



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	乳中の既知および新規成分の解析とプロバイオティクスを使った人工乳の改良に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	和泉, 裕久
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第6991号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61877
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hirohisa_Izumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称：博 士（農学）

氏名 和泉 裕久

学 位 論 文 題 名

乳中の既知および新規成分の解析と プロバイオティクスを使った人工乳の改良に関する研究

哺乳類の新生児（仔）は、生後の一定期間、母親が分泌する「乳」のみを栄養源として発育する。ある「種」の乳はその「種」の児（仔）にとって最適であると考えられており、ヒト新生児の場合「母乳」が最適な栄養であると考えられるが、何らかの理由により「母乳」を与えることができない場合、「乳児用調製乳」が与えられる。「乳児用調製乳」は、栄養学的な面では母乳と遜色ないレベルに達しているものの、母乳栄養と人工栄養には免疫能や腸内細菌叢など未だ差がある面も知られており、より母乳に近い「乳児用調製乳」が望まれる。

本研究では、「乳児用調製乳」をより母乳に近づけるための研究の一環として、「乳中既知因子の、新規な生理作用を見出す」こと、「乳中に存在する未知の生理活性因子を見出す」こと、「プロバイオティクスの調製乳への利用」を目的とし、検討を行なった。

1. 乳中成分の新規生理作用の探索

乳中には様々な生理活性因子が含まれており、乳児（仔）消化管で作用することが知られているが、乳児（仔）の内因性生理活性因子の分泌を刺激する成分も存在すると考え、食餌性刺激により分泌され、消化管成熟作用が知られている glucagon-like peptide-2 (GLP-2) の分泌刺激作用を指標に、乳仔期ラットを用い、牛乳中成分の探索を行なった。その結果、乳仔期ラットでは乳たんぱく質に GLP-2 分泌刺激作用があることがわかった。乳たんぱく質の中で α -La は強い GLP-2 分泌刺激作用を示した。 α -La に着目し、牛乳由来 α -La の GLP-2 分泌刺激作用にはインタクトな状態が必要なのかを調べるため、3 種類の酵素分解物を作成し調べたところ、分解による GLP-2 分泌刺激作用低下は認められず、むしろその作用が増強するものがあつた (α -La 分解物 1)。 α -La 分解物 1 と α -La をたんぱく質源として含むミルクで人工飼育試験を行ない、GLP-2 分泌刺激作用の差による消化管発達への影響を評価したところ、GLP-2 分泌刺激作用の強い α -La 分解物 1 を含むミルクでは、消化管成熟が促進した。

次に α -La の腸炎におよぼす影響を調べるため、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) による腸炎を離乳後ラットに誘導し、 α -La による影響を評価したところ、 α -La は腸炎により誘導された体重増加抑制や大腸肥厚などを抑制し、その作用機序として Mucin 3 の産生増加や CD4⁺T 細胞における CD25⁺Foxp3⁺T 細胞プールを増加させていることが示唆された。

2. 乳中新規成分の解析

我々は以前にヒト母乳中に microRNA (miRNA) が存在することを示したが、産後経時変化、乳児に対する役割、他の種での存在は明らかでなく、母乳中 miRNA が乳児に対して作用を示すと仮定すると、乳児用調製乳の原料となる牛乳や、生体での役割を調べる上で必要となる実験動物の乳中の存在を示す必要がある。これらを検討するため、ウシおよびラットから初乳・成熟乳を

手に入れ、乳清から RNA を調製後、マイクロアレイ解析を行なうことにより、初乳中 RNA 濃度が成熟乳中よりも高いこと、ウシおよびラット乳中にも miRNA が存在することを明らかにした。また、miRNA だけでなく 1 万種以上の mRNA も含まれていることを明らかとした。さらに、乳中 RNA は酸や RNase に対して抵抗性を持ち、界面活性剤処理に対しては速やかに分解したことから、脂質二重膜小胞エクソソームに包まれて存在していると考えられたが、体液中 RNA は膜小胞以外での存在も知られているため、牛乳から超遠心によりエクソソームを調製し、エクソソームと超遠心上清から調製した RNA をマイクロアレイにより比較することで、miRNA はエクソソーム以外の形態でも乳中に存在し、mRNA はほとんどがエクソソーム内に存在することを明らかにした。最後に、ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用い、マクロファージ様に分化後に牛乳由来エクソソームを添加し、検討を行なうことで、異種乳由来エクソソームのヒト細胞への取り込みを確認し、TNF- α 産生を抑制することも確認した。

3. *Bifidobacterium breve* M-16V が新生児消化管および免疫能に与える作用

母乳栄養児と人工栄養児には腸内細菌叢に差があることが知られている。腸内細菌叢は乳幼児の免疫発達に重要であると考えられており、乳酸菌やビフィズス菌などの有益菌が少ないことはアレルギーリスクを高めることなどが知られている。乳酸菌やビフィズス菌などの有益菌はプロバイオティクスとして利用されているが、ヒト乳児消化管では乳酸菌よりもビフィズス菌の方が圧倒的に優勢であるため、本研究の目的に鑑み、一般に乳児に多いとされる *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) の 1 株である *B. breve* M-16V (M16V) を選択した。また、乳児用調製粉乳は 70℃ で調乳することが一般的であるため、プロバイオティクス配合調製乳としての利用にはフォローアップミルクが第一選択として考えられる。同ミルクを使用する時期である離乳期は、菌叢が劇的に変化する時期でもある。従って離乳期の免疫発達を中心に検討した。また、炎症は様々な疾患の引き金となるが、生後早期の炎症に関する知見は限られている。従って、大腸炎が離乳期免疫系発達に及ぼす影響と、M16V が大腸炎に対して及ぼす影響を併せて検討した。その結果、離乳期の大腸炎は、体重増加抑制、大腸の短縮、低たんぱく質栄養状態、貧血、全身性の T 細胞機能低下、大腸での炎症性サイトカイン増加を引き起こし、大腸内容物中の *Bifidobacteria*、*Enterobacteriaceae* の増加と、*B. breve*、*Lactobacillus* の減少を誘導した。M16V は大腸短縮、血中アルブミン値の低下、血中ヘモグロビンの低下、T 細胞機能低下の一部、大腸炎症性サイトカイン増加の一部（特にマクロファージ浸潤関連因子）、*Enterobacteriaceae* の増加、*B. breve* の減少を抑制することができた。非炎症群間の比較から、M16V 投与により、血液リンパ球中の NK 細胞割合増加、脾臓 T 細胞の IL-10、IL-17A 産生低下が起こったが、特に有害な事象は認められなかった。以上の結果より、M16V は炎症を抑制し、新生児期だけでなく、離乳期においても安全に使用可能なプロバイオティクスであることを示すことができた。

以上より、既知成分である乳たんぱく質の一部に、GLP-2 分泌刺激作用があるという新規な生理作用を見出すことができ、乳中に含まれる新規生理活性因子である miRNA、mRNA の産後経時変化や、牛乳由来エクソソームのヒトへの作用の可能性、また、プロバイオティクス *B. breve* M-16V の炎症抑制作用を示すことができた。これらの知見は、「乳児用調製乳」をより「母乳」に近似させるための基礎的知見になりうると考える。