

学 位 論 文 題 名

マウス消化管内におけるウシラクトフェリンの静菌作用に関する研究

学位論文内容の要旨

人乳中に高濃度に存在するラクトフェリン（LF）は、*in vitro* において抗菌活性をはじめ多種類の生理活性を示すことから、乳児の感染防御に寄与する非特異的因子として推定されている。本研究は、乳汁に存在するラクトフェリンの生体内における生物学的機能を明らかにするため、乳とともに経口投与したLFの消化管内における抗菌活性の発現と腸内感染防御機能とを動物モデルを用いて証明することを目的に行われた。即ち、牛乳で飼育したSPF（specific-pathogen-free）マウスにウシLF（bLF）を経口投与し、消化管内の細菌に対する静菌作用およびその作用機序、糞便菌叢に及ぼす影響、並びに腸管から臓器へのバクテリアトランスロケーション（BT）に対する抑制作用について検討した。

1. マウス消化管内におけるウシラクトフェリンの静菌作用

牛乳とともに経口投与したbLFは、SPFマウスの消化管内に常在する *Enterobacteriaceae* に対して過剰増殖を抑制する静菌作用を示した。また、bLFの各種プロテアーゼ消化物は、いずれもbLFと同様の *Enterobacteriaceae* に対する静菌作用を示した。さらに、牛乳とともに経口投与したbLFは、SPFマウスに経口的に投与したclostridiaに対してもその腸内増殖を抑制する静菌作用を示した。これらの静菌作用は、bLFの投与濃度、投与時期および投与期間、並びにclostridiaの投与菌数に依存性を示したが、bLFの鉄結合能および三次構造、並びに *in vitro* における静菌作用には依存しなかった。なお、bLFの静菌作用は、供試した他のタンパク質では認められない特長的な作用であった。これらの結果から、bLFは牛乳飼育マウスの消化管内において、プロテアーゼで消化された場合にも静菌作用を発現することを明らかにした。

2. ウシラクトフェリンの静菌作用に関する作用機序

滅菌牛乳とともに経口投与したbLFは、無菌マウスの盲腸内容物中の乳糖、乳糖由来のグルコースおよびガラクトースの濃度をいずれも顕著に低下させた。また、SPFマウスの反転小腸を用いた *in vitro* 試験において、bLFあるいはbLFペプシン消化物が 10 mg/ml 前後の濃度で存在する場合に、グルコースの吸収が促進される傾向が認められた。これらの結果は、牛乳とともに経口投与したbLFマウスが小腸内において乳糖の分解および乳糖由来の単糖の吸収を促進する機能を有することを強く示唆した。なお、小腸の β -D-ガラクトシダーゼ活性はbLF投与によって影響を受けなかった。しかし、無菌マウスの盲腸内容物中の乳糖濃度と単糖濃度に正の相関関係が見られたことから、bLF投与による単糖の吸収促進によって乳糖の分解も促進される可能性を示唆した。

一方、SPFマウスにおいて、牛乳飼料中の糖質の種類および濃度に依存する腸内菌の増殖

は、糖質濃度が過剰な場合を除いて、bLFの経口投与によって抑制された。以上の結果から、牛乳飼育SPFマウスの消化管内におけるbLFの静菌作用は、bLFが小腸における乳糖の分解および吸収を促進することによって消化管内の糖質濃度が低下し、結果的に腸内菌の増殖が抑制される現象であることを推定した。

3. マウス糞便菌叢に及ぼすウシラクトフェリンの影響

牛乳とともに経口投与したbLFおよびbLFペプシン消化物は、SPFマウスの糞便菌叢をbifidobacteria優勢に維持し、*Enterobacteriaceae*、streptococci、clostridia等の糞便中菌数を低水準に抑制する効果を示した。糞便菌叢の中でも、*Enterobacteriaceae*はbLFの投与に最も鋭敏に反応し、その静菌作用を受ける腸内菌であった。また、牛乳飼育SPFマウスにおけるbifidobacteriaの腸内増殖は牛乳中の乳糖濃度に依存することが示された。一方、*Enterobacteriaceae*の腸内増殖は、マウス小腸内における乳糖の加水分解によって生じるグルコースに依存し、同時にグルコース効果によって菌の乳糖利用が抑制される機構が示唆された。従って、牛乳飼育SPFマウスの消化管内においては*Enterobacteriaceae*等に利用されない乳糖が他の腸内菌特にbifidobacteriaの増殖に利用されることを確認した。

4. ウシラクトフェリンの腸内感染防御機能

SPFマウスの腸管から腸間膜リンパ節へのBTは、牛乳飼育によって100%の発生率で誘導された。一方、牛乳にbLFあるいはbLFペプシン消化物を添加すると、BT発生率および腸間膜リンパ節から検出された細菌数は顕著に低下した。腸間膜リンパ節から検出された細菌は、*Enterobacteriaceae*をはじめ好気性細菌が主要な細菌であった。なお、対照として用いたカゼインナトリウムは、BTに対する抑制作用を示さなかった。牛乳飼育マウスに見られたBT発症の要因として、腸内菌の過剰増殖以外に他のBT誘導モデルで報告されている免疫能の低下、腸管粘膜の損傷、組織形態の萎縮等の現象は認められなかった。これらの結果から、牛乳飼育マウスにおけるbLFのBT抑制作用は、好気性腸内菌の過剰増殖に対する静菌作用に起因すると考えた。

牛乳飼育マウスにおけるbLFの静菌作用およびBT抑制作用との関連性は認められなかったが、bLFはタイプ1線毛保有 *E. coli* のモルモット赤血球凝集反応を強く阻害した。また、bLFの高マンノース型糖鎖がタイプ1線毛レクチンの受容体として機能し、同 *E. coli* の動物細胞への付着が阻害されることも示された。これらの結果は、経口摂取されたbLFが消化管内においてプロテアーゼ消化されても、タイプ1線毛保有細菌に対する潜在的な感染防御機能を発現するものと考えられた。

5. 乳汁中ラクトフェリンの生理学的意義

本研究によってbLFの生体内における抗菌活性の発現、糞便菌叢に及ぼす影響および腸内感染防御機能を確認し、新たなbLFの生物学的機能として糖吸収促進作用を見出した。一方、母乳栄養児の糞便菌叢はbifidobacteria優勢であり、*Enterobacteriaceae*およびstreptococciの糞便中菌数は低水準に維持されることが知られている。そのため、母乳栄養児は人工栄養児と比較して腸内感染症の罹患率が低いと示唆されている。母乳栄養によって見られるこれらの現象は、本研究で示されたbLFの生物学的機能と極めて共通性が高いといえる。母乳栄養における人乳の機能および本研究によって確認されたbLFの機能から、乳汁に存在するLFは腸内菌叢に影響を及ぼすとともに、宿主の感染防御および栄養吸収に寄与する生理活性物質であることが明らかになった。

以上、本論文は乳とともに経口投与したbLFの生体内における生物学的機能を検証し、乳汁に存在するLFの生理学的意義を明らかにしたものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	島崎敬一
副査	教授	高橋興威
副査	教授	富田房男
副査	助教授	三河勝彦

学位論文題名

マウス消化管内におけるウシラクトフェリンの静菌作用に関する研究

本論文は図20、表17を含む115ページからなる和文論文で、別に13編の参考論文が添えられている。

人乳中に高濃度に存在するラクトフェリンは、*in vitro* において抗菌活性をはじめ多様な生理活性を示すことから、乳児の感染防御に寄与する非特異的因子と推定されている。本研究は乳汁に存在するラクトフェリンの生体内における生物学的機能を明らかにすることを目的として行われ、乳とともに経口投与したラクトフェリンの消化管内における抗菌活性の発現および腸内感染防御機能を、動物モデルを用いて証明したものである。研究成果は以下の様に要約される。

1. マウス消化管内におけるウシラクトフェリンの静菌作用

牛乳と共に経口投与したウシラクトフェリンあるいはそのプロテアーゼ消化物の何れもが、SPF (specific-pathogen-free) マウスの消化管内に常在する *Enterobacteriaceae* の過剰増殖および経口投与した *clostridia* の腸内増殖を抑制する静菌作用を示すことを明らかにした。これらの静菌作用はラクトフェリンの投与濃度、時期、期間、ならびに *clostridia* の場合はその投与菌数に依存した。なお、ラクトフェリンの静菌作用は、供試した他のタンパク質では認められない特徴的な作用であり、また各種のプロテアーゼで消化された場合にも静菌作用を示すことを見いだした。

2. ウシラクトフェリンの静菌作用に関する作用機序

無菌マウスにラクトフェリン添加滅菌牛乳を投与し、その盲腸内の乳糖、乳糖由来のグルコースおよびガラクトースの濃度がいずれも顕著に低下することを観察した。さらにラクトフェリンあるいはそのペプシン消化物によるグルコースの吸収促進作用を、反転小腸を用いた *in vitro* の試験によって確認した。また、小腸の β -D-ガラクトシダーゼ活性はラクトフェリン投与によって影響を受けなかった事実も考慮すると、牛乳飼育SPFマウスの消化管内における静菌作用は、ラクトフェリンが小腸における乳糖の分解および吸収を促進することによって消化管内の糖質濃度が低下し、結果的に腸内菌の増殖が抑制される現象であると指摘した。

3. マウス糞便菌叢に及ぼすウシラクトフェリンの影響

牛乳とともに経口投与したラクトフェリンあるいはそのペプシン消化物が、SPFマウスの糞便菌叢を *bifidobacteria* 優勢に維持し、一方 *Enterobacteriaceae*, *streptococci*, *clostridia* などを低水準に抑制する効果を見いだした。特に、*Enterobacteriaceae* はラクトフェリン投与に最も鋭敏に反応した菌であった。また、牛乳飼育SPFマウスにおける *bifidobacteria* の腸内増殖は牛乳中の乳糖濃度に依存することを示した。さらに *Enterobacteriaceae* の腸内増殖は、マウス小腸内における乳糖の加水分解によって生じるグルコース濃度に依存し、同時に菌の乳糖利用が抑制される機構が示唆された。牛乳飼育SPFマウスの消化管内においては *Enterobacteriaceae* 等に利用されない乳糖が特に *bifidobacteria* の増殖に利用されることも確認した。

4. ウシラクトフェリンの腸内感染防御機能

SPFマウスにおいては、腸管から腸間膜リンパ節へのバクテリアトランスロケーションが牛乳のみの投与によって誘導される。しかし、牛乳とともに経口投与したラクトフェリンあるいはそのペプシン消化物は抑制効果を示し、ラクトフェリンが腸内感染防御機能に大きく寄与していることを認めた。なお、対照として用いたカゼインはこの様な抑制作用を示さなかった。また、腸間膜リンパ節から検出された細菌は *Enterobacteriaceae* をはじめ好気性細菌が主体であった。バクテリアトランスロケーションの要因として、腸内菌の過剰増殖以外の免疫能低下、腸管粘膜損傷、組織形態の萎縮等の現象は認められなかった。これらの結果から、上記の抑制作用は好気性腸内菌の過剰増殖に対する静菌作用に起因すると考察した。

5. 乳汁中ラクトフェリンの生理学的意義

ラクトフェリンの生体内における抗菌活性の発現、糞便菌叢におよぼす影響および腸内感染防御機能を確認し、新たな生物学的機能として糖吸収促進作用を見出した。母乳栄養児の糞便菌叢は *bifidobacteria* 優勢であり、*Enterobacteriaceae* および *streptococci* の糞便中菌数は低水準に維持されるために、母乳栄養児は人工栄養児と比較して腸内感染症の罹患率が低いと示唆されている。母乳栄養によって見られるこれらの現象は、本研究で示されたラクトフェリンの生物学的機能と極めて共通性が高いといえる。

以上の動物モデルを用いたラクトフェリンの *in vivo* での研究成果は、ラクトフェリンの機能の解明および乳児栄養への応用についても貢献するところが大きく、学術および応用の両面から高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 寺口 進は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。