から数日間インキュベーションした後に得られた試料のSDS-PAGE/イムノプロットのパターンを分析した結果、以下のようなバッファー及びインキュベーション条件がSDS 安定性ダイマー/オリゴマー形成に適当であると結論付けた。すなわち、

α -ラクトアルブミン：30%トリフルオロエタノール（TFE）を含む50mM の酢酸バッファー（pH 5.5）中、5日間

β -ラクトグロブリン：25%のTFE を含む20 mM のTris-HCl バッファー（pH 8.0）中、2日間である。

以上のようなインキュベーション処理前後のSDS-PAGE/イムノプロットパターン及び培養腸細胞の増殖に及ぼす影響について、それぞれのタンパク質について検討した結果をFig. 4～Fig. 9に示す。

TFE 含有バッファー中での α -ラクトアルブミンのネイティブモノマーの長期間インキュベ

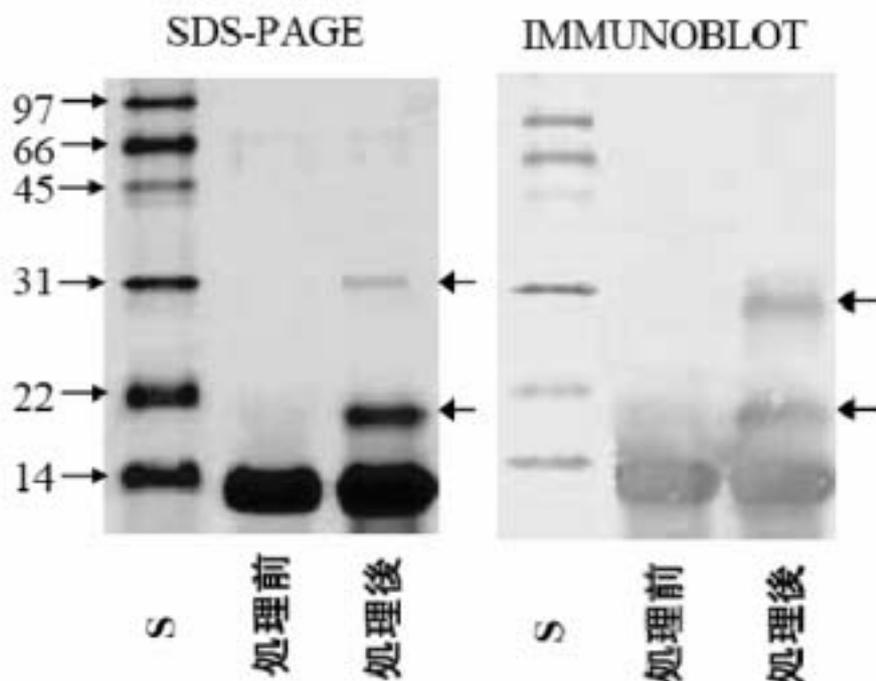


Fig. 4. TFE 含有バッファー処理前後の α -ラクトアルブミンネイティブモノマーのSDS-PAGE/イムノプロットパターン

処理前のネイティブモノマーには14K バンドのみ、また、処理後の試料中には18K とともに30K のSDS 安定性ダイマーバンド（矢印）の生成が明らかに認められる。S は分子量マーカー。

ン処理によって、Fig.4 に示しているように、処理前には認められなかったSDS 安定性ダイマーの生成が明らかに認められるようになった。また、Fig.5 から、処理前のネイティブモノマーにはIEC-6細胞の増殖を促進させる作用が認められ、一方、処理後の試料がIEC-6細胞の増殖を顕著に阻害する作用を示すことも明らかに示された。無血清DMEM培地中でのIEC-6細胞の増殖でも同様の作用

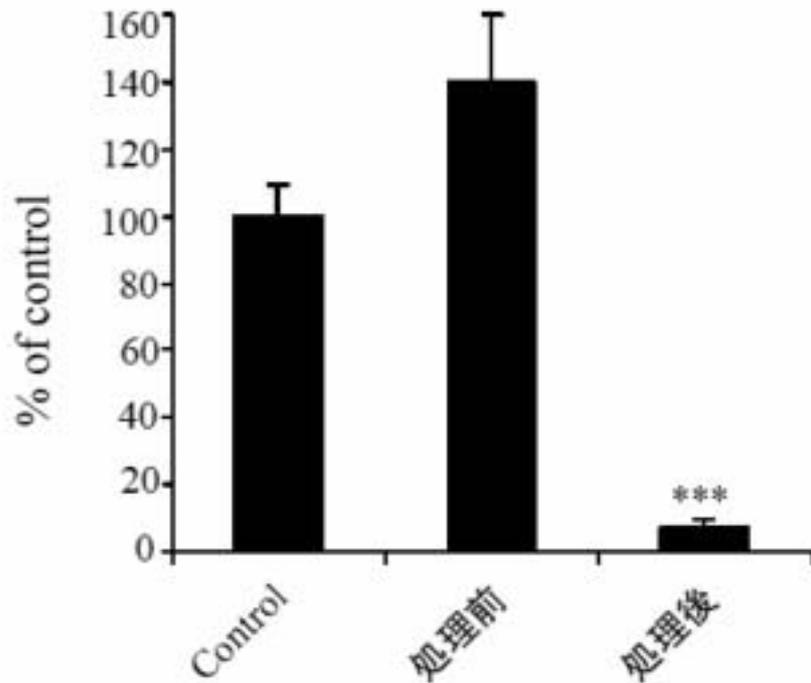


Fig. 5 . IEC-6 細胞増殖に及ぼすTFE 含有バッファー処理前後の α -ラクトアルブミンネイティブモノマーの影響

細胞増殖をWST-1 法により評価した。蛋白質試料を含まない10% FCS 含有DMEM 培地中での2 日間のIEC-6 細胞の増殖をコントロール(100%)としたときの蛋白質試料(10mg/ml)を含む同一培地での増殖を割合で示している。処理前のネイティブモノマーには増殖促進が、また、処理後の試料には増殖の阻害が顕著に認められる。

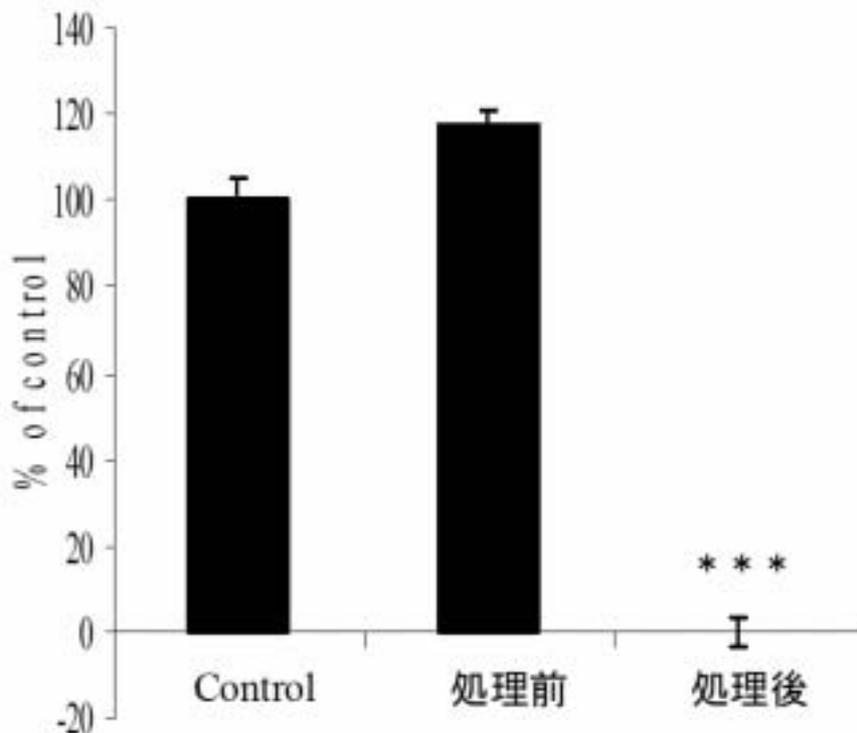


Fig. 6 . Caco-2 細胞増殖に及ぼすTFE 含有バッファー処理前後の α -ラクトアルブミンネイティブモノマーの影響

細胞増殖をWST-1 法により評価した。蛋白質試料を含まない10% FCS 含有DMEM 培地中での2 日間のIEC-6 細胞の増殖をコントロール(100%)としたときの蛋白質試料(10 mg/ml)を含む同一培地での増殖を割合で示している。処理前のネイティブモノマーには増殖促進が、また、処理後の試料には増殖の阻害が顕著に認められる。

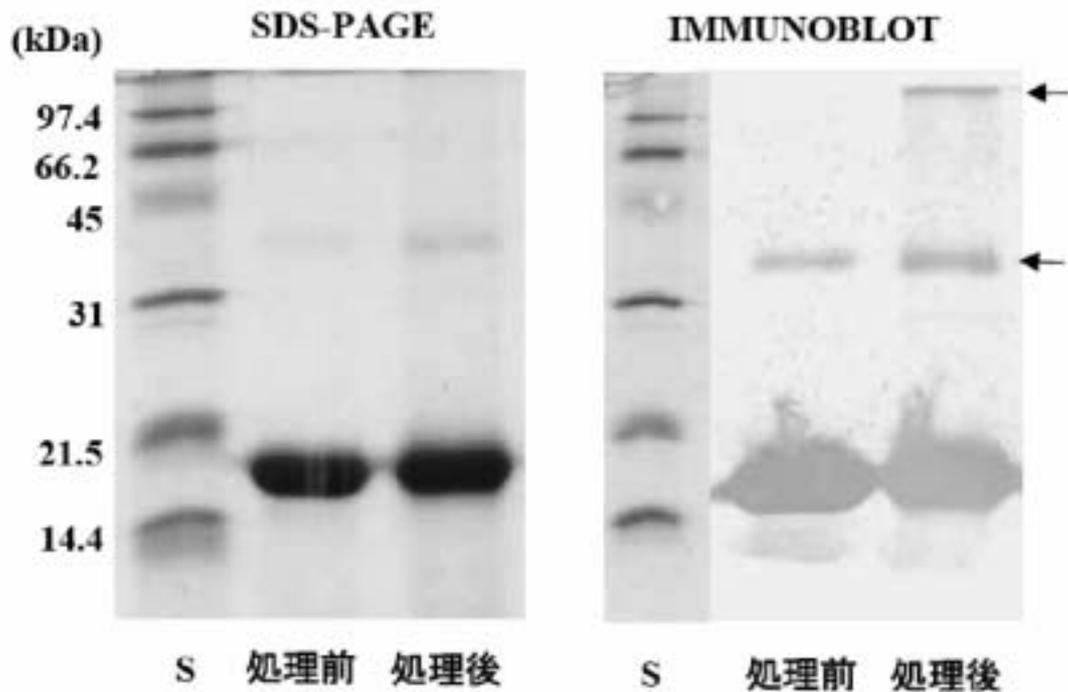


Fig. 7. TFE 含有バッファー処理前後の β -ラクトグロブリンネイティブダイマーのSDS-PAGE/イムノブロットングパターン

処理前のネイティブダイマーには18K モノマーバンドときわめてわずかな37K ダイマーが認められたが、処理後の試料中には37K のSDS 安定性ダイマーバンド (矢印) が増加するとともにゲル先端付近のオリゴマーの生成が明らかに認められる。S は分子量マーカー。

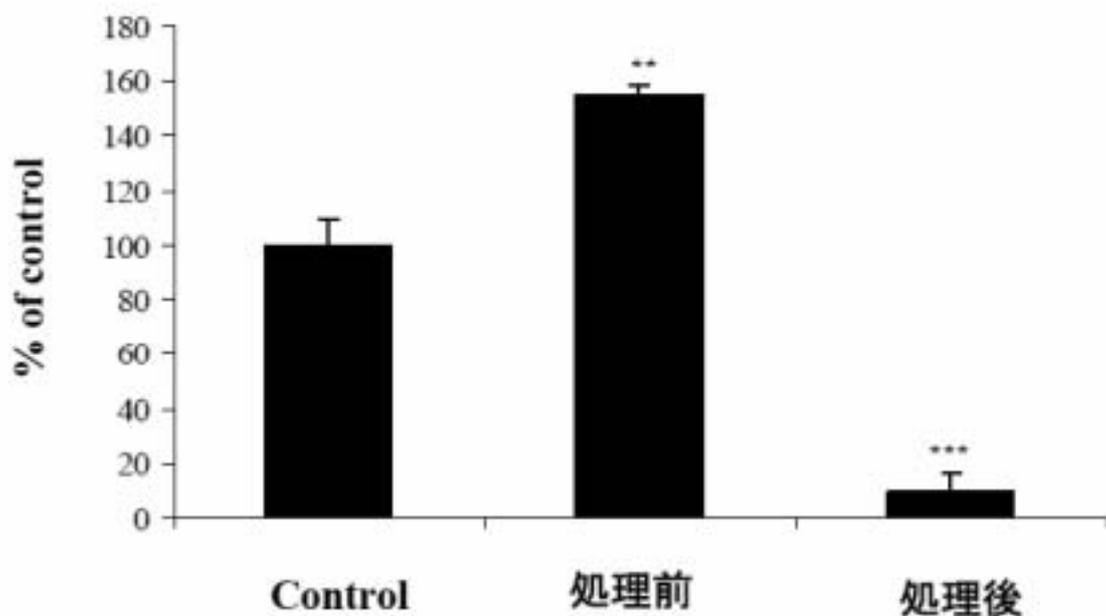


Fig. 8. IEC-6 細胞増殖に及ぼすTFE 含有バッファー処理前後の β -ラクトグロブリンネイティブダイマーの影響

細胞増殖をWST-1 法により評価した。タンパク質試料を含まない10% FCS 含有DMEM 培地中での2 日間のIEC-6 細胞の増殖をコントロール (100%) としたときのタンパク質試料 (10 mg/ml) を含む同一培地での増殖を割合で示している。処理前のネイティブダイマーには増殖促進が、また、処理後の試料には増殖の阻害が顕著に認められる。

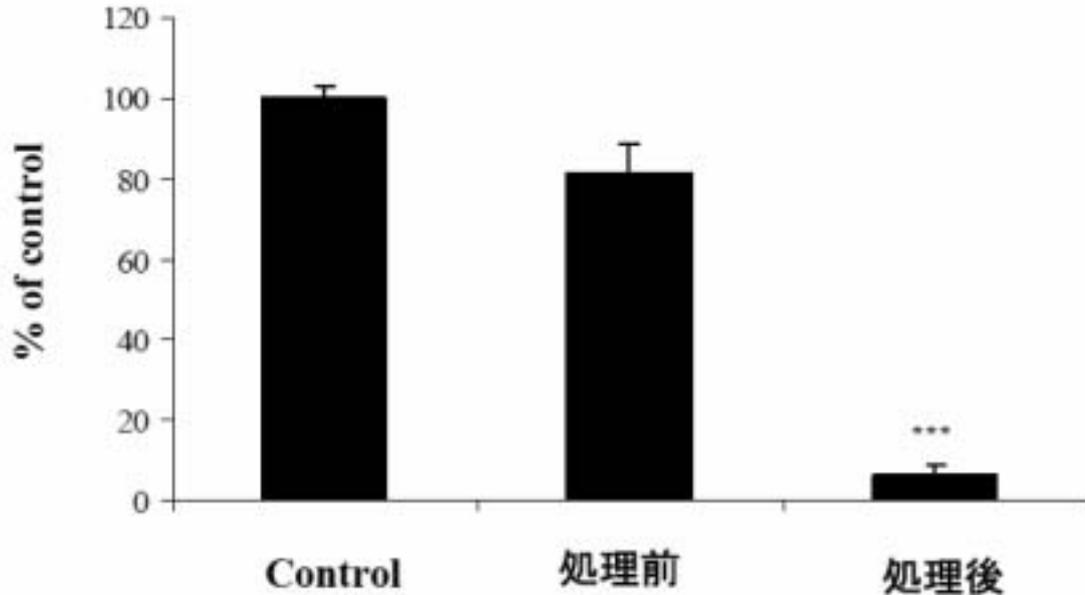


Fig. 9. Caco-2 細胞増殖に及ぼす TFE 含有バッファー処理前後の γ -ラクトグロブリンネイティブダイマーの影響

細胞増殖を WST-1 法により評価した。タンパク質試料を含まない 10% FCS 含有 DMEM 培地中での 2 日間の Caco-2 細胞の増殖をコントロール (100%) とし、タンパク質試料 (10mg/ml) を含む同一培地での増殖を割合で示している。処理前のネイティブダイマーに増殖増殖への影響はほとんど認められないが、処理後の試料には増殖の阻害が顕著に認められる。

が認められた (データは示していない)。

こういった SDS 安定性ダイマー/オリゴマー含有 γ -ラクトアルブミンによる増殖阻害は不可逆的に生じ、細胞を死滅される結果であることが示されている。以上のような TFE 含有バッファー処理前後の γ -ラクトアルブミンの分子形態が細胞増殖に与える影響の違いは Caco-2 細胞においても同様に認められた。その結果を、Fig.6 に示している。

同様に、TFE 含有バッファー中でのインキュベーションによって、ネイティブダイマーからの SDS 安定性ダイマー/オリゴマー形成が γ -ラクトグロブリンでも確認された (Fig.7)。また、Fig.8 に示しているように、インキュベーション処理前の試料には、 γ -ラクトアルブミンと同様、IEC-6 細胞に対する顕著な増殖促進作用が認められた。また、インキュベーション処理後の試料には顕著な増殖阻害作用が認められた。

一方、Caco-2 細胞を用いた検討では、IEC-6 細胞の場合とは異なり、処理前の試料に増殖促進作用は認められなかった (Fig.9)。しかし、処理後の試料には IEC-6 細胞の場合と同様の増殖阻害効果が明らかに認められた。

以上のように、WST-1 測定による増殖への影響評価では、TFE バッファー処理後の両タンパク質にはいずれも増殖阻害作用が生じる。しかし、前述しているが、 γ -ラクトアルブミンの場合は細胞タイプにかかわらず細胞死が誘導されるのに対して、 γ -ラクトグロブリンの阻害作用は細胞タイプによって異なり、IEC-6 細胞に対しては可逆的で、培地から除くことによって細胞は再び増殖を開

始し、一方で、Caco-2 細胞では γ -ラクトアルブミンと同様に細胞死が誘導され、不可逆的に細胞は死滅する（データは示していない）。これらの結果は、SDS 安定性ダイマー/オリゴマーに対する IEC-6 細胞とCaco-2 細胞の感受性の違いを反映するものと考えられる。すなわち、正常なクリプト細胞を現すとされているIEC-6 細胞は、SDS 安定性ダイマー/オリゴマー分子種の構造上の違いを読み取り、 γ -ラクトアルブミンの場合は死滅する方向を選択し、 γ -ラクトグロブリンの場合は死滅することなく増殖を停止させる方向を選択するらしい。一方、癌化した細胞であるCaco-2 細胞は、SDS 安定性ダイマー/オリゴマーを画一的に認識し、いずれの場合でも細胞死を誘導する方向を選択するらしい。こういった増殖阻害の分子メカニズムについての細胞タイプ間の違いについては今後の詳細な検討が必要である。

3.3. 細胞増殖促進性もしくは阻害性タンパク質の経口投与がヒトロタウィルスにより引き起こされる乳飲みマウスの下痢症からの回復に及ぼす影響

3.3.1. γ -ラクトアルブミン投与の影響

上記のように調製したネイティブモノマー γ -ラクトアルブミンとSDS 安定性ダイマー/オリゴマー含有 γ -ラクトアルブミンをそれぞれヒトロタウィルスに感染させた乳飲みマウスに経口投与し、糞便検査によって下痢の発症を観察した。結果をFig.10及び11にまとめている。本実験モデルでは、

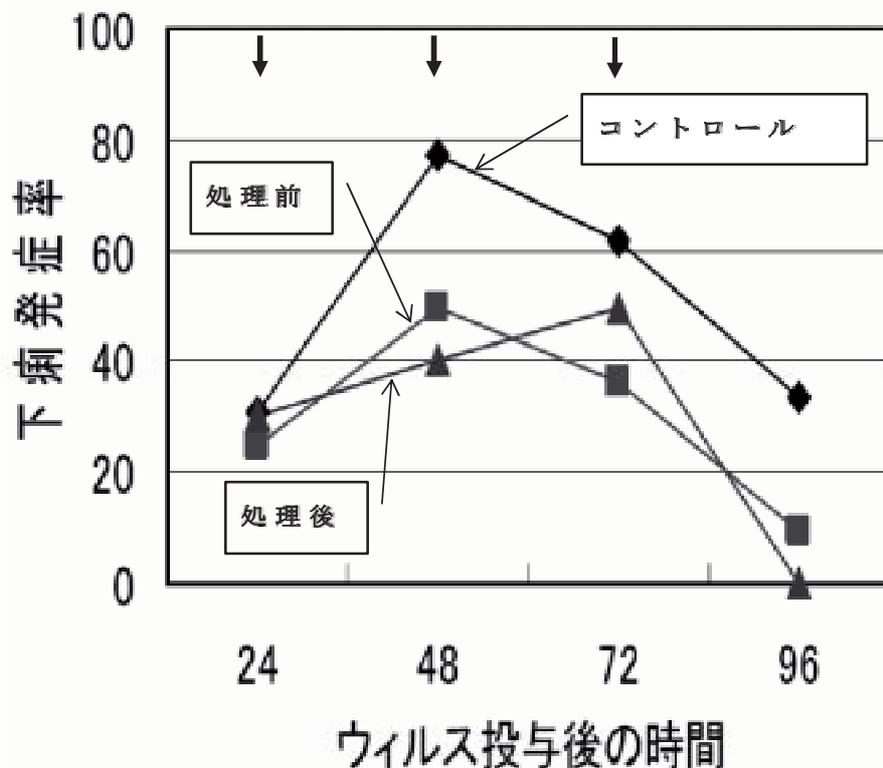


Fig. 10. TFE 含有バッファー処理前と処理後のネイティブモノマー γ -ラクトアルブミンの経口投与がヒトロタウィルスによる乳飲みマウスの下痢発症に及ぼす影響

乳飲みマウスにヒトロタウィルスMO 株を経口感染させた。感染後24 時間、48 時間、72 時間の時点（図中上部の矢印）で50 lの γ -ラクトアルブミンサンプル（50 mg/ml）を経口投与した。ウイルス投与後96 時間までの各時点で糞便を検査し、下痢の発症を観察した。コントロールは生理食塩水投与マウスである。

ウイルス接種後48時間の時点で下痢の発症が最も激しくなり、その後次第に症状の回復が認められることが明らかにされている。実際、コントロール群の下痢発症率はこの時点で80%近くに達した。Fig.10に示しているように、TFE含有バッファー処理の有無に関わらず、 γ -ラクトアルブミン投与群はいずれの場合も下痢の発症を著しく低下させた。すなわち、コントロール群で最も下痢発症が高かったウイルス接種後48時間の時点で、二つの γ -ラクトアルブミン投与群の下痢発症は40%もしくは50%に留まった。また、ウイルス接種96時間の時点で、コントロール群ではまだ30%以上のマウスが下痢を発症していたのに対して、処理後のサンプルを投与した群に下痢は観察されなかった。処理前のサンプルを投与した群では、いずれの時点でもコントロールに比べて下痢発症率は低く推移したが、その投与の影響は穏やかで、ウイルス投与後96時間の時点でも10%弱のマウスに下痢が認められた。一方、軟便状態も考慮した感染率を評価した場合にも、ほぼ同様のサンプル投与の影響が観察された (Fig.11)。この場合、ウイルス投与後72 時間の時点で、処理後の γ -ラクトアルブミンを投与した群で、コントロールと同等のレベルまで感染率が高くなる現象が認められた。しかし、96時間後には明らかな感染率の低下が認められたことから、72時間時点での感染率の増加は一時的現象であると考えられた。この一時的な感染率の増加の理由は現在のところ不明である。

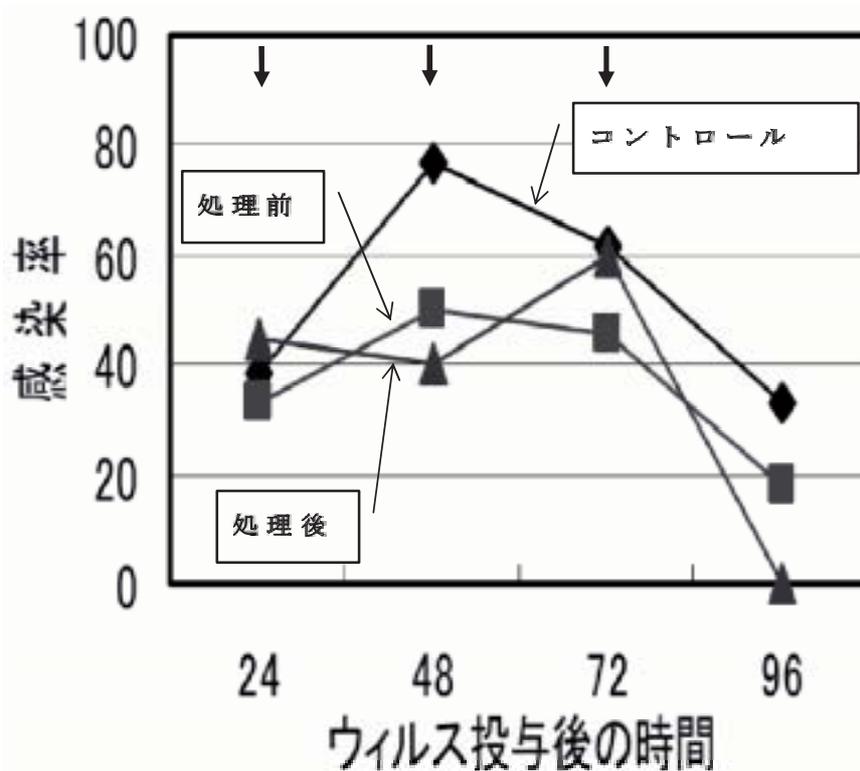


Fig. 11 . TFE 含有バッファー処理前と処理後のネイティブモノマー γ -ラクトアルブミンの経口投与がヒトロタウイルスによる乳飲みマウスの感染に及ぼす影響

乳飲みマウスにヒトロタウイルスMO 株を経口感染させた。感染後24時間、48時間、72時間の時点（図中上部の矢印）で50 lの γ -ラクトアルブミンサンプル（50mg/ml）を経口投与した。ウイルス投与後96時間までの各時点での糞便を検査した。下痢、軟便、正常便のスコアをそれぞれ2、1、0とし、各群中のマウス全てが下痢を起こしているとした場合のトータルスコアを100としたときの実際のトータルスコアの割合を感染率として表している。コントロールは生理食塩水投与マウスである。

3.3.2. γ -ラクトグロブリン投与の影響

γ -ラクトアルブミンと同様、TFE含有バッファー処理前後のネイティブダイマー γ -ラクトグロブリンの経口投与がヒトロタウイルスに感染した乳飲みマウスの下痢発症に及ぼす影響を同様の実験系を用いて検討した。その結果をFig.12及びFig.13にまとめている。

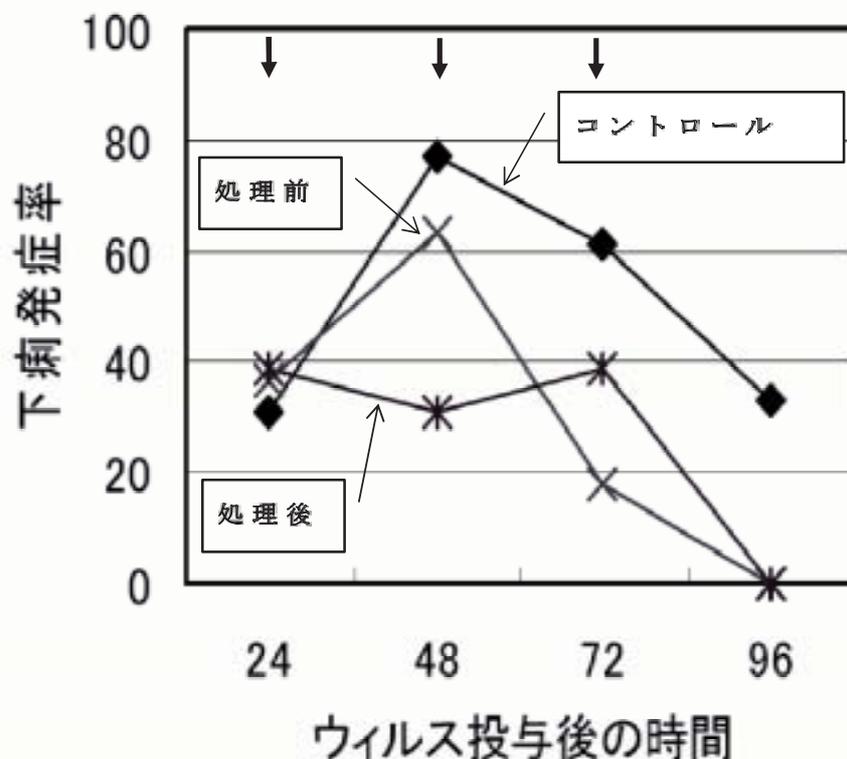


Fig. 12. TFE含有バッファー処理前と処理後のネイティブダイマー γ -ラクトグロブリンの経口投与がヒトロタウイルスによる乳飲みマウスの下痢発症に及ぼす影響

乳飲みマウスにヒトロタウイルスMO株を経口感染させた。感染後24時間、48時間、72時間の時点（図中上部の矢印）で50 lの γ -ラクトグロブリンサンプル（50mg/ml）を経口投与した。ウイルス投与後96時間までの各時点で糞便を検査し、下痢の発症を観察した。コントロールは生理食塩水投与マウスである。

Fig.12に示しているように、 γ -ラクトアルブミン投与の場合と同様、SDS安定性ダイマー/オリゴマー含有 γ -ラクトグロブリン（処理後サンプル）の投与はウイルス投与後48時間の時点での下痢発症を著しく低下させ、およそ30%のマウスにのみ下痢が観察された。また、やはり γ -ラクトアルブミン投与の場合と同様、72時間後に若干の下痢発症率の増加が認められたものの、96時間後には下痢は全く観察されなくなった。一方、ネイティブダイマー γ -ラクトグロブリンの経口投与では他の場合とかなり異なる観察が得られた。すなわち、この群ではウイルス投与後48時間の時点での下痢発症率が他に比べて高く、コントロールとほぼ同レベルの70%近くに達し、この時点での明らかな下痢の発症低下は観察されなかった。しかし、驚いたことに、この投与群では、72時間後の時点で下痢発症が20%以下のレベルまで急激に低下し、96時間後には全く観察されなくなった。すなわち、他の牛乳タンパク質群では一様にサンプル投与によって下痢発症の低下が観察されたのに対して、この群では下痢からの急速な回復が認められた。

軟便観察も含めてスコア化して表した感染状態の推移においてもほぼ同様の結果が得られた。結

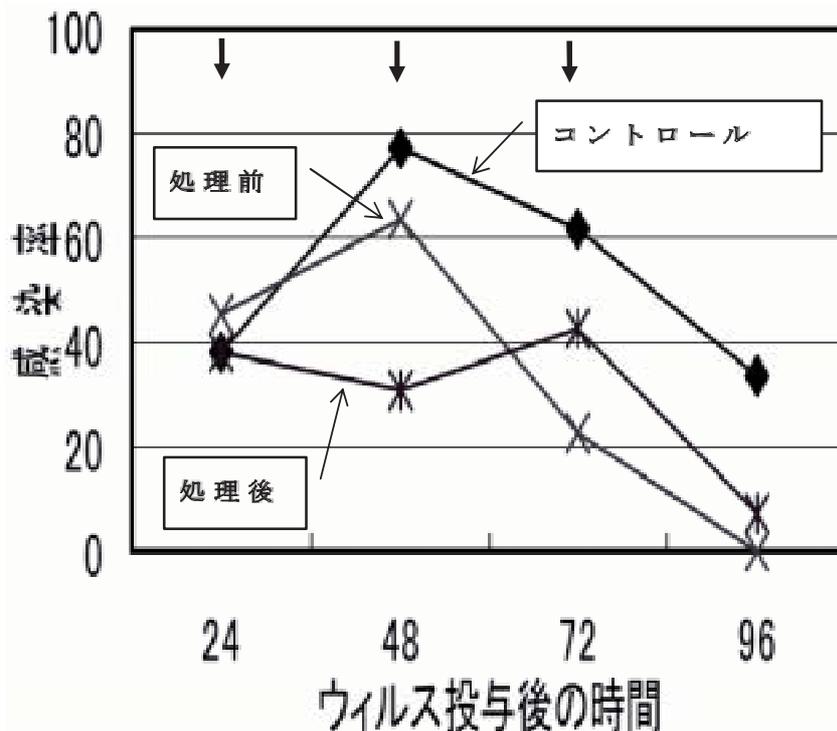


Fig. 13. TFE含有バッファー処理前と処理後のネイティブダイマー γ -ラクトグロブリンの経口投与がヒトロタウイルスによる乳飲みマウスの感染に及ぼす影響

乳飲みマウスにヒトロタウイルスMO株を経口感染させた。感染後24時間、48時間、72時間の時点（図中上部の矢印）で50 lの γ -ラクトグロブリンサンプル（50mg/ml）を経口投与した。ウイルス投与後96時間までの各時点での糞便を検査した。下痢、軟便、正常便のスコアをそれぞれ2、1、0とし、各群中のマウス全てが下痢を起こしているとした場合のトータルスコアを100としたときの実際のトータルスコアの割合を感染率として表している。コントロールは生理食塩水投与マウスである。

果をFig.13に示している。未処理のネイティブダイマー γ -ラクトグロブリン投与群では、ウイルス投与48時間後の感染が非常に高いが、その後急速な回復が認められ、96時間後にマウスは完全に回復した。一方で、SDS安定性ダイマー/オリゴマー含有サンプル（処理後サンプル）投与群では、感染率の著しい低下が認められるものの、わずかな比率ではあるが、96時間後の時点でも感染状態が観察された。

4. 結論

牛乳の主要乳清タンパク質である γ -ラクトアルブミンと γ -ラクトグロブリンは腸培養細胞の増殖に関して有意な影響を及ぼすことが確認された。すなわち、ホルスタイン乳牛の常乳から通常の方法で分離したネイティブモノマーの γ -LA は培養腸細胞の増殖を有意に促進させたが、還元条件下のSDS-PAGE で非解離性（SDS安定性）のダイマー/オリゴマー含有状態では細胞死を誘導した。同様に、ネイティブダイマーの γ -LG は培養腸細胞の増殖を有意に促進させたが、SDS 安定性ダイマー/オリゴマー含有状態では細胞増殖の停止を引き起こした。適当な濃度でTFE を含むバッファー中でのインキュベーションによって、ネイティブモノマー（ γ -ラクトアルブミン）もしくはネイテ

ィブダイマー（ β -ラクトグロブリン）からSDS安定性ダイマー/オリゴマー含有状態へ転換させることが出来た。

以上のような分子形態の異なる牛乳タンパク質のロタウィルス感染後の乳飲みマウスへの経口投与は、いずれの場合も感染に対して決定的な影響をもたらした。すなわち、ネイティブモノマー β -ラクトアルブミンの経口投与は穏やかな感染率の低下を導いた。一方、SDS安定性ダイマー/オリゴマー含有 β -ラクトアルブミンの経口投与は下痢からの完全な回復をもたらした。同様に、SDSダイマー/オリゴマー含有 β -ラクトグロブリンの経口投与は下痢の著しい治癒効果を示した。予期しなかったが、ネイティブダイマー β -ラクトグロブリンの経口投与は感染からの回復を劇的に促進させた。

今回の研究によって、牛乳乳清の主要タンパク質による細胞増殖制御作用が、促進及び阻害のいずれの場合においても、*in vivo*では有効な整腸作用につながることを示された。SDS安定性ダイマー/オリゴマー含有牛乳タンパク質の*in vitro*での細胞増殖阻害は*in vivo*での不都合な腸細胞の速やかな排除をもたらし、ネイティブダイマーの細胞増殖促進作用は*in vivo*での腸組織の速やかな回復をもたらすと考えられる。今後は、腸細胞制御作用の異なる牛乳乳清タンパク質の組み合わせを詳細に検討することを通して、牛乳タンパク質を基盤とする整腸作用食品の実用化へとつなげていくことが望まれる。