

# 乳汁中における生体防御成分の保存に関する研究

京都大学食糧科学研究所 名誉教授 安本 教傳  
谷 史 人

## 序 論

乳はヒトを含めた哺乳動物が生まれてからはじめて口にする食べ物であり、唯一摂食されることを目的に生合成された完全食品であると言われる。誕生したばかりの新生動物は、発育過程の初期において要求されるタンパク質、糖質、脂質およびビタミンやミネラルなどの栄養素を乳のみに依存している。なかでもタンパク質は生体構成成分のアミノ酸の給源やエネルギー源として重要である。しかし、乳汁には単に栄養源として重要な成分のみが含まれているわけではない。新生動物は親動物に比べて外部から侵入する異物に対する生体防御機能が発達していない。そのため新生動物はその身を守るために自らの免疫機能を、外部からとりわけ母親から食物として与えられる乳を通して補強される必要がある。この役割を担っているのが、乳清に含まれる分泌型免疫グロブリン (sIgA) をはじめとして、リゾチーム、ラクトフェリン、補体などのタンパク質であり、また、マクロファージやリンパ球の細胞成分である。

乳中の抗体はウイルスや細菌、エンテロトキシンに対する抗体をも含んでいる。sIgAは、IgAが2分子くっついたダイマーとJ鎖の結合物質が上皮細胞で生成された分泌片と結合したものであり、乳児消化管内でのプロテアーゼ作用やpHの変化にも安定で、かつIgGより親和性が強い。陰性の電荷をもつ大腸菌表面は疎水性で、このことが大腸菌が消化管内の粘膜に付着しさらには侵入する条件の1つとなるが、sIgAが大腸菌に付着すると菌の粘膜への接着を阻止防止し、安定性と相伴って変化を受けずに糞便中に排泄される。

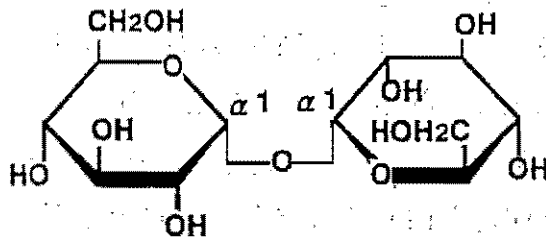
ラクトフェリンは、ラクトトランスフェリンとも呼ばれ、トランスフェリンに極めて類似したタンパク質である。これらのタンパク質は、いずれも分子量がおよそ77,000、1分子に鉄2原子を結合する性質がある。トランスフェリンは脾臓から網状赤血球へ鉄を運ぶキャリアータンパク質として重要であるが、ラクトフェリンは乳汁のほかに唾液、鼻汁、胆汁などの外分泌物や白血球などに存在し、感染防御因子の1つとして注目されている。このタンパク質は、人乳では初乳に0.5%、常乳に0.2%含まれているが、牛乳では初乳に0.08%、常乳には0.04%に過ぎない。乳汁中のラクトフェリンは鉄不飽和の状態にあり、大腸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌などに対する静菌効果のあることが知られている。*Escherichia coli* 0111の培地に乳中の各種タンパク質を添加して細菌の増殖状態をみると、カゼインや $\alpha$ -ラクトアルブミンには静菌効果が認められないが、ラクトフェリン、リゾチームや $\gamma$ -グロブリン

ンは細菌の増殖を抑制する。ところが鉄飽和のラクトフェリンにはこの効果が認められない。つまり、ラクトフェリンは細菌の増殖に必要な鉄と結合して、細菌に利用できなくすることによって静菌効果が発揮される。

乳汁には種々の酵素が存在している。乳汁中のリゾチームは、その一次構造の74%において、ニワトリ卵白と同じく細胞壁のプロテオグリカンのN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸の間の $\beta-1,4$ 結合を加水分解して殺菌作用を示す。主としてグラム陽性菌に作用し、少数のグラム陰性菌にも作用する。人乳中には、牛乳中の約3,000倍も多いリゾチームが含まれている。リゾチームは、上述のラクトフェリンとともに感染防御因子として機能し、sIgAとの共存下においてラクトフェリンの静菌効果を増強する作用がある。また、糖質に関係のある酵素としてはアミラーゼがある。人乳中に多量に含まれているアミラーゼはデンプンを分解し、エネルギー供給に関与している。100mlの初乳中には、20gのデンプンを1時間で分解できる量のアミラーゼが含まれている。胃内のペプシンによる消化に対して抵抗性が強く、小腸内でも活性が残っており、乳児の消化に役立っていると考えられている。

通常、乳とりわけヒトの母乳は極小未熟児や低出生体重児栄養の目的で凍結保存されており、牛乳の主要成分は乾燥保存されることがある。その際最も望まれることは、タンパク質、脂質や糖質の栄養学的成分、それらに関連したアミラーゼのような酵素のみならず抗体成分sIgA、リゾチーム、ラクトフェリンなどの生体防御を司る免疫性成分が可能な限り原乳に近い状態で保存されることである。一般に、タンパク質が生理機能を発揮するときは、ポリペプチド鎖固有の立体構造が保持されていなければならない。ところが、タンパク質は加熱、凍結あるいは乾燥処理された場合、規則正しい三次構造を失った変性を起こし失活してしまう。また、生細胞の生理機能はこのような処理に際し障害を被ることは言うまでもない。このように考えると、免疫学的重要性を加味した乳汁の凍結あるいは乾燥保存は重要な課題であるにも拘わらず、まだ未解決な問題点も多く残されているのが現状である。

最近、非還元性二糖類であるトレハロースが凍結、乾燥状態でのタンパク質や脂質を保護するという生理機能が注目を集めている。砂漠に生息する植物の*Selaginella lepidophylla*や昆虫のクマムシは、日中50℃以上にもなる過酷な条件下では脱水し、生理的に仮死状態となる。しかし、ひからびたこれらの生物は降雨によって水分が再び供給されると活動を再開する。1世紀以上も乾燥状態におかれた生物でさえ蘇生に成功することが報告されている。このようなAnhydrobiotic organismsと呼ばれる生物に共通するこの復活現象には、二糖類の一つであるトレハロースが関係していることが明らかにされた。脱水ストレス条件下において高濃



Glucose  $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$  Glucose  
M.W. 342.3

図1 トレハロースの分子構造

度に生合成・蓄積されたトレハロースは、乾燥に伴うタンパク質や生体膜の変性を防止することが知られている。トレハロースは、D-グルコース2分子が $\alpha 1-1$ 結合でつながった非還元性二糖類(図1)で、古くからミコース、ミコシド、マッシュルーム糖とも呼ばれてきた物質である。トレハロースは、120℃の高温またはpH3やpH11などの酸およびアルカリ処理に対しても化学的にきわめて安定である。トレハロースは植物、酵母などに含まれ、ヒラタケ、パン酵母、エビでは乾燥重量あたり約10~25%も含まれている事実から、食品に添加する化合物としても安全である。さらに、ビフィズス菌の増殖効果もあると報告されている。近年では、トレハロースはタンパク質および脂質の凍結や乾燥に対する保護作用から、細胞から個体に至るまで生命の保存や再生に係わっていることが分子レベルで明らかにされつつある。一方、工業的な観点からは、トレハロースはこれまで大量生産が難しく1kgあたり数万円の価格であったが、味の素(株)または林原生物化学研究所が1kgあたり数百円の安価で提供できる生産技術の開発に成功している。このことは大量の需要が見込まれる食品分野へのトレハロースの応用利用を可能にしている。そのため、現在、甘味料、清涼飲料、冷凍食品や乾燥食品などへの利用や高価な医薬品の保存安定剤などさまざまな用途が世界的規模で期待されている。

そこで、本研究では、栄養価の優れた乳汁にトレハロースを添加することによって、牛乳をより安全にかつ経済的に保存することを試みるとともに、乳汁に含まれる免疫学的成分のより一層完全に近い凍結および乾燥保存を試みることを目的とした。

# 第1章 乳タンパク質の乾燥変性に対する トレハロースなどの糖類の保護効果

乳汁中には種々の酵素が存在している。牛乳と人乳において確認されている酵素は40種類以上に及ぶが、ここでは両乳汁中において確認されている酵素、 $\beta$ -アミラーゼとリゾチームを用いた。ウサギ筋肉由来のピルビン酸キナーゼを対照とした。これら3つの酵素タンパク質は、凍結乾燥、通風乾燥に対して安定性が異なる(表1)。 $\beta$ -アミラーゼは、凍結乾燥ならびに通風乾燥のいずれの方法においても失活するため、一般には、40%グリセロール存在下において $-20^{\circ}\text{C}$ の不凍低温で保存されている。ピルビン酸キナーゼとリゾチームは凍結乾燥に対しては安定であるが、通風乾燥に対しては、ピルビン酸キナーゼは失活するが、リゾチームは $50^{\circ}\text{C}$ で乾燥しても失活しない。タンパク質の乾燥変性を防止するトレハロースの特徴を明らかにするために、トレハロースの効果をいろいろな種類の糖質の効果と比較した。糖類には、トレハロースの他に、三糖類であるラフィノース、二糖類であるラクトース、スクロース、マルトース、単糖類であるグルコース、グリセロールとジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた(表2)。

表1 酵素の乾燥処理に対する安定性

Enzyme	Freeze Drying	Air Drying
$\beta$ -Amylase	×	×
Pyruvate Kinase	○	×
Lysozyme	○	○

表2 糖質の諸性質

Sugar		M. W	Reducing Group
Glucose	monosaccharide	180.2	o
Trehalose	disaccharide (Glc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 1 Glc)	342.3	x
Sucrose	disaccharide (Glc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 $\beta$ Fru)	342.3	x
Maltose	disaccharide (Glc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 Glc)	342.3	o
Lactose	disaccharide (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 Glc)	342.3	o
Raffinose	trisaccharide (Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Glc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2 $\beta$ Fru)	504.4	x
Glycerol	alcohol CH <sub>2</sub> (OH)CH(OH)CH <sub>2</sub> (OH)	92.1	x
DMSO	dimethyl sufoxide (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	78.1	x

## 1. $\beta$ -アミラーゼに対する保護効果

人乳中にはアミラーゼ活性が非常に高い。 $\beta$ -アミラーゼは、デンプンなどの $\alpha$ -1,4-グリコシド結合を非還元性末端から一つおきに加水分解し、順次マルトースを生じる反応を触媒する酵素である。 $\beta$ -アミラーゼの活性は、アミロペクチンから遊離される還元糖をジニトロサリチル酸により定量することにより測定した。 $\beta$ -アミラーゼが糖によって修飾されたか否かは、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー（GP-HPLC）を用いて $\beta$ -アミラーゼの保持時間を比較することにより評価した。

$\beta$ -アミラーゼは凍結乾燥および50℃の通風乾燥によって失活した。まず、両乾燥による $\beta$ -アミラーゼの失活は、250mMのトレハロースを添加することによって顕著に防がれた（図2）。トレハロースの保護効果を他の糖類の効果と比較した。還元糖であるラクトース、マルトースやグルコースの存在下では $\beta$ -アミラーゼの活性を直接測定できないため、GP-HPLCを用いて分析した（表3）。グリセロールとDMSO存在下で凍結乾燥すると、糖非存在下の場合と同様に $\beta$ -アミラーゼに相当するピークは消失していた。250mMのスクロース、マルトースとグルコース存在下では、トレハロースの場合と同じ保持時間のピークが観察された。すなわち、凍結乾燥による失活は、グリセロールとDMSO以外の糖類を添加することでほぼ完全に防がれたことになる。

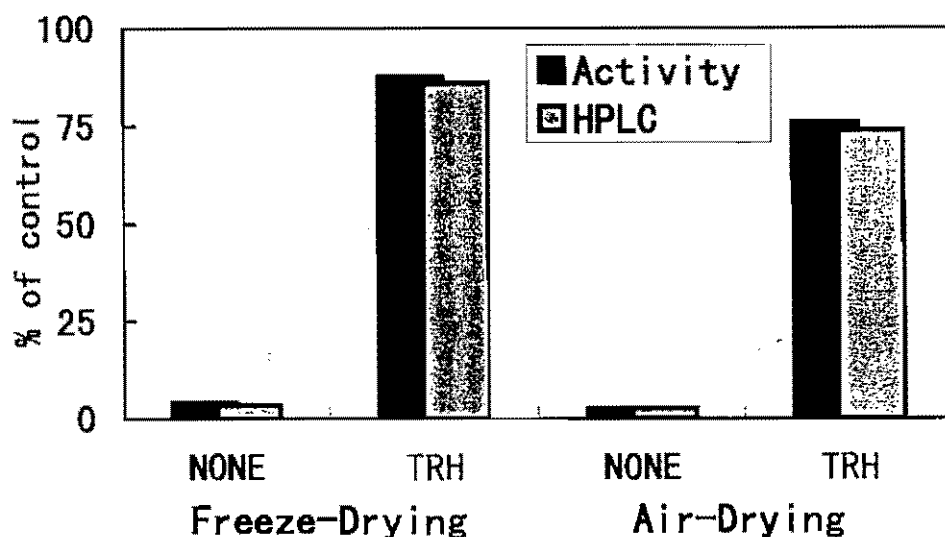


図2 凍結乾燥および通風乾燥による $\beta$ -アミラーゼの失活に対するトレハロースの影響

$\beta$ -アミラーゼの活性は、アミロペクチンから遊離される還元糖をジニトロサリチル酸により定量することによって測定した（左のカラム）。乾燥後に回収された活性型 $\beta$ -アミラーゼを、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィーにおいて溶出される $\beta$ -アミラーゼのピーク面積から定量した（右のカラム）。 $\beta$ -アミラーゼは凍結乾燥および50℃の通風乾燥によって失活するが、250mMのトレハロース（TRH）を添加することによって失活は顕著に防がれた。

一方、50℃、4日間の通風乾燥に対しては、トレハロースやスクロースが効果的に失活を防止した（表3）。ラクトース、マルトースやグルコースの存在下で通風乾燥した場合、 $\beta$ -アミラーゼの保持時間に変動が観察され、酵素が失活していることが指摘された。その理由としては、 $\beta$ -アミラーゼと還元糖との間でメイラード反応が起こり、 $\beta$ -アミラーゼの分子量が大きくなったためであろうと考えられる。

Sugar	Freeze-Drying		Air-Drying *	
	HPLC Rt (min)	Peak Area (%)	HPLC Rt (min)	Peak Area (%)
Control	18.2	100.0	18.2	100.0
No Sugar	18.3	3.5	18.2	2.6
Trehalose	18.4	86.1	18.2	73.5
Sucrose	18.4	80.4	18.2	82.1
Maltose	18.4	91.8	17.7	115.0
Glucose	18.4	89.8	16.9	125.2
Glycerol	-	0.0	-	0.0
DMSO	-	0.0	-	0.0
Lactose	N. D. **	N. D. **	15.2	64.8

\* 50℃, 4days

\*\* Not Determined

表3  $\beta$ -アミラーゼの乾燥変性に対する各種糖類の保護効果

図2と同様に、乾燥後に回収された活性型 $\beta$ -アミラーゼを、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィーにおいて溶出される $\beta$ -アミラーゼのピークの位置と面積から評価した。

## 2. ピルビン酸キナーゼに対する保護効果

ピルビン酸キナーゼは、凍結乾燥および通風乾燥によって失活した $\beta$ -アミラーゼとは異なり、通風乾燥によってのみ失活する（表1）。ピルビン酸キナーゼは、45℃以上の温度では熱変性によって失活する。そのため、乾燥変性のみに対する保護効果を調べるために、この酵素を37℃、4時間乾燥させ活性を調べた。酵素活性は、ADP、ホスホエノールピルビン酸、NADHと乳酸デヒドロゲナーゼを含むトリエタノールアミン緩衝液に、試験される酵素溶液を加える。25℃において1分間当たりのNADPの酸化に伴う340nmの吸光度変化から残存する酵素活性を調べた。

糖無添加で乾燥すると酵素は失活していた。グリセロールとDMSOを30%添加しても酵素活性の保持は認められなかった。これに対して、37℃の通風乾燥における

酵素の失活は、グリセロール以外の糖類によって抑えられた。ラクトースの効果は若干低めであったが、還元糖と非還元糖において差はあまり見られず、その保護効果は添加する糖濃度に依存していた（図3）。

糖類によるピルビン酸キナーゼの長期保存を調べた。糖を250mM添加し、37℃、4時間乾燥させた後、50℃で4日または30日間放置、再水和後、活性を測定した。30日間の通風乾燥を行ったところ、非還元糖であるトレハロース、スクロースとラフィノースの存在下で酵素活性が保持されていた（図4）。活性の保護効果は、ト

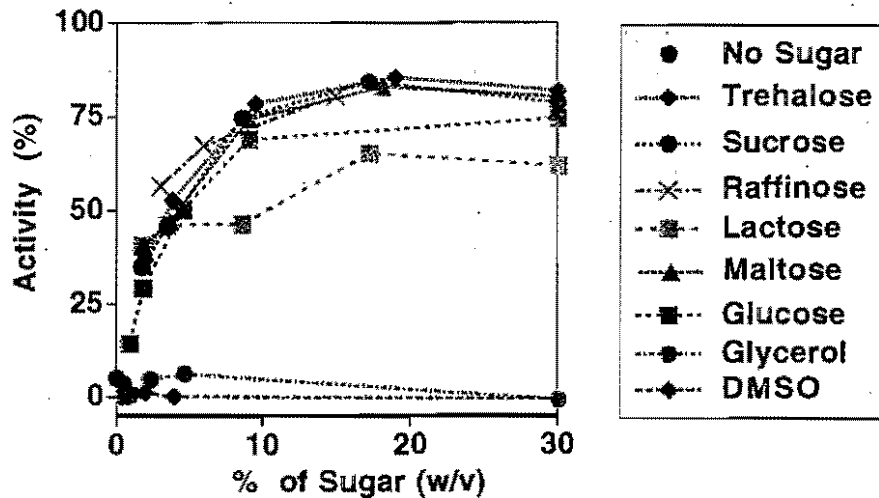


図3 通風乾燥に対してピルビン酸キナーゼ活性を保護する糖類の濃度

ADP、ホスホエノールピルビン酸、NADHと乳酸デヒドロゲナーゼを含むトリエタノールアミン緩衝液に、試験される酵素溶液を添加する。25℃において1分間当たりの340 nmの吸光度変化から、残存酵素活性を求めた。

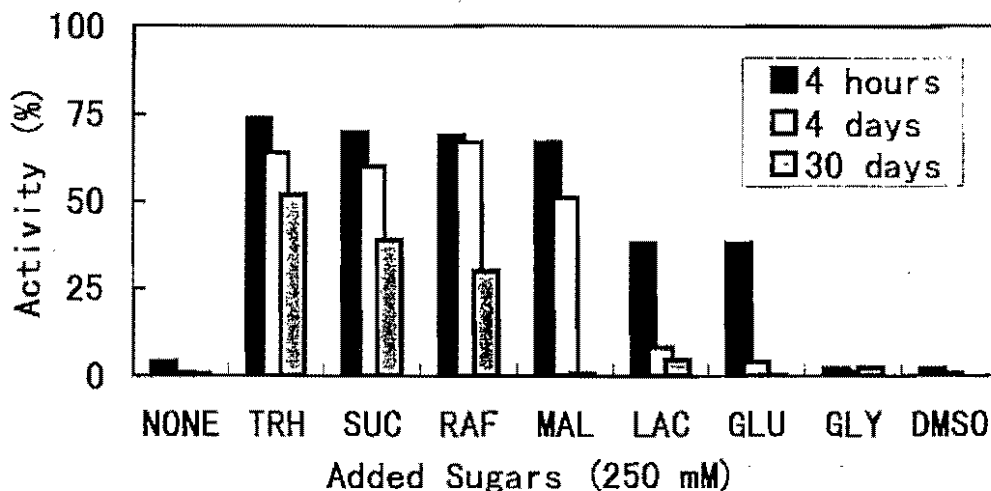


図4 ピルビン酸キナーゼの乾燥変性に対する糖類の保護効果

ADP、ホスホエノールピルビン酸、NADHと乳酸デヒドロゲナーゼを含むトリエタノールアミン緩衝液に試験される酵素溶液を添加し、NADHの酸化に伴う340 nmの吸光度変化から残存酵素活性を求めた。略号は図3と同じである。非還元糖の存在下では、ピルビン酸キナーゼを長期間乾燥保存できる。非還元糖の効力は、トレハロース>スクロース>ラフィノースの順序であった。

レハロース>スクロース>ラフィノースの順であった。ラクトースやグルコースなどの還元糖は、乾燥直後での保護効果は見られたが、長期間での効果は観察されなかった。

### 3. リゾチームに対する保護効果

人乳中のリゾチームの一次構造は、その74%がニワトリ卵白リゾチームのものと相同で、同じように細菌壁のプロテオグリカンの $\beta$ -1,4結合を水解して殺菌作用を示す。それ故、リゾチームは生体防御成分として重要である。ニワトリ卵白リゾチームを用い、活性は*M. lysodeikticus*の分解を指標に定量した。 $\beta$ -アミラーゼやピルビン酸キナーゼとは異なり、凍結乾燥に対しても、50℃、30日間の通風乾燥に対してもリゾチームは安定である(表1)。

非還元糖であるトレハロース、スクロースやラフィノースの存在下ではリゾチームは失活しなかった。一方、還元糖であるラクトース、マルトースやグルコースの存在下では数日後に失活し、還元糖は不安定化剤として機能していた(図5)。同様に、グリセロールとDMSOの存在下においても変性が促進されており、特に、DMSO添加の場合、乾燥直後においてももうすでに失活が観察された。

ラクトース、マルトースやグルコースの還元糖によるリゾチームの変性促進が、糖とタンパク質とのメイラード反応に帰因するものであるかどうかについて調べるために、褐変反応に伴うリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基数の減少をフルオレスカミンを用いた蛍光反応で調べた。蛍光強度の測定は、励起波長390nm、蛍光波長475nmにおいて行った。その結果、糖非存在下またはトレハロースなどの非還元糖の存在下では、30日間の乾燥後においてもフルオレスカミンと反応する遊離アミノ基数が減少していなかった。一方、ラクトースやグルコースのような還元糖の存在下では、リゾチームの失活と平行して、フルオレスカミン反応性の遊離アミノ基数が減少していた(図6)。この事実から、リゾチームの失活はメイラード反応に起因することが判明し、 $\beta$ -アミラーゼの失活も同様の原因であることが示唆された。

次に、ラクトースやグルコースなどの様々な糖が混入している牛乳や人乳にトレハロースを混ぜて保存する場合、複数の糖がタンパク質に与える影響を調べなければならない。そこで、還元糖であるラクトースによるメイラード反応を、添加する非還元糖が抑制するのか否かについて調べた。リゾチームの場合、ラクトース 250 mM にトレハロース 250 mM、500 mM を添加しても活性の保持に効果がなかった。ラクトース 250 mM にスクロース 250 mM、500 mM を添加すると、逆に急速に失活した。ピルビン酸キナーゼの場合、ラクトース 250 mM にトレハロース 250 mM、500 mM を添加すると、失活が抑制された。



以上の結果から、凍結乾燥により失活するのか、通風乾燥により失活するのか、あるいはその両者により失活するのかはタンパク質の種類に依ることが示された。

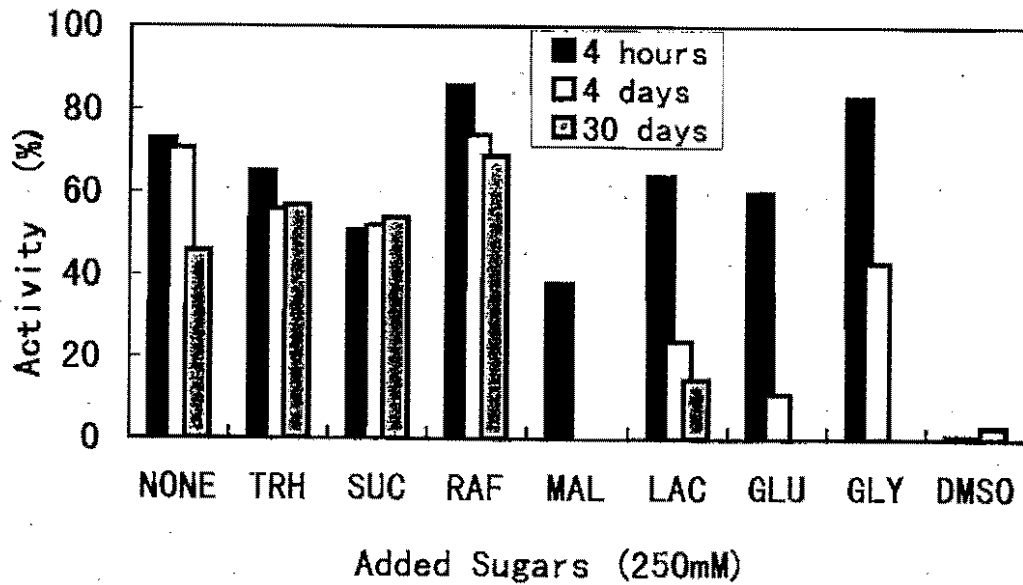


図5 50°Cの通風乾燥における卵白リゾチームの安定性に及ぼす各種糖類の効果

50°Cにおいて卵白リゾチームを通風乾燥し、上に示した時点における残存活性を測定した。活性は、*M. lysodeikticus*の細胞壁プロテオグリカンの水解を指標に定量した。略号は、TRH, トレハロース; SUC, スクロース; RAF, ラフィノース; MAL, マルトース; LAC, ラクトース; GLU, グルコース; GLY, グリセロール; DMSO, ジメチルスルホキシドである。非還元糖の存在下では、卵白リゾチームを長期間乾燥保存できる。

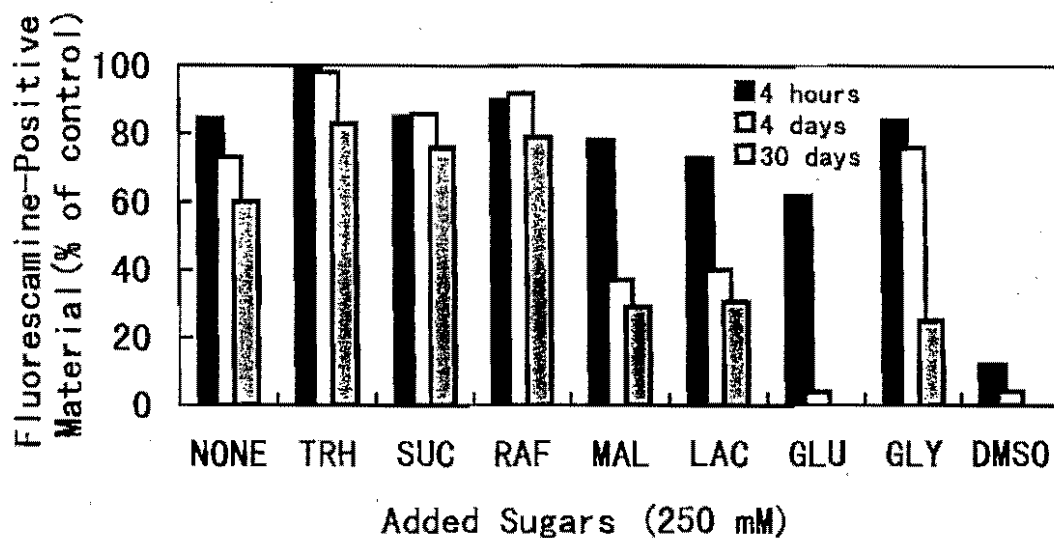


図6 卵白リゾチームにおけるフルオレスカミン反応性遊離アミノ基の変化

還元糖と反応した卵白リゾチームの遊離アミノ基を、フルオレスカミンとの反応性の減少から測定した。蛍光強度の測定は、励起波長, 390 nm, 蛍光波長, 475 nmで行った。略号は図5と同じである。

しかし、いずれの乾燥手段を用いるにしてもタンパク質の脱水に伴う乾燥失活は、非還元糖であるトレハロース、スクロースやラフィノースによって抑えられ、生理活性タンパク質の長期的な乾燥保存にはこれらの非還元糖の利用が望ましいことが明らかにされた。タンパク質の凍結変性に対する防止剤として知られるグリセロールやDMSOは、 $\beta$ -アミラーゼとピルビン酸キナーゼの乾燥失活を抑制しなかった。また、これらの化合物はリゾチームに対して変性を促進した。この事実は、牛乳や人乳を凍結保存する場合と乾燥保存する場合とでは機能的なタンパク質の変性機構が異なることを意味しているかもしれない。さらに、還元糖によるタンパク質のメイラード反応は、非還元糖の添加によって抑えられる場合と抑えられない場合とがあり、目的とするタンパク質の種類により左右されると考えられる。

このように、非還元糖であるトレハロース、スクロースやラフィノースの添加によって生理活性をもつタンパク質の変性を抑え、乾燥状態で長期間保存することが可能であることは、大いに食品の保存に有効であろう。しかし、スクロースは酸性条件下で高温乾燥すると褐変を起こし易いのに対して、トレハロースは、酸やアルカリおよび熱処理に対して化学的にきわめて安定である。そのため、牛乳や人乳の乾燥保存には非還元糖のなかでもトレハロースを利用することが最も望ましいと思われる。還元糖であるラクトースは、通風乾燥状態においてメイラード反応を起こした。ラクトースにトレハロースを共存させてもメイラード反応が顕著に抑制されるということはなかった。乳汁には多量のラクトースが含まれているため、トレハロースを乳汁に直接添加し乾燥処理を施しても、生理活性タンパク質が貯蔵中に機能を失うことが予想される。そこでスキムミルクを乾燥処理する場合、透析などによりラクトースを除去することを試みなければいけないであろう。ラクトフェリンは、その溶液がpH4.5付近の酸性条件下あるいはイオン強度が0.001程度以下であれば、加熱処理によっても鉄結合能や抗原性には変化なく、変性しないという報告がある。透析の操作はイオン強度を低下させるため、63℃、30分というパスツリゼーションの殺菌処理においてもラクトフェリンの失活がかなり抑えられることが期待できる。

## 第2章 乳汁中に含まれる微量元素の吸収に対する トレハロースなどの糖類の促進効果

乳汁は哺乳類の幼動物にとって唯一の栄養源であるが、親動物にとっても栄養価の高い食源である。乳汁中にはタンパク質、糖質、脂質、ビタミン、亜鉛や鉄などの微量無機質がバランス良く含まれている。乳タンパク質は、生体構成成分のアミノ酸の給源やエネルギー源として単に機能するだけでなく、乳清に含まれるラクトフェリンやリゾチームをはじめ、分泌型免疫グロブリン (sIgA) などの乳清タンパク質は、新生動物において外部から侵入する異物に対して生体防御機能を担っている。これは、新生動物の免疫系が親動物の場合に比べて未発達であるために、新生動物は母親から食物として与えられる乳を通して、自らの身を守るための免疫機能を補強しなければならないためである。ラクトフェリンは、その鉄結合能により大腸菌の生育に必要な鉄を枯渇させるとともに、結合鉄を体内へ運搬する役割を果たしている。一方、亜鉛や鉄などの微量元素は必須栄養素である。とりわけ食餌性の鉄が欠乏すると、赤血球産生不全による重篤な貧血が引き起こされたり、T細胞数の減少や機能抑制、好中球の殺菌能の低下などの免疫系機能の不全を生じる。牛乳の灰分は人乳の約3.5倍存在する。しかし、灰分1g当たり換算してみると、鉄や亜鉛は人乳の方がはるかに多くなる。そのため、乳汁中の生体防御成分の機能を高めるためには、保存中における乳清タンパク質の安定化を計ると同時に鉄などのミネラルの吸収性効率を改善することも必要である。

糖質は、タンパク質の加熱による変性温度を上昇させたり、またミネラルの吸収と体内保留を高めるということが報告されている。前章において、酵素タンパク質を *in vitro* で乾燥させるという実験系を用いて、どのような糖質が酵素タンパク質の脱水変性の防止に効くのかを調べたところ、ラクトース、マルトースやグルコースの還元糖はタンパク質とメイラード反応を起こし、酵素タンパク質を失活させることが判明した。一方、トレハロース、スクロース、ラフィノースなどの非還元糖は機能性タンパク質の不活化を防ぐことを見出した。しかし、トレハロースをラクトースやグルコースと混ぜた場合、非還元糖は酵素の失活を完全には抑えることはできなかった。この事実は、乳が有する生体防御機能を長期間損なうことなしに、牛乳や人乳を安価にしかも衛生的に保存できる方法を開発することを試みる場合、多量のラクトースの存在は長期的な乾燥保存には好ましくなく、代替でき得る糖質を検索しなければならないことを示唆している。

そこで本章においては、ラクトフェリンの抗菌性を維持することができ、さらに鉄の体内取り込みを向上させる糖質について検討した。ヒト腸管上皮由来の細胞培

養系を用いて、ミネラルの生体利用効率を定量的に解析できるアッセイ系を樹立し、牛乳中に含まれる糖質および遊離アミノ酸が鉄の生体利用効率に及ぼす影響を調べた。

## 1. ヒト結腸由来Caco-2細胞を用いた鉄利用効率の測定系

食餌性の鉄供給源には非ヘム鉄が多く、含有される鉄のほとんどが3価の鉄である。3価の鉄は不溶性の水和物を形成しやすく難吸収性である。しかし、鉄の吸収効率は摂取する食事の種類によって変動するため、食品中に含まれる様々な栄養素の化学形態を調節することによって鉄の生体利用効率を高めることができる。しかしながら、ミネラルの生体利用効率には大きな個人差が伴い、その評価が困難であるため、鉄の生体利用効率を的確に理解するには、鉄の吸収機構と吸収に影響する因子を定量的に解析できるアッセイ系の樹立が望まれている。

細胞培養には、コラーゲンでコートした多孔性のポリカーボネート膜インサートにより2つのチャンバーに仕切られた培養容器を用いた(図7)。腸管上皮細胞の

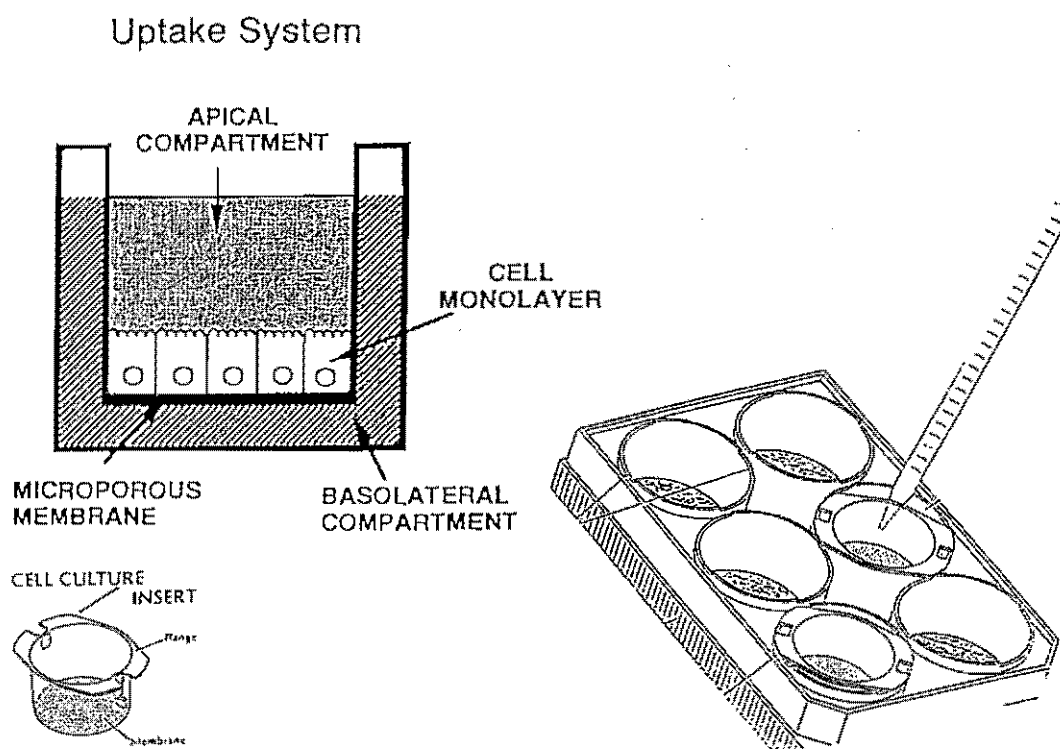


図7. 腸管上皮細胞(Caco-2細胞)を用いた鉄の吸収と細胞内輸送の *in vitro* アッセイ系

コラーゲンでコートした多孔性のポリカーボネート膜インサートにより2つのチャンバーに仕切られた容器でCaco-2細胞を、無血清培地を用いて単層培養した。インサートに付着している細胞の管腔上皮層側に $^{59}\text{Fe}$ 塩化第二鉄を添加し、37度、1時間培養後、インサートに付着している細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれたラジオアイソトープを計測し鉄の取り込み量を算出した。また細胞の基底膜側に相当するインサート外部のチャンバーに回収されたラジオアイソトープを計測し鉄の細胞内輸送量を評価した。

モデルとしてヒト結腸由来のCaco-2細胞を血清添加培地中において1週間、コンフルエントになるまで培養した。細胞をインサートに移し、2日間血清培地中で増殖させ、その後12日間無血清培地を用いてポリカーボネート膜上に単層培養した。2週間後、Caco-2細胞は小腸上皮において観察される様に正常な微絨毛を形成するに至るまで分化・増殖した(図8)。インサートに付着している細胞の管腔上皮層側に $[^{59}\text{Fe}]$ 塩化第二鉄を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ において1時間培養した。培養後、インサートに付着している細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれたラジオアイソトープを計測することによって鉄の取り込み量を算出できた。また同時に、細胞の基底膜側に相当するインサート外部のチャンバーに回収されたラジオアイソトープを計測することによって鉄の細胞内輸送量を評価することが可能となった。

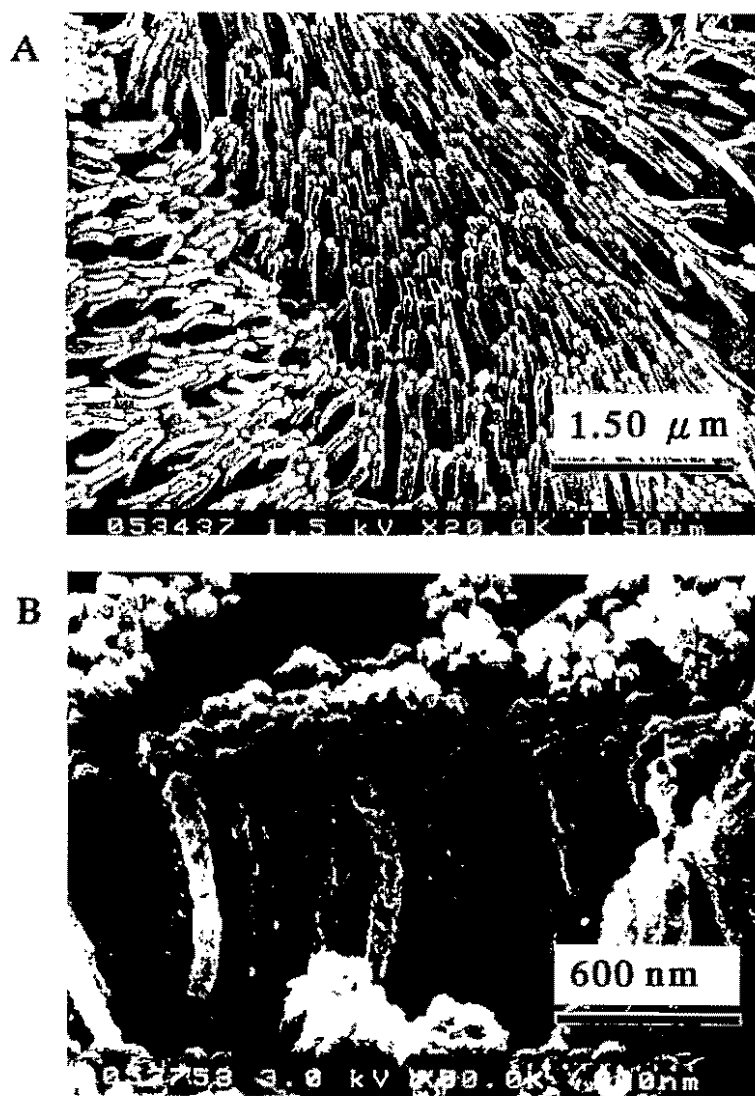


図8 Caco-2細胞の電子顕微鏡写真

Caco-2細胞を無血清培地で14日間培養した後の走査型電子顕微鏡写真。細胞は十分に増殖、分化し微絨毛を形成している。(A.20000倍, B.50000倍)

## 2. 糖質の鉄の取り込みと輸送に及ぼす効果

グルコース、フルクトース、スクロースなどの糖質は、多くのカチオンと比較的安定な複合体を形成することができるため、ミネラルの腸管吸収に影響を及ぼすと言われている。ヒトの栄養学的調査から、フルクトースは鉄の吸収と体内保留を高めることが報告されている。糖質が鉄の生体利用率に及ぼす影響を検討する一環として、確立したCaco-2細胞の *in vitro* アッセイ系を用いて、糖質および人工甘味料であるアスパルテームの鉄の吸収と細胞内輸送について定量的に調べた。

グルコースとフルクトースは、添加濃度に依存して鉄の吸収および細胞内輸送を顕著に促進した(図9、表4)。ラクトースは、無添加の場合に比べて、鉄の吸収および輸送に対して僅かな促進効果を示したが、統計的に有意な差は見られなかった(図9、表4)。この結果は、これまでの疫学調査による結果と一致しており、鉄の生体利用率を定量的に調べることが可能である腸管上皮細胞を用いた *in vitro* アッセイ系の確立を示唆している。このグルコースとフルクトースの促進効果は、難溶性である3価の鉄と複合体を形成して、鉄の溶解度ひいては吸収性を高めることに帰因すると考えられる。

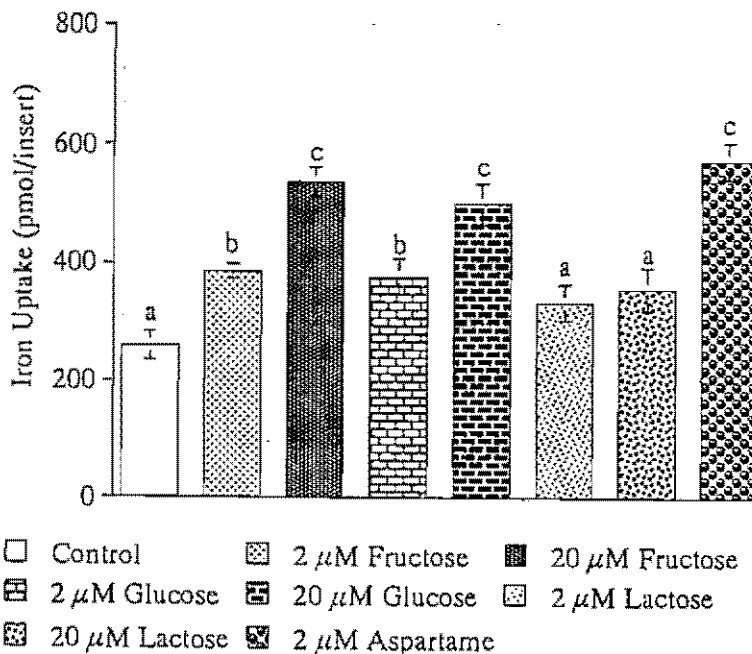


図9 Caco-2細胞における糖質およびアスパルテームの鉄取り込みに及ぼす影響

Caco-2細胞を無血清培地を用い正常な微繊毛を形成するまで分化、増殖させた後、図7のアッセイを用い細胞内に取り込まれた鉄の量を算出した。グルコースとフルクトースは、添加濃度に依存して鉄の吸収を顕著に促進した。アスパルテームは鉄の吸収に際して、グルコースやフルクトースの約10倍の著しい促進効果を示した。

表4 Caco-2細胞における糖質およびアスパルテームの鉄輸送に及ぼす影響

Test solutions	Transport (pmol/cm <sup>2</sup> /min)	
	2 μM	20 μM
Control	0.88 ± 0.02 <sup>a</sup>	-
Glucose	1.30 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.03 <sup>c</sup>
Fructose	1.65 ± 0.05 <sup>d</sup>	1.79 ± 0.09 <sup>cd</sup>
Lactose	1.03 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.08 <sup>a</sup>
Aspartame	2.01 ± 0.05 <sup>c</sup>	ND

Caco-2細胞を無血清培地を用い正常な微絨毛を形成するまで分化、増殖させた後、図7のアッセイを用い、インサート外部のチャンバーに回収されたラジオアイソトープを経時的に計測し鉄の細胞内輸送量を評価した。各糖質及びアスパルテーム濃度2μMと20μMの場合を示している。糖質としては、グルコース、フルクトース、ラクトースを用いた。a, b, c, dは、P<0.05の危険率において有意差があることを示す。

次に、非還元糖であるトレハロースの鉄の取り込みおよび細胞内輸送に与える影響を検討した。トレハロースは、2μMの濃度で培地に添加しても鉄の取り込みおよび細胞内輸送は顕著に促進し（図10、表5）、フルクトースに匹敵する効果を有していることが判明した。これらの促進効果は、20μMの添加濃度においてより顕

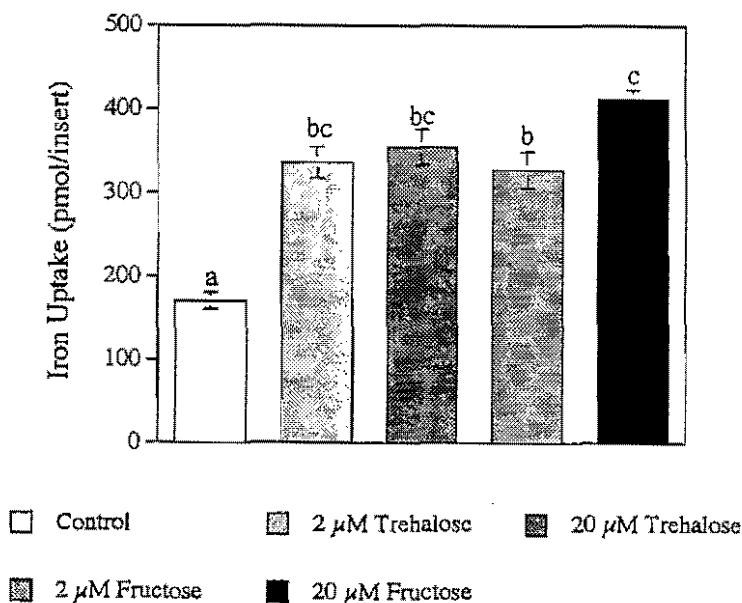


図10 Caco-2細胞におけるトレハロースの鉄取り込みに及ぼす影響

Caco-2細胞を無血清培地を用い正常な微絨毛を形成するまで分化、増殖させた。その後、図7のアッセイを用い細胞内に取り込まれた鉄の量を算出した。トレハロースは添加濃度に依存して鉄の吸収を顕著に促進し、フルクトースに相当する効果を示した。

Test solutions	Iron Transport (pmol/cm <sup>2</sup> /min)	
	2 $\mu$ M	20 $\mu$ M
Control	0.98 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	
Trehalose	2.47 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	3.01 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
Fructose	2.72 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.81 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>

表5 Caco-2細胞におけるトレハロースの鉄輸送に及ぼす影響

Caco-2細胞を無血清培地を用い正常な微絨毛を形成するまで分化、増殖させた。その後、図7のアッセイを用い、インサート外部のチャンバーに回収されたラジオアイソトープを経時的に測定し鉄の細胞内輸送量を評価した。トレハロースは添加濃度に依存して鉄の輸送を顕著に促進し、フルクトースに相当する効果を示した。

著であった。グルコースが2  $\mu$ M、20  $\mu$ Mの添加濃度において鉄の取り込みおよび細胞内輸送を促進すること、ならびにトレハロースは小腸の刷子縁膜に存在する酵素トレハラーゼによって2分子のグルコースに加水分解されることを考慮すると、トレハロースによる鉄の取り込みおよび細胞内輸送の促進効果は、その分解産物の効果であるかもしれない。また、鉄の能動輸送に必要とされるエネルギーとして、そのグルコースが消費できるかもしれない。

ジペプチドの人工甘味料であるアスパルテームは、鉄の吸収と輸送に対して、グルコースやフルクトースの約10倍の著しい促進効果を示した(図9、表4)。細胞の頂端部上皮層側に添加されたアスパルテームの動態を逆相系高速液体クロマトグラフィーにより調べたところ、添加1時間後、アスパルテームは完全に加水分解されていることが判明した。この事実は、アスパルテームの分解産物であるアミノ酸が鉄の輸送に促進的に働くことを示唆している。

### 3. アミノ酸およびペプチドの鉄の取り込みと輸送に及ぼす効果

粉乳中には遊離アミノ酸が存在し(表6)、粉乳の品質劣化に伴いアミノ酸含量も変化することが報告されている。上述のアスパルテームから得られた結果とも考え合わせて、アミノ酸や短鎖ペプチドの鉄吸収と細胞内輸送に及ぼす効果について調べた。

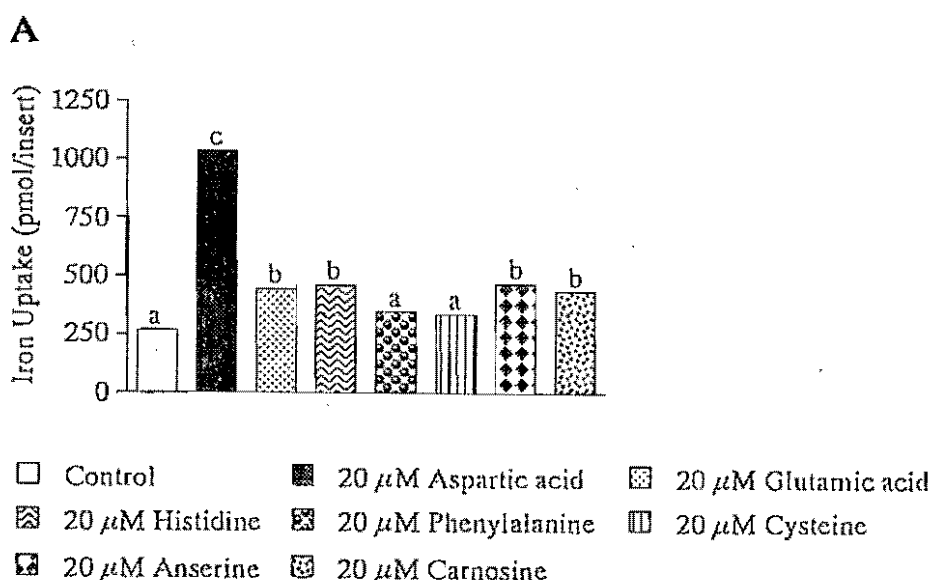


表6 粉乳中の遊離アミノ酸量

Amino Acid	Content ( $\mu$ moles/g)
Aspartic acid	0.17
Threonine	0.04
Serine	0.08
Glutamic acid	1.39
Proline	0.28
Glycine	0.62
Alanine	0.24
Cystine	0.02
Valine	0.08
Isoleucine	0.03
Leucine	0.03
Tyrosine + Phenylalanine	0.03
Tryptophan	0.18

試料に内部標準としてあらかじめ既知量の norleucine を加え、75% エタノール抽出法に準じ遊離アミノ酸を抽出し、アミノ酸自動分析機（柳本製LC2）を用い分析した。試料とした粉乳中の遊離アミノ酸含量は分析図上での内部標準の回収率にて補正した。

アスパラギン酸を20  $\mu$ Mの濃度で培地に添加すると、鉄の取り込みおよび細胞内輸送は顕著に促進された（図11、表7）。グルタミン酸とヒスチジンの取り込みおよび輸送に対する促進効果は、20  $\mu$ Mの添加濃度においても観察されたが、1 mMの濃度においてより著しかった。フェニルアラニンは、1 mMの濃度において鉄の取り込みを促進したが、細胞内輸送には効果を示さなかった。システインは、1 mMの高濃度においても鉄の取り込みおよび細胞内輸送には全く促進効果を示さなかった。ヒスチジン含有ジペプチドであるカルノシン（ $\beta$ -アラニル-L-ヒスチジン）やアンセリン（N- $\beta$ -アラニル-1-メチル-L-ヒスチジン）は添加濃度に依存して鉄の取り込みおよび細胞内輸送を促進した。



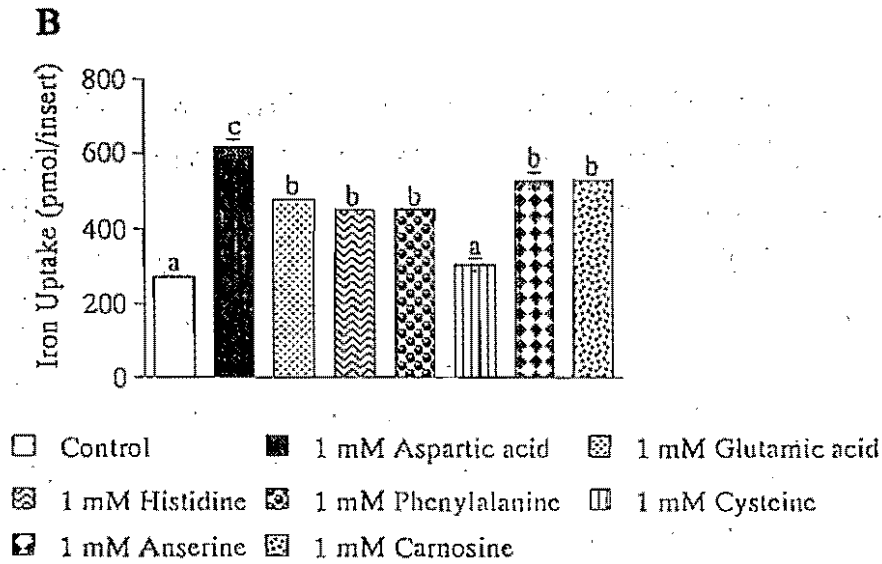


図1-1 ヒト結腸由来Caco-2細胞におけるアミノ酸およびペプチドの鉄取り込みに及ぼす影響

Caco-2細胞を無血清培地を用い正常な微繊毛を形成するまで分化、増殖させた後、図7のアクセスを用い細胞内に取り込まれた鉄の量を算出した。A. 20  $\mu$ M, B. 1mMの場合。

表7 ヒト結腸由来Caco-2細胞におけるアミノ酸およびペプチドの鉄輸送に及ぼす影響

Test solution	Transport (pmol/cm <sup>2</sup> /min)	
	20 $\mu$ M	1mM
Control	0.84 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	
Aspartic acid	2.09 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	1.90 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
Glutamic acid	1.07 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
Histidine	0.92 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
Phenylalanine	0.80 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Cysteine	0.73 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
Anserine	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.39 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
Carnosine	0.99 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>

Caco-2細胞を無血清培地を用い正常な微繊毛を形成するまで分化、増殖させた後、図7のアクセスを用い、インサート外部のチャンバーに回収されたラジオアイソトープを経時的に計測し鉄の細胞内輸送量を評価した。アミノ酸としてアスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、フェニルアラニン、システインを、ジペプチドとしてカルノシン ( $\beta$ -アラニル-L-ヒスチジン) とアンセリン ( $N$ - $\beta$ -アラニル-1-メチル-L-ヒスチジン) を用いた。それぞれ、20  $\mu$ M と 1mM の場合を表している。a, b, c, d は、 $P < 0.05$  の危険率において有意差があることを示す。

## 結 語

乳はヒトを含めた哺乳動物が生まれてからはじめて口にする食べ物であり、唯一摂食されることを目的に生合成された完全食品であると言われる。誕生したばかりの新生動物は、発育過程の初期において要求されるタンパク質、糖質、脂質およびビタミンやミネラルなどの栄養素を乳のみに依存している。なかでもタンパク質は生体構成成分のアミノ酸の給源やエネルギー源として重要である。しかし、乳汁には単に栄養源として重要な成分のみが含まれているわけではない。新生動物は親動物に比べて外部から侵入する異物に対する生体防御機能が発達していない。そのため新生動物はその身を守るために自らの免疫機能を、外部からとりわけ母親から食物として与えられる乳を通して補強される必要がある。この役割を担っているのが、乳清に含まれるリゾチーム、ラクトフェリンや分泌型免疫グロブリン (sIgA) などのタンパク質である。

通常、乳とりわけヒトの母乳は極小未熟児や低出生体重児栄養の目的で凍結保存されており、牛乳の主要成分は乾燥保存されることがある。その際最も望まれることは、タンパク質、脂質や糖質の栄養学的成分、それらに関連したアミラーゼのような酵素のみならず、リゾチーム、ラクトフェリンや抗体成分sIgAなどの生体防御を司る免疫性成分が可能な限り原乳に近い状態で保存されることである。本研究において明らかにされたことは、乳汁に多く含まれるラクトースは、還元性二糖類であるためにメイラード反応によってタンパク質や脂質を劣化させてしまい、乳汁の長期保存には適さない。ところが、非還元性二糖類であるトレハロースは、乾燥に伴うタンパク質や生体膜の変性を防止するので、乳汁の長期保存に適していることである。

また同時に、乳汁に含まれる亜鉛や鉄などの微量元素は必須栄養素である。とりわけ食餌性の鉄が欠乏すると、赤血球産生不全による重篤な貧血が引き起こされたり、T細胞数の減少や機能抑制、好中球の殺菌能の低下などの免疫系機能の不全を生じる。そのため、乳汁中の生体防御成分の機能を高めるためには、保存中における乳清タンパク質の安定化を計ると同時に鉄などのミネラルの吸収性効率を改善することも必要であろう。以前の研究から、一般に、糖質はミネラルの吸収と体内保留を高めるということが報告されていた。本研究の後半において、トレハロースはラクトースに匹敵するくらい鉄などのミネラルの吸収と生体利用効率を高める可能性があることを明らかにした。これらの結果は、乳が有する生体防御機能を長期間損なうことなしに、牛乳や人乳を安価にしかも衛生的に保存できる方法を開発することを試みる場合、多量のラクトースの存在は長期的な乾燥保存には好ましくなく、代替でき得る糖質としてトレハロースが期待できることを示唆している。

現在ではトレハロースの価格は、林原生物化学研究所または味の素（株）が1kgあたり数百円の安値で提供できる生産技術の開発に成功しているため安価になりつつある。このことは大量の需要が見込まれる食品分野へのトレハロースの応用利用を可能にしている。そのため、現在、甘味料、清涼飲料、冷凍食品や乾燥食品などへの利用や高価な医薬品の保存安定剤などさまざまな用途が世界的規模で期待されていることを鑑みると、乳汁中における生体防御成分の保存に関してトレハロースのもつ意義は大きいであろう。