

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 金丸 義敬

要約

ヒトロタウイルス感染阻害作用、ピロリ菌ウレアーゼの胃ムチン接着阻害作用、病原菌に対する抗菌作用、転移がん細胞に対する抗がん作用に関して、牛乳ムチン複合体の機能を評価した。いずれの検討項目においても強力な作用が認められ、牛乳ムチン複合体の有用性が示唆された。牛乳ムチン複合体は細胞表層に対する擬態を示すことで、病原体に対してはレセプターアナログとして作用し、また、がん細胞に対する免疫カスケードの引き金を引く可能性が示唆される。

キーワード：牛乳ムチン複合体、ヒトロタウイルス、ピロリ菌、病原菌、転移がん

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よって役立ってきている。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としては、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が、現在では遺伝子情報に基づいてMUC 1と呼ばれているものである。MUC 1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MUC 1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MUC 1は多数の異なるタンパク質と巨大複合体（ミルクムチン複合体）を形成し、病原ウィ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おり、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、この人乳のミルクムチン複合体と類似の性質を示すもの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、牛乳ムチン複合体は異なる構成成分が異なる機能を発揮するという意味で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複合体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、培養細胞系と動物実験系とを用いて、牛乳ムチン複合体の生理機能の有効性をさまざまな観点から検討を加えることを目的としているが、本年度は特に次のような点について詳細に評価することを目的とした。

- 1) ロタウィルス感染阻害作用： ヒトロタウィ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を通して、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で解析するとともに、ウィルス感染予防剤としての能力をin vivoで評価する。
- 2) ピロリ菌感染阻害作用： ピロリ菌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を通して、感染阻害作用のメカニズムをin vitroで解析するとともに、細菌感染予防剤としての能力をin vivoで評価する。
- 3) 抗菌作用： 食品に関連の深い病原性細菌の生育阻害について評価する。
- 4) 抗がん作用： 二重腫瘍移植系を用いて、原発腫瘍部位への直接投与が原発腫瘍とともに転移腫瘍部位に与える影響を評価する。

II 研究結果

1 ロタウイルス感染阻害作用

1) 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、牛乳ムチン複合体とそれをさらに分画した標品が血清型1のヒトロタウイルスWaの感染を阻害する活性（中和活性）について測定し、牛乳ムチン複合体のヒトロタウイルス感染阻害作用のメカニズムを考察する。

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1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、さらにスライドガラス上に移した。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。

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。

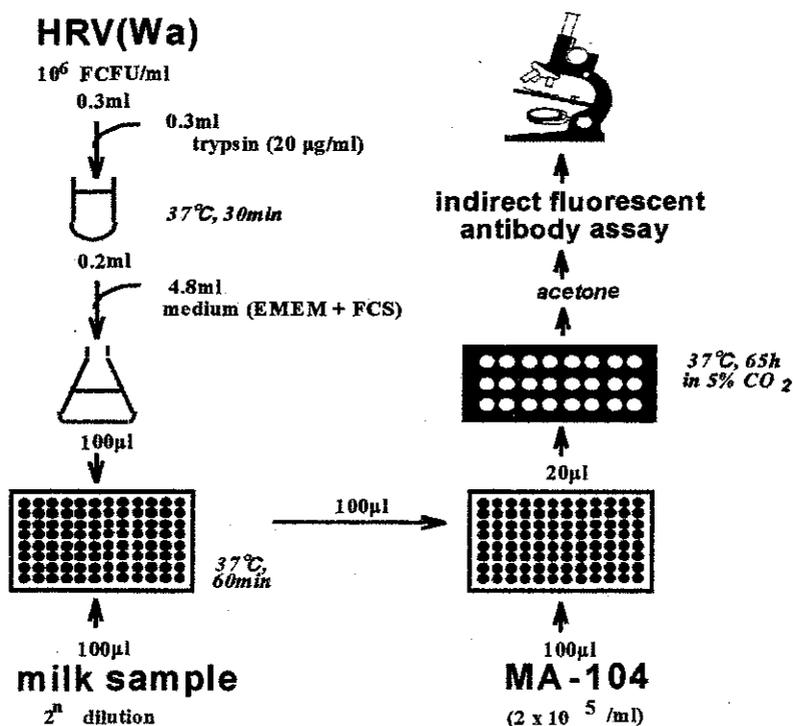


図1 ヒトロタウイルス感染阻害試験（中和試験）の概略

一昨年度の結果から、牛乳ムチン複合体であるF1が人乳由来の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ている。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。図2及び図3に示すように従来F1はHWPCをさらにゲルろ過することによって得ていた。

この調製法を簡略化するために限外ろ過/ダイアフィルトレーション処理によってF1と等価な試料を得ることができるかを検討した。図4に分画分子量300万の膜を用いて調製したHWPC300の感染阻害活性をF1のものと比較した結果を示した。図から明らかなように等価な活性を得たことから、本研究ではHWPC300を試料として用いることとした。

このように得られた牛乳ムチン複合体の活性がどのような成分に起因しているかを調べるために、昨年と同様、SDS含有バッファーを用いたゲルろ過でHWPC300を分画して得た画分のロタウイルス感

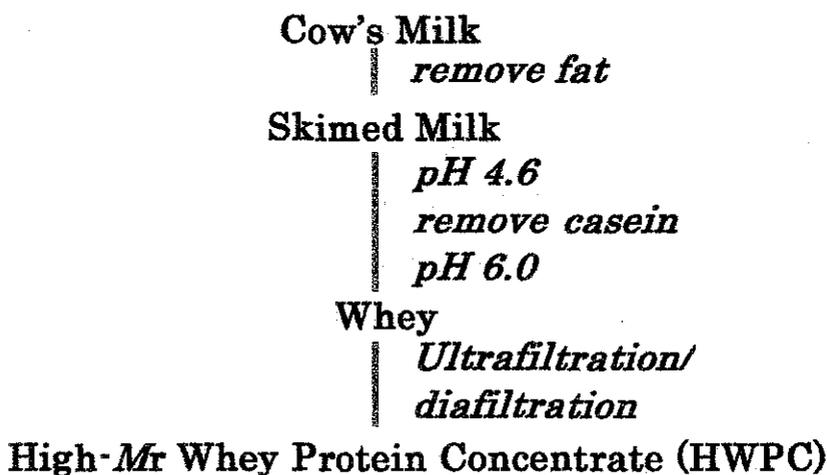


図2 牛乳からの高分子量ホエータンパク質濃縮物 (HWPC) 調製

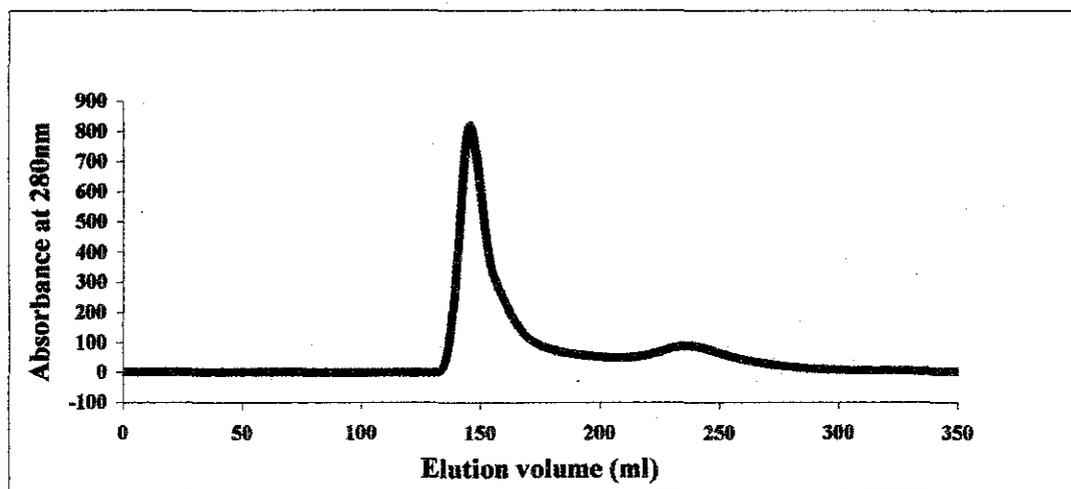


図3 Sephacryl S500によるHWPCのゲルろ過。
 流速を1 ml/minとし、0.1Mのリン酸バッファー、pH6.0で溶出した。

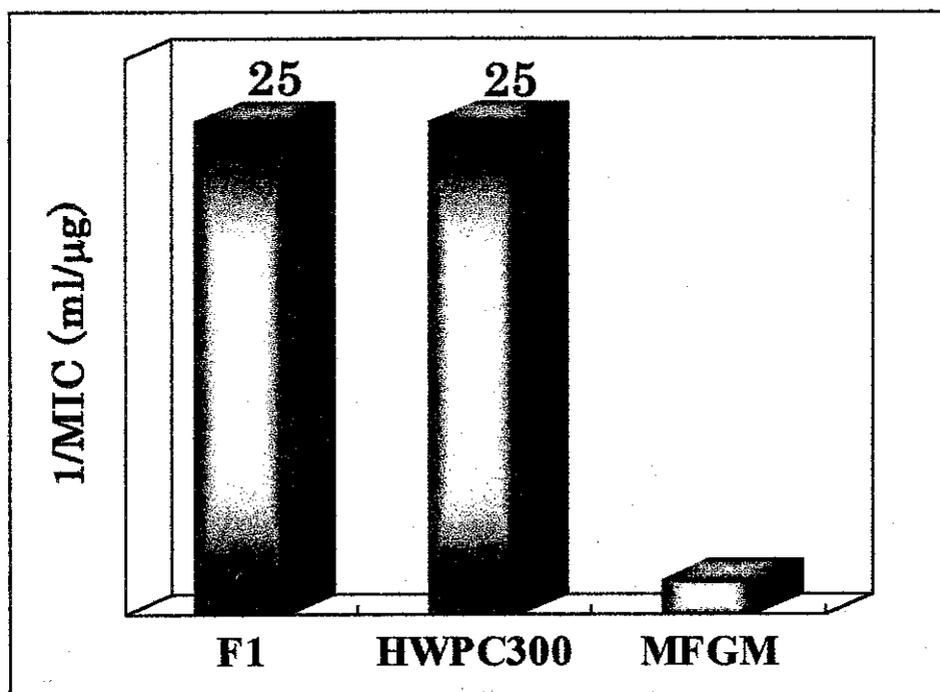


図4 限外ろ過/ダイアフィルトレーションによって調製したHWPC300のヒトロタウイルス感染阻害活性。

中和活性試験では、ヒトロタウイルスWa株とサンプルを37℃で30分間インキュベートした後、MA104細胞に接種し、さらに65時間インキュベートした。アセトン固定後、間接蛍光抗体法によって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の50%低下を示すサンプル濃度を最少阻害濃度 (MIC) とした。

染阻害活性について詳しく検討した。図5は、SDS含有バッファーを用いたSephacryl S-300のゲルろ過でHWPC300を分画した結果を示している。この結果から、通常のバッファー系では解離せずに、巨大な複合体を形成している牛乳ムチン複合体の成分がSDSの作用によって一部解離を起こし、いくつかの画分を生じることが明らかにされた。

以上のように得られたS1～S6の各画分について、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。その結果が図6である。図4と同様この図では最少阻害濃度 (MIC) の逆数を表しているの、棒が高いほど活性も高いことになる。実際のMIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) は棒の上に数字で示した。遅れて溶出する画分にHWPC300に比べて高い活性が認められ、一方、S1からS3ではHWPC300に比べ活性が低下した。最も強力な活性は最も遅く溶出したS6に認められ、HWPC300の活性のおよそ30倍という強力なものであった。

図7に強い活性を示したS6の二次元電気泳動パターンをHWPC300のものと比較して示した。もとのHWPC300には多数のCBB染色スポットが認められたが、S6には酸性側から塩基性に及ぶ広い等電点領域に広がる分子量2万程度のタンパク質スポットが特徴的に認められた。

この強い活性を示すS6について、Superdex75のゲルろ過でさらに分画した結果を図8に示した。

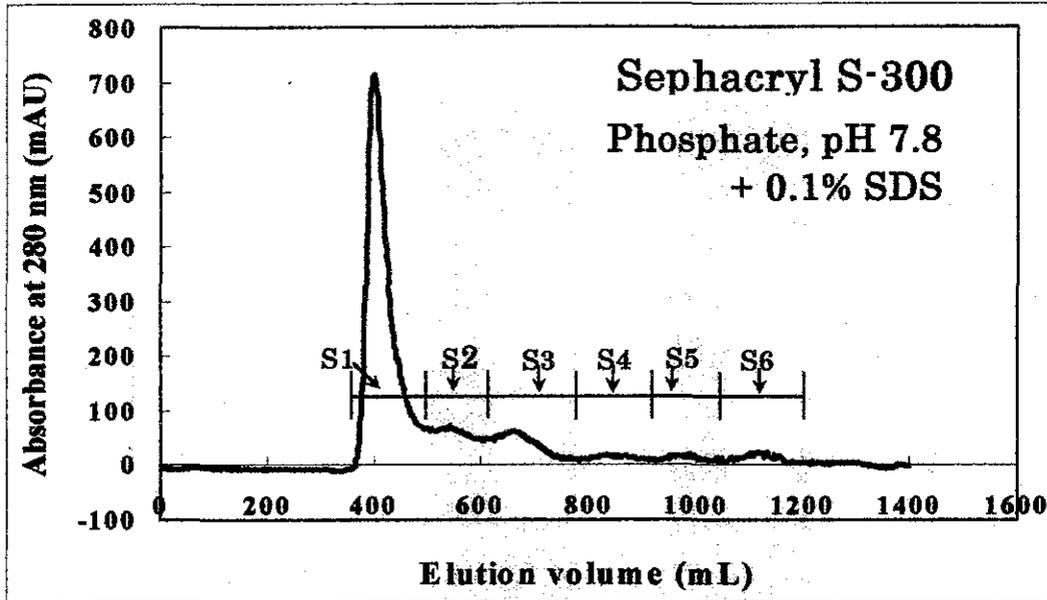


図5 SDS含有バッファーを用いたSephacryl S-300ゲルろ過によるHwPC300の分画。
0.1% SDSを含む0.1M Tris-HClバッファー (pH8.0) に溶解したHWPC300をカラム (5 x60cm) にアプライした。流速は9 mL/minとして溶出した。

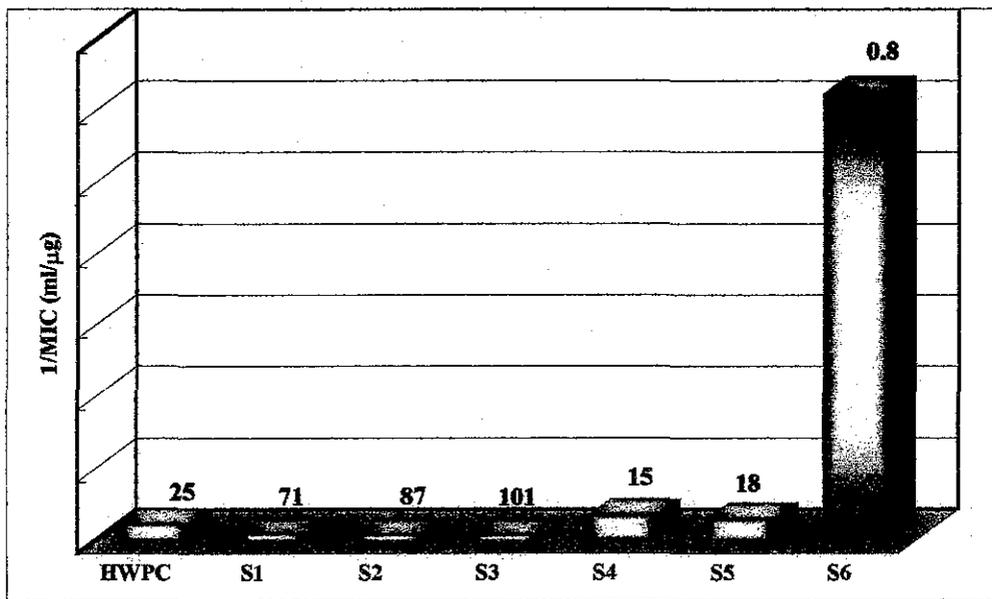


図6 Sephacryl S300分画物のヒトロタウイルス感染阻害活性の比較。
中和活性試験ではヒトロタウイルスWa株とサンプルを37℃で30分間インキュベートした後、MA104細胞に接種し、さらに65時間インキュベートした。アセトン固定後、間接蛍光抗体法によって感染細胞数を測定した。コントロールと比較して感染細胞数の50%低下を示すサンプル濃度を最少阻害濃度 (MIC) とした。

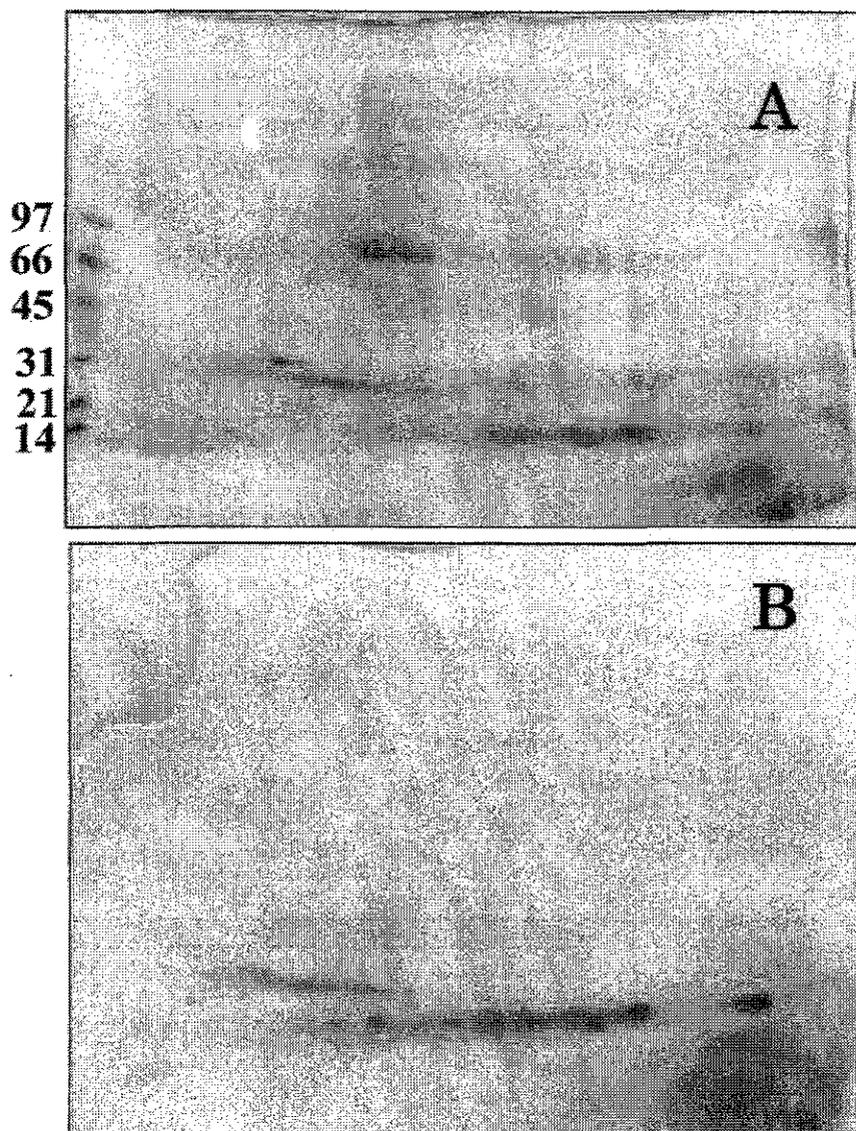


図7 HWPC300とS6の二次元電気泳動パターン。

pH 3-10の等電点電気泳動後、5-20%ゲルを用いたSDS-PAGEで二次元目を展開した。AにHWPC300のパターン、BにS6の泳動パターンを示した。

図示したように、4つの画分が得られた。それぞれを集めて透析によりSDSを除いた後、凍結乾燥した。

このようにして得た各画分の感染阻害活性を調べてみた結果が図9である。S6-2の活性が若干低下しているものの、すべての画分に分画前のS6とほぼ同等の活性が認められた。

以上の結果は、強力な阻害作用を示す活性成分がSDS作用によって牛乳ムチン複合体から解離すること、しかし、その活性成分は強く会合する性質を持っており、0.1%SDS存在下でも完全に解離することなくさまざまなサイズの会合体を形成する結果、多数のゲルろ過画分に分画されるものと考えられる。活性成分は分子量2万前後の複数の成分であることが強く示唆された。この結果は20kDaより

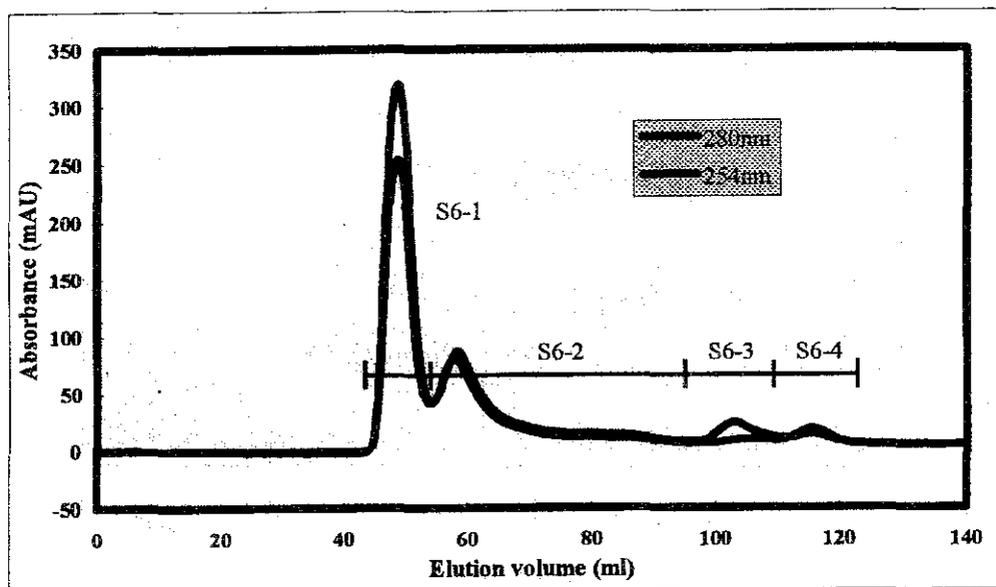


図8 SDS含有バッファーを用いたSuperdex75ゲルろ過によるS6の分画。
0.1%SDSを含む0.1M Tris-HClバッファー (pH8.0) に溶解したS6をカラム (1.5x60cm) にア
プライした。流速は1 mL/minとして溶出した。

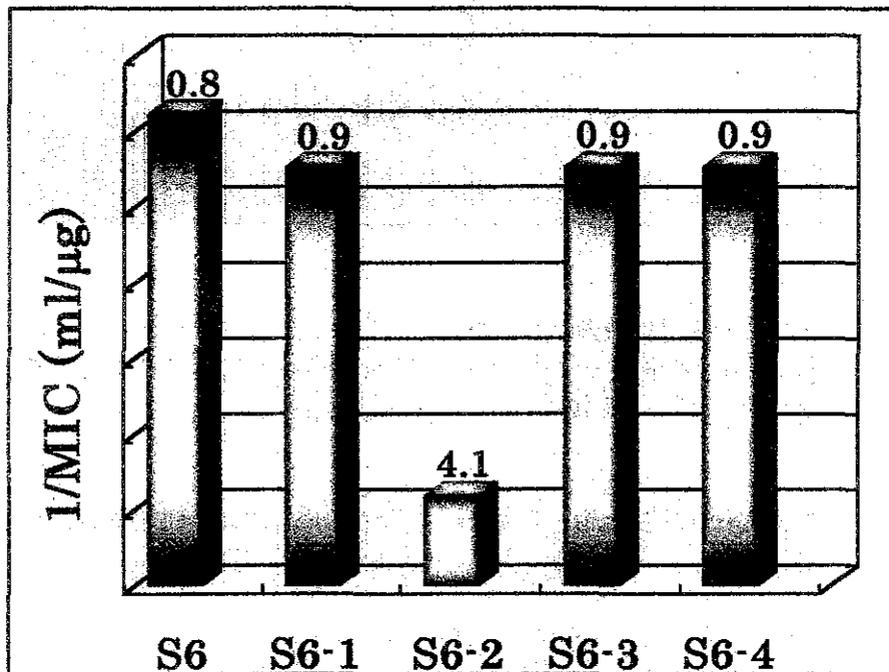


図9 Sephacryl S300分画物のヒトロタウイルス感染阻害活性の比較。
中和活性試験では、ヒトロタウイルスWa株とサンプルを37℃で30分間インキュベートした後、
MA104細胞に接種し、さらに65時間インキュベートした。アセトン固定後間接蛍光抗体法によ
って感染細胞数を測定した。コントロールと比較して感染細胞数の50%低下を示すサンプル濃
度を最少阻害濃度 (MIC) とした。

小さな二種のタンパク質が活性に関与するとして昨年度の結果とほぼ一致したものである。今後、同様な手法によってさらに精製し、特性を詳細に調べることによって、活性成分の完全な同定が可能になるものと考えている。

一方、これまでの研究において確認することのできなかつたin vivoの下痢発症予防機能について検討してみた。

ウイルス感染予防のための動物実験モデルを表す模式図を図10に示した。同腹で誕生した子マウスを一群として用いた。生後5日目のヒトロタウイルスMO株投与日を実験0日目とし、ウイルス投与1時間前にテストサンプル溶液50 μ lを与えたテスト群とPBS投与したコントロール群の下痢の発症を三日間監視することにより、その予防効果を評価した。

表1に示されているように、ヒトロタウイルスMO株であらかじめ過免疫して得た乳牛の初乳（ロタミルク）がタンパク質濃度3mg/mlで下痢の発症を顕著に予防したが、同等の予防効果がタンパク質濃度60mg/mlのHWPC300にも認められた。

表1は下痢の発生だけを指標としてまとめたものであるが、図11に軟便もあわせた感染の発生率で示したものを示した。下痢の認められなかつたロタミルクやHWPC投与群にも軟便が観察され、1日目では両群に60%を越える感染率が認められた。しかし、コントロールの感染率が3日目でも70%を超えていたのに対して、ロタミルク投与群やHWPC投与群では3日目には軟便も観察されず、感染が全く認められないようになった。このように、両者の予防効果はほぼ同様にきわめて高いものと考えられる。ロタミルクのMICは表1より0.3 μ g/mlであったから、MICが25 μ g/mlのHWPC300の活性は約83分の1であり、従ってロタミルクと同等の予防効果には約250mg/mlという濃度のHWPC300を

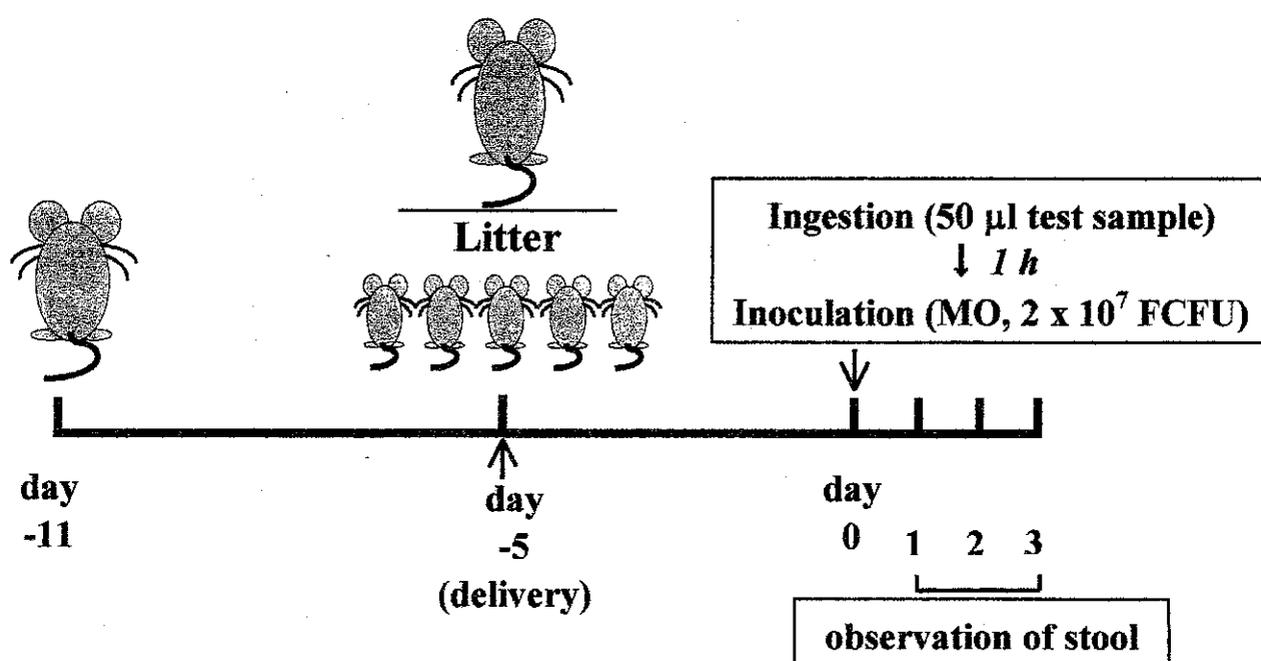


図10 ロタウイルス感染予防のための動物実験モデル

表1 乳飲みマウスのロタウィルス下痢症発症に及ぼすテストサンプル投与の影響。

| | MIC | Litter | n | Diarrhea | | |
|-----------------------|-----|--------|---|----------|---|---|
| | | | | Day | | |
| | | | | 1 | 2 | 3 |
| Control | | A | 5 | 2 | 4 | 0 |
| | | B | 3 | 2 | 3 | 2 |
| Rotamilk (3 mg/ml) | 0.3 | C | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | | D | 4 | 0 | 0 | 0 |
| HWPC (60 mg/ml) | 25 | E | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | | F | 2 | 0 | 0 | 0 |

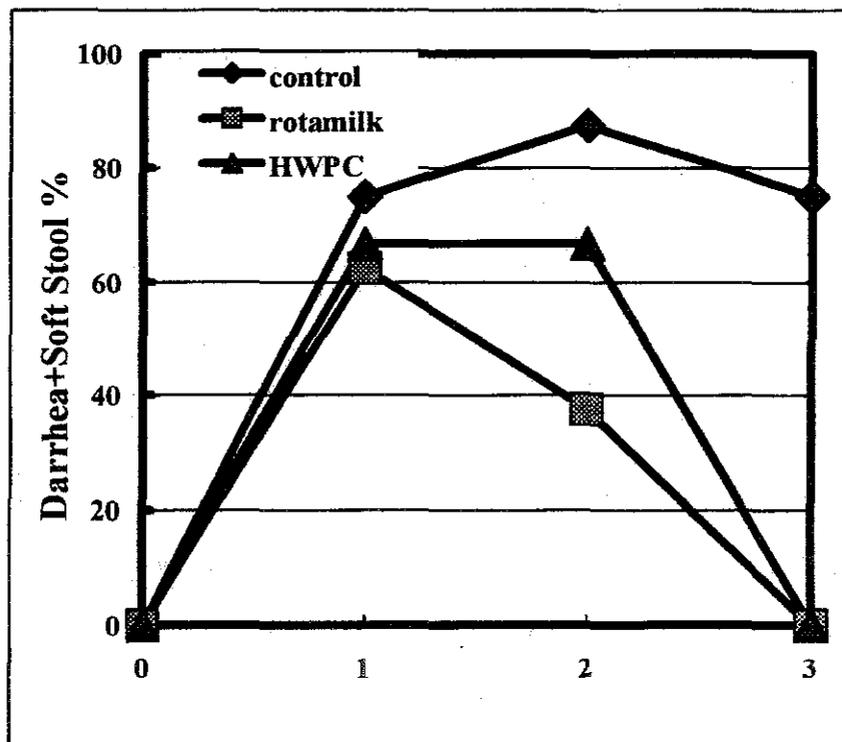


図11 乳飲みマウスのロタウィルス感染に及ぼすテストサンプル投与の影響

必要とするはずであるが、今回の実験ではその約4分の1の60mg/mlで十分な活性を示した。このことは牛乳ムチン複合体中の活性成分のウィルス感染阻害作用がロタミルク中の特異抗体より効率的なものであることを示唆している。今後さらに活性画分の同定とその効果的な投与方法について検討を進める予定である。

2 ピロリ菌感染阻害作用

1) 牛乳ムチンのピロリ菌定着阻害作用の解析

計画の概要： 胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼの吸着がピロリ菌の定着に不可欠であることを利用して、牛乳ムチンを共存させることによって胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼへの吸着がどのような影響を受けるかを調べ、定着阻害における有効性を解析する。

結果： ピロリ菌ウレアーゼの胃ムチンへの吸着阻害活性のin vitroの測定法を図12に模式的に示した。すなわち、

- 1) ブタ胃から調製したムチンにビオチン標識する。
- 2) ピロリ菌から調製したウレアーゼをマイクロプレートウェルに塗布する。
- 3) ビオチン標識した胃ムチンを倍々希釈したサンプルとインキュベートした後、ウレアーゼ塗布したマイクロプレートウェルに加える。
- 4) 吸着したムチンにペルオキシダーゼ標識アビジンを反応させ、基質を加えて発色させる。

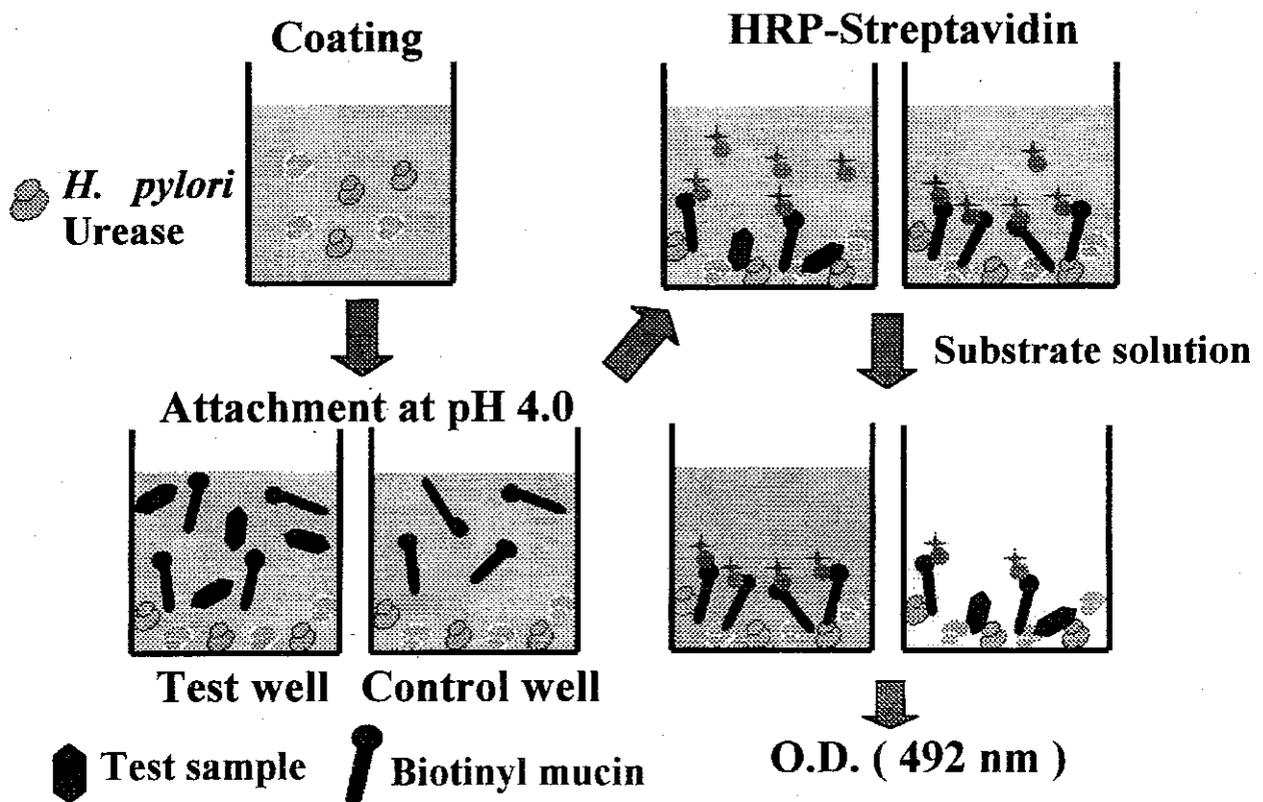


図12 ピロリ菌ウレアーゼの胃ムチンへの接着阻害活性試験

コントロールと比較して吸光度を50%減少させるサンプル濃度をIC₅₀として活性を表した。

5) プレートリーダーによって吸光度を測定する。

SDS含有バッファーを用いたSephacryl S-300ゲルろ過によって牛乳ムチン複合体であるHWPC300を分画した。その際の溶出パターンを図13に示した。図5とほぼ同様の結果を得たが、明瞭な分画物としては6つではなく、S300-1から-5までの5つを得た。これは、用いたHWPC300が異なることから、成分組成の若干の変動を反映した結果と考えられる。

この分画物を用いて胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼの吸着阻害作用を調べた結果が図14である。対照として、ピロリ菌の接着に関連を持つ可能性が考えられている硫酸基を持つ硫酸デキストラン(DS)と牛乳から得たラクトフェリン(Lf)を用いた。DSとLfのIC₅₀はそれぞれ8 mg/mlと2.8 mg/mlであり、顕著な阻害作用は認められなかった。一方、HWPC300のIC₅₀は0.07 mg/mlと高い阻害活性が示された。この結果は昨年の報告と一致しており、牛乳ムチン複合体中にはピロリ菌ウレアーゼの胃ムチン接着をブロックする作用を持つ成分が存在することが確認された。

一方、HWPC300をさらに分画して得た5つの画分は、最後に溶出したS300-5を除いて、きわめて強力な阻害活性を示した。

S300-1でHWPC300に比べてほぼ100倍の活性が得られ、ほぼ同様の活性がS300-4にも認められた。さらに、S300-2やS300-3の阻害活性は5 μg/mlであり、最も高いものであった。以上から、ピロリ菌定着を阻害する作用を持つと考えられる牛乳ムチン複合体中の成分は、0.1% SDS存在下でもさまざまなサイズに会合する性質を持つものと考えられた。そこで、胃ムチンとの共通性が考えられるMUC

図13 SDS含有バッファーを用いたSephacryl S-300ゲルろ過によるHWPC300の分画。0.1% SDSを含む0.1M Tris-HClバッファー (pH8.0) に溶解したHWPC300をカラム (5 x 60cm) にアプライした。流速は9 mL/minとして溶出した。

-218-

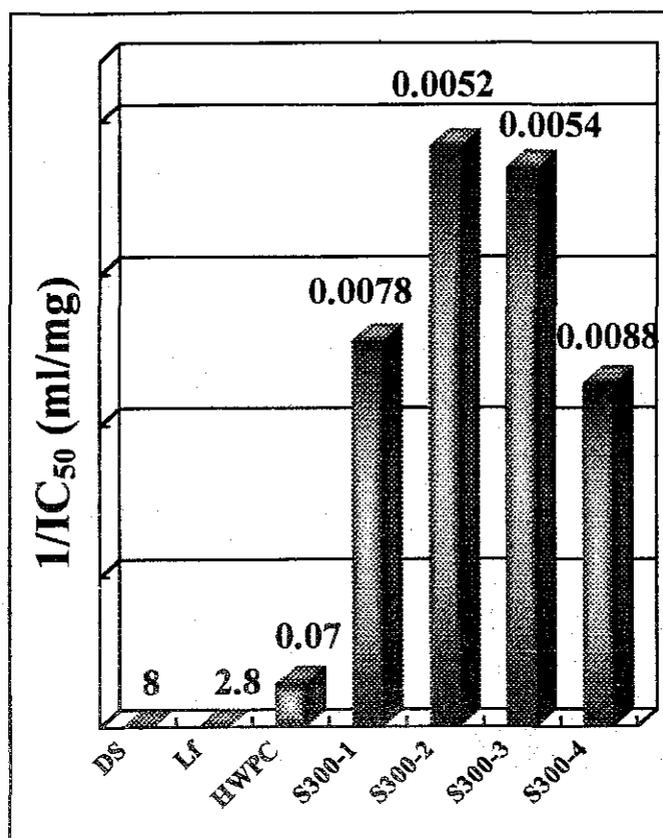


図14 胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼ吸着阻害試験。

ビオチン標識した胃ムチンとサンプルを37℃で30分間インキュベートした後、あらかじめピロリ菌ウレアーゼを塗布したマイクロプレートウェルに加え、3時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビジンと反応させた後、基質を加えて発色させ、プレートリーダーによって490nmの吸光度を測定した。コントロールと比較して吸光度が50%低下したサンプル濃度を最少阻害濃度 (IC₅₀, mg/ml) とした。図にはIC₅₀の逆数を表示しているの、棒が高いほど活性も高いことになる。実際のIC₅₀ (mg/ml) は棒の上に数字で示した。

1 ムチンの分布を中心に、これらの国分中のタンパク質成分組成を検討するため、二次元電気泳動分析を行った。

牛乳ムチン複合体中の主要成分一つであるMUC1 ムチンはPAS染色性がきわめて高く、代わりにCBBではほとんど染色を受けないという性質を持つ。図15の結果より、MUC1 ムチンはS300-2及びS300-3の二つの画分中に明瞭に観察された。ここでは示していないが、MUC1 ムチンに対するモノクローナル抗体を用いた検出でもこの二つの画分中にMUC1 ムチンの分布が確認されている。一方、S300-2及びS300-3はいずれもピロリ菌ウレアーゼの胃ムチン接着を強力に阻害した分画物である。従って、牛乳ムチン複合体の阻害作用はMUC1 ムチンに一部起因すると考えることができる。しかし、MUC1 ムチンの存在が顕著には認められなかったS300-1やS300-4の活性もかなり高かったことから、MUC1 ムチン以外の成分もまた阻害活性に関与するという可能性は否定できない。

また、SDS分画物の阻害活性はいずれも分画前の標品であるHWPC300の活性より顕著に高くなった

原因としては、SDSによる解離が進んだ結果、阻害作用に関わる部位の多くが表面上にさらけ出されるようになったことが考えられる。

今後は阻害作用成分をさらに精製し、活性成分の完全な同定を行うことを考えている。また、これら活性分画物のピロリ菌定着予防機能に関してin vivoの実験を現在検討中である。

3. 抗菌作用

計画の概要： 食品に関係の深い病原性細菌類の成長を阻害する能力をin vitroの実験系で評価する。

結果：表2に3種のグラム陰性細菌、1種のグラム陽性細菌、それに、2種の真菌に対する抗菌活性をまとめた。

実験に用いた培地は、真菌に対してはSabouraud dextrose broth、他は1%Bactopeptoneである。また、ポジティブコントロールとして牛乳ラクトフェリンから調製した抗菌フラグメントであるラクトフェリンB (Lfcin-B) を、また、牛乳ムチン複合体成分と同様の成分を含むことが知られている牛乳脂肪球皮膜に富むバターミルク分画物も比較のために用いた。

表から明らかなように牛乳ムチン複合体は検討したすべての細菌に対して強力な抗菌活性を示した。その活性はLfcin-Bにほぼ匹敵するものであった。特に真菌に対してはLfcin-Bよりもさらに強い活性が観察され、大変興味深い結果となった。一方、成分組成の類似するバターミルク分画物に抗菌活性は全く認められなかった。この結果は牛乳ムチン複合体のユニークな性質を浮き彫りにするものである。今後さらに抗菌活性成分の特定を進める予定である。

表2 牛乳ムチン複合体の抗菌活性

| | <i>E. Coli</i> O111 | <i>E. Coli</i> IID861 | <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> IFO3445 | <i>S. aureus</i> JCM2151 | <i>Candida</i> <i>albicans</i> TIMM0144 | <i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> TIMM1189 |
|-------------|------------------------|--------------------------|--|-----------------------------|---|--|
| | MIC (µg/ml) | | | | | |
| F1 | 25 | 25 | 50 | 6 | 6 | 6 |
| Lfcin-B | 12 | 6 | 12 | 6 | 25 | 12 |
| Butter milk | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 |

4. 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複合体及びその分画物の直接投与が転移部位の退縮に与える影響について評価する。

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複合体及びその分画物のいずれかを一日当たり0.5mg、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16に示すとともに、結果を図17と18にまとめた。

図17に示したように、牛乳ムチン複合体標品としてF1を3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

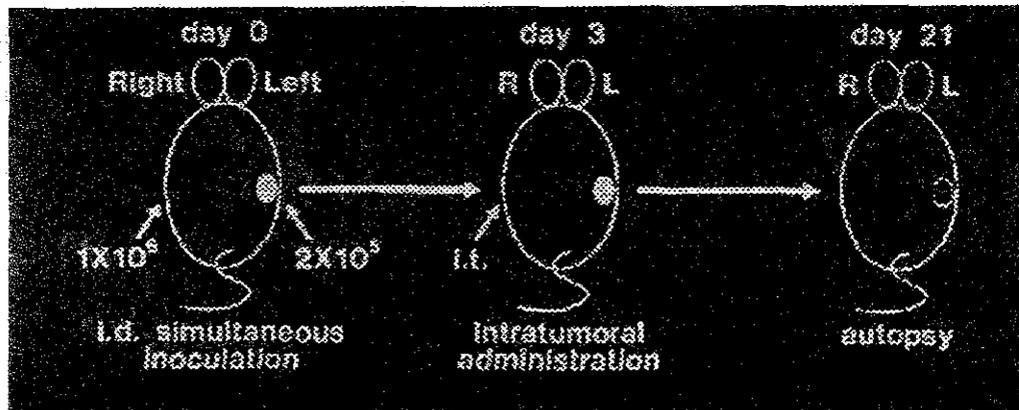


図16 二重移植系による抗癌剤の効力評価

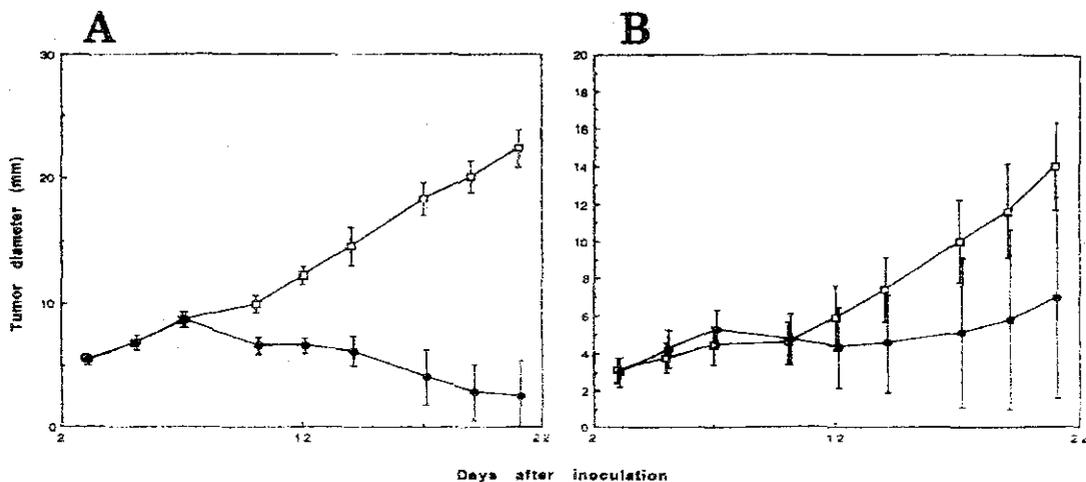


図17 二重移植腫瘍系での牛乳ムチン複合体の腫瘍内投与が腫瘍の退縮に与える影響。

(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。

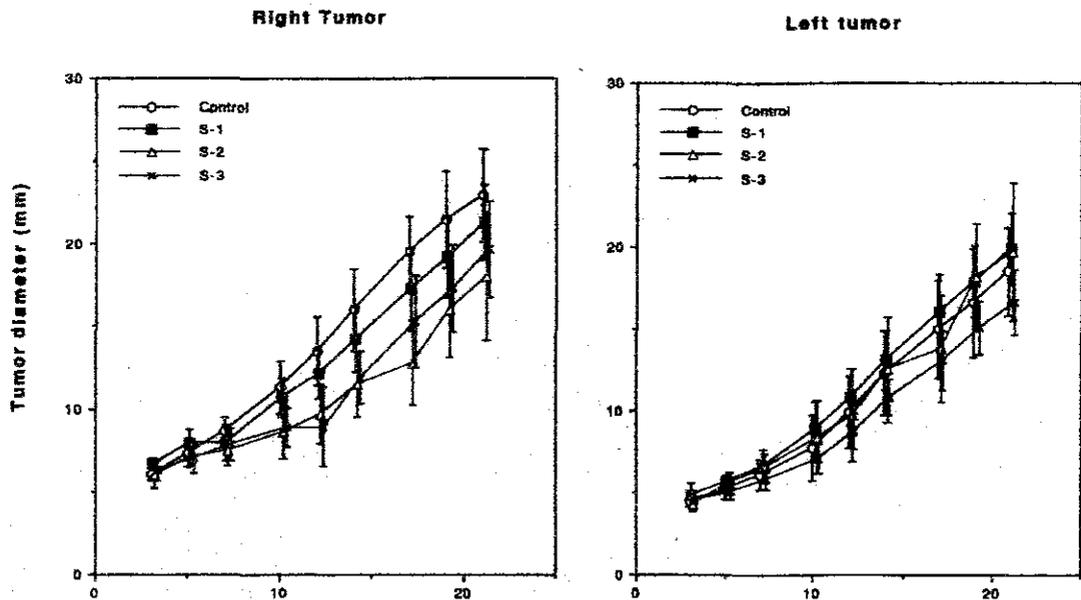


図18 二重移植腫瘍系での牛乳ムチン複合体分画物の腫瘍内投与が腫瘍の退縮に与える影響。
左図は右側（投与部位）腫瘍、右図は左側腫瘍である。（□）はコントロール、（■）はS-1、
（△）はS-2、（×）はS-3投与のものである。値は一群7匹の平均値±標準偏差を示している。

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、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。

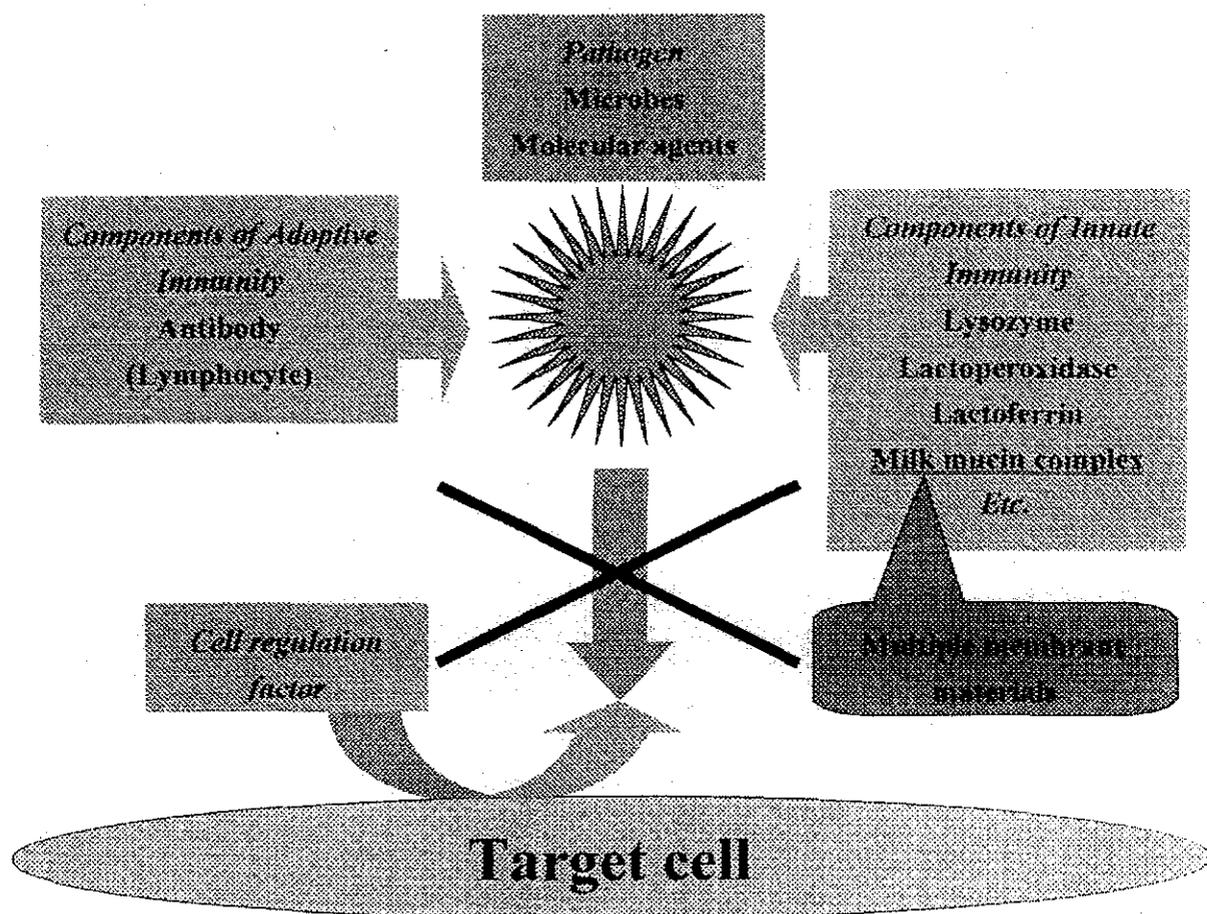
一方、驚いたことに、図18に示しているが、F1分画物ではいずれも分画前に認められた強力な抗がん作用が消失していた。

牛乳ムチン複合体分画物には抗がん作用が消失していた理由は現在のところ不明である。S-1からS-3はSepharose CL-2Bカラムからの分画物であり、ロタウィルス感染阻害活性やピロリ菌ウレアーゼ接着阻害活性を検討した実験で用いた分画物とは異なっている。もしかするとS-3までの分画物には含まれなかった成分に強力な抗がん作用があるのかも知れない。今後さらにその点を追求していこうと考えている。

Ⅲ 考 察

病気の予防に関してミルクが示す防御作用は次図のようにまとめることができるだろう。

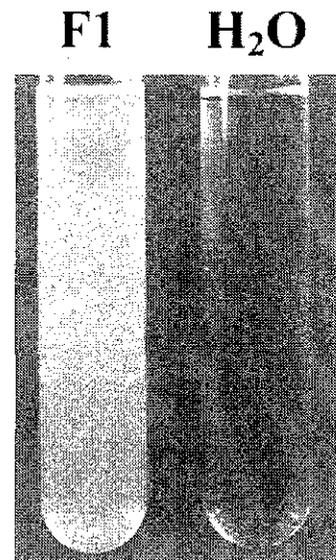
すなわち、微生物あるいは分子状作用因子（タンパク質等）のような病原体が経口的に摂取された



後、標的細胞に影響を及ぼすことによって、感染やアレルギーといった症状が引き起こされる。結合等の作用を発揮することによってこういった病原体の標的細胞への影響をブロックすることができる。ミルク成分として、第一に抗体やリンパ球などの獲得免疫成分があげられる。それらは病原体特異的なかたちで強力な作用を発揮する。一方、ミルクにはリゾチーム、ラクトペルオキシダーゼ、ラクトフェリンといった多数の自然免疫成分が存在する。それらは獲得免疫成分の作用を補助し、非特異的で穏やかではあるが、病原体の作用を弱める働きを持つ。一方、病原体に対して直接作用を発揮することによって病原体の影響を低下させるこういった成分とは別に、標的細胞への作用を介して間接的に病原体の影響をブロックする成分もあるだろう。すなわち、分化促進等の作用によって標的細胞をより生き生きしたものとし、病原体が作用しにくい状態をもたらしたり、あるいは、感染等の不都合な状態に陥った細胞を速やかに排除したりする作用を通して、病気の進行を抑制するような成分である。すなわち、細胞の成長を制御する因子である。

本研究で研究対象とした牛乳ムチン複合体は一応自然免疫成分に分類されるだろう。しかし、牛乳ムチン複合体のユニークさは第一に多数の構成成分から成る巨大複合体として存在することである。しかも、それらの多くは乳腺細胞膜に由来すると考えられるから、病原体が影響を及ぼす標的細胞の

- Multiple components
- Multiple Functions
- Huge complex
- Multiple components
- 'membrane material' in skim milk?



情報をきわめて豊富に持っている。すなわち、標的細胞表層を擬態することによって、病原体に対するレセプターアナログとして働き、病原体の矛先を本来の標的からそらし、結果的に病原体の影響をブロックする高い能力を持つものと考えられる。また、細胞情報を別のかたちで発揮することも可能かも知れない。その一つが本研究で示した抗がん作用のようなものである。牛乳ムチン複合体の溶液の写真とともに、その特性を上図にまとめた。牛乳ムチン複合体はきわめて魅力的な成分である。今後さらに詳細な分析を行うことによって、その有用性を明らかにしていきたいと考える。

IV 謝 辞

最後に、ロタミルクの考案者であり、動物感染モデルの実験系を御指導下さった宮城県がんセンターの海老名卓三郎博士、また、実験全般にわたって常に貴重なサジェスチョンをいただいている岐阜大学農学部獣医学科の源信之先生に感謝申し上げる。

文 献

- 1) Kanamaru, Y., Nazlruddin, B., Graves, D. C., Reyes de la Rocha, S. & Sachdev, G. P.: Detection of distinct species in purified human respiratory mucin using mono-clonal antibodies. *J. Immunol. Method.* 139: 167-179, 1991.
- 2) Kanamaru Y., Nagaoka, S. & Kuzuya, Y.: Binding properties of bovine immunoglobulin G to immobilized bacterial Fc receptors. *Anim. Sci. Technol*, 63: 385-393, 1992.
- 3) Kanamaru Y., Nagaoka, S. & Kuzuya, Y.: prateinA reactive subpopulation of bo-vine immunoglobulin G1 - A comparative study of serum and colostrum immunoglobulin G-. *Anim. Sci. Technol.* 63: 1142-1152, 1992.

- 4) Ebina, T., Ohta, M., Kanamaru Y., Yamamoto-Osumi, Y. & Baba, K.: Passive immunization of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *J. Med. Virol*, 38: 117-123, 1992.
- 5) Kanamaru Y., Ozeki, M., Nagaoka, S. et al.: Ultrafiltration and gel filtration methods for separation of immunoglobulins with secretory component from bovine milk. *Milchwissenschaft*. 48. 247-251, 1993.
- 6) Kanamaru Y., Toyoki, T., Nagaoka, S., et al.: High molecular weight mucin-like glycoprotein in bovine milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57. 666-667, 1993.
- 7) Kanamaru Y., Nagaoka, S., Kuzuya, Y. et al.: Reactivity of the High-Mr mucin-like glycoproteins in human milk with monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57. 1001-1003, 1993.
- 8) 島崎敬一・金丸義敬：母乳の免疫。 *New Food Industry*, 36 (5), 57-62/36 (6), 52-53, 1993.
- 9) 金丸義敬・長岡利：乳の高分子量糖タンパク質とその生理機能。 *Jpn. J. Dairy Food Sci.*, 43: A115-121, 1994. 1994.
- 10) 金丸義敬：母乳の免疫機能。 *化学と生物*, 35 (2)、110-117, 1997.
- 11) Kanamaru, Y., Ikeda, S., Yang, S.-M., Kaneko, T., Kuwata, T., Nagaoka, S., Shi-mizu, Y., and Sachdev, G.: A Monoclonal Antibody That Recognizes a Common Carbohydrate Epitope Shared by Various Glycoproteins in Human Secretions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249 (3), 618-623, 1998.
- 12) Kanamaru, Y., Etoh, M., Song, X.-G., Mikogami, T., Hayasawa, H., Ebina, T. and Minamoto, N. A high-Mr glycoprotein fraction from cow's milk potent, in inhibiting replication of human rotavirus in vitro. *Biosci. Biotech. Biochem.*: 63 (1), 246-249, 1999.
- 13) 宋項光・金丸義敬：機能性食品材料としての牛乳抗体利用の現状と将来。 *Milk Sci.*, 48 (1), 29-36, 1999.
- 14) Song, X.-G., Kanamaru, Y., Minamoto, N. and Ebina, T. Antivirus activities in the colostrum of cows that prevent diarrhea caused by human rotavirus. *Milchwissenschaft* 54 (8), 430-433, 1999
- 15) Yang, S.-M., Kanamaru, Y., Ikeda, S., Kaneko, T., Kuwata, T., Nagaoka, S., Shi-mizu, M. and Sachdev, G. P. Identification of two molecular species in human milk-derived lactoferrin. In "Lactoferrin: Structure, Function and Applications (K. Shimazaki et al., eds.) , Elsevier Science B. V. ", pp. 17-25, 2000.
- 16) 金丸義敬：牛乳・乳成分の新しい機能（タンパク質）、乳業技術、50, 22-37, 2000.
- 17) Shah-Ming Yang, Naoko Yokoi, Yoshihiro Kanamaru, Osamu Takenaka, Yasuro Atoji, Yasuo Bunai, Isao Ohya, Xong-Guang Song, Satoshi Nagaoka, Makoto Shi-mizu, and Goverdhan P. Sachdev, Unique occurrence of the 1CF11 carbohydrate epitope in primate saliva. *Biosci. Biotech.*

Biochem.: 65 (3), 2001 (in press).

- 18) Shan-Ming Yang, Yoshihiro Kanamaru, Makoto Simoyamada, Fumiyuki Asano, Satoshi Nagaoka, Makoto Shimizu, and Goverdhan P. Sachdev, Human milk bile-salt-stimulated lipase is extremely reactive with the monoclonal antibody 1CF11 that recognizes a human-specific carbohydrate antigen. *Biosci. Biotech. Biochem.*: 65 (4), 2001 (in press).