

## ■ 研究課題名

### 初乳成分の高度利用技術の開発

## ■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① プロテオミクス手法による初乳からの生理活性蛋白質・ペプチドの探索  
（◎浦島 匡／国立大学法人帯広畜産大学畜産学研究科）
- ② 初乳の分画と成分中の抗微生物、免疫調整物質探索技術の開発  
（橋本 修一（H17-19）、岡本 明治（H20-21）／ニュテックス株式会社）
- ③ 免疫調整物質の探索  
（五十嵐 慎（H17-19）、川本 恵子（H20-21）／国立大学法人帯広畜産大学原虫病研究センター）
- ④ 初乳由来の抗微生物、免疫活性物質による疾病制御技術の開発  
（磯部 尚／（独）農研機構動物衛生研究所）
- ⑤ 化学修飾シアル酸含有オリゴ糖の抗ウィルス作用の解析  
（寺林 隆志／学校法人北里研究所北里大学理学部）
- ⑥ ミルクオリゴ糖による抗インフルエンザウィルス剤の開発  
（森田 稔／東光薬品工業株式会社東京研究所）

## ■ 研究の目的

未利用資源である初乳より機能性の期待されるミルクオリゴ糖を産業的なレベルで分画する技術を確立するとともに、ミルクオリゴ糖やその化学的誘導体による各種の病原性細菌、ウィルス、原虫に対する抗感染作用や免疫細胞に対する調整作用をアッセイすることで、同画分の実際への利用を検討する。一方、初乳より新たな機能性成分を探索し、構造解析ならびにその分離技術の開発を行ってその利用を図る。

## ■ 主要な成果

- ① 初乳からの効率的なシアル酸含有オリゴ糖調製技術の開発  
初乳からクロロホルム/メタノール抽出、2回のゲル濾過ならびに順相クロマトグラフィーの組み合わせで4種類のシアル酸含有オリゴ糖（3'-SL、6'-SL、6'-SLN、DSL）を効率的に調製する方法を開発した（図1）。
- ② シアル酸含有オリゴ糖からのシアログリコサイドの効率的調製技術の開発  
シアル酸含有オリゴ糖を原料とし、炭酸水素アンモニウムおよびC12～C18脂肪酸の縮合反応を行い、効率的にシアログリコサイドを調製する方法を開発した（図2）。
- ③ シアログリコサイドによる抗ヒトインフルエンザウィルス活性の発見  
MDCK細胞に対するヒトインフルエンザウィルス感染後の増殖阻害実験で、シアログリコサイドにアマンタジンと同程度の強さの抗ウィルス活性を発見した（表1）。ヒトインフルエンザウィルスを感作したマウスへの経口投与実験で、シアログリコサイドはタミフル投与と同様に100%の生存率を示した（図3）。
- ④ シアログリコサイドを不織布に固定化した抗インフルエンザウィルスマスクの開発  
シアログリコサイドを含潤した各不織布に、抗ヒトインフルエンザウィルス活性の維持を確認した（表2）。また、シアログリコサイドを含有した抗ウィルススプレー製剤をマスクに噴霧しても抗ウィルス効果が維持されることを確認した。
- ⑤ 初乳からの新規抗インフルエンザタンパク質の発見  
初乳から分画した画分に、MDCK細胞を使用した抗ヒトインフルエンザウィルス増殖阻害実験で、タミフルと同程度の強さの抗インフルエンザウィルス活性を発見した（表3）。

抗インフルエンザ活性を有するタンパク質は、トリプシンインヒビターであることが発見された（図4）。

⑥ 初乳からの新規免疫調整ペプチドの発見

初乳より分画した成分にマスト細胞脱顆粒化抑制作用（図5）、リンパ球増殖促進作用を発見した。それらの活性を有するペプチド成分は構造決定され、マスト細胞脱顆粒化抑制作用を有するのは $\alpha s1$ -カゼイン N 末端由来の3～8アミノ酸残基を有するペプチドであることが発見された。

⑦ 初乳から血圧降下が期待される作用や卵包顆粒細胞抗アポトーシス作用を有するペプチドの発見

上のマスト細胞脱顆粒化抑制作用を有する8アミノ酸残基を有するペプチド成分に、アンジオテンシンI変換酵素阻害作用（図6）と卵包顆粒細胞抗アポトーシス作用を発見した（図7）。

⑧ 初乳を利用した家畜飼料調製技術の開発

初乳から分画したタンパク質画分をブロメライン（タンパク質分解酵素）処理し、それを添加した飼料を用いてマウス生育試験を行なって、1日あたりのマウスの食餌量変化ならびに飼料投与によるマウスの体重変化を調査した。処理飼料を添加したマウスの体重増加の方が大きい傾向を認めた（図8）。酵素処理をすることで、生体に有益なペプチドを添加する付加価値が示唆された。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 特開 2007-308444：シアル酸含有糖鎖複合体及びその製造包、並びに、該シアル酸含有糖鎖複合体を含有する抗インフルエンザウィルス剤：学校法人北里学園、東光薬品工業株式会社
- ② 特願 2009-186487：新規ペプチド、トリプシン阻害剤、抗インフルエンザウィルス剤、及び抗体：学校法人北里学園、東光薬品工業株式会社
- ③ Terabayashi, T., *et al.* Inhibition of influenza-virus-induced cytopathy by sialylglycoconjugates. *Carbohydr. Res.*, 341: 2246-2253 (2006).
- ④ Fukuda, K., *et al.* Evidence for the presence of a putative odrant-binding protein in bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, 92: 4992-4996 (2009).

■ 今後の展開方向

- ① 本プロジェクトで発見したシアログリコサイドやトリプシンインヒビターによる抗インフルエンザウィルス活性を基に、それらの抗インフルエンザウィルス剤としての実用化を目指す。
- ② 本プロジェクトで発見した $\alpha s1$ カゼイン由来のペプチド成分による免疫調整作用や血圧降下が期待される作用を基に、常乳を原料として同ペプチドを効率的に調製する方法の開発を行い、機能性食品素材や家畜飼料添加素材としての実用化を目指す。

■ 問い合わせ先

- ① 抗インフルエンザウィルス剤の開発：学校法人北里研究所北里大学理学部  
(042-778-8655) (terabaya@sci.kitasato-u.ac.jp)
- ② 免疫調整また血圧降下素材の開発：国立大学法人帯広畜産大学  
(0155-49-5566) (urashima@obihiro.ac.jp)

■ 研究成果の具体的図表

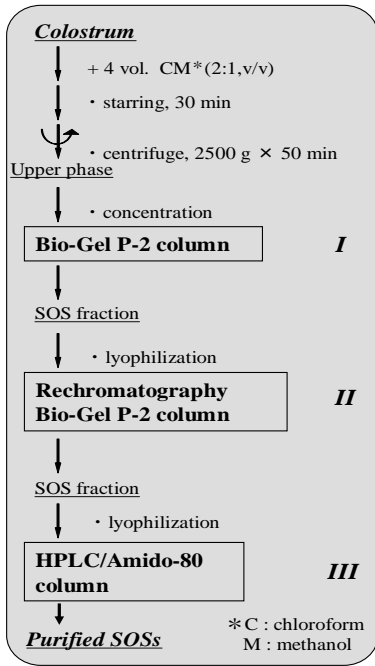


図1. シアル酸含有オリゴ糖の調製

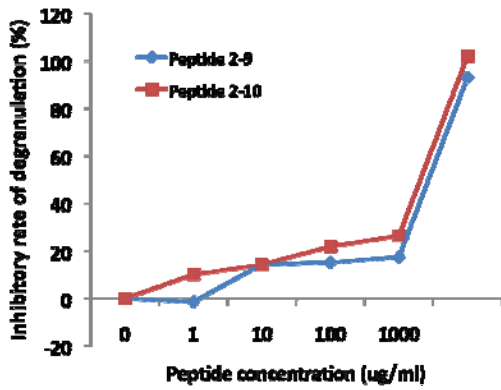


図5. 初乳ペプチドによる抗アレルギー活性

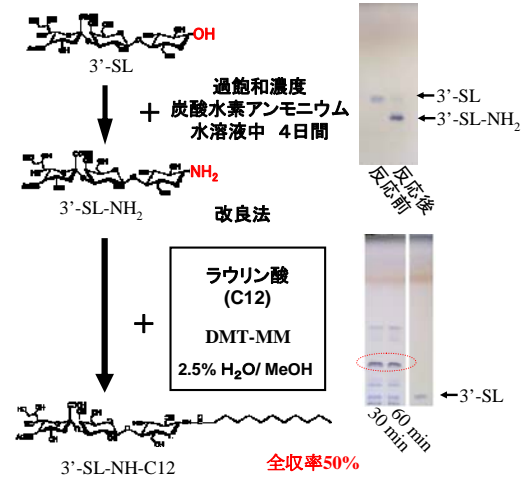


図2. シアログリコサイド合成の改良法

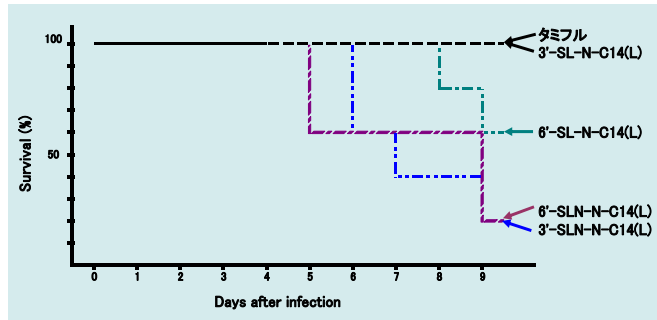


図3. マウスでのシアログリコサイドの抗インフルエンザウイルス効果

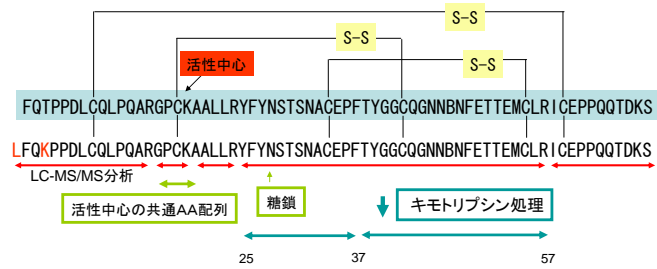


図4. ウシ初乳由来トリプシンインヒビター

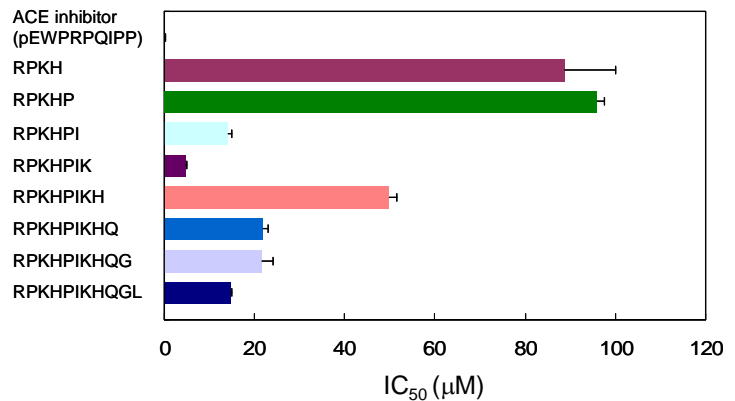


図6. ACE 阻害活性

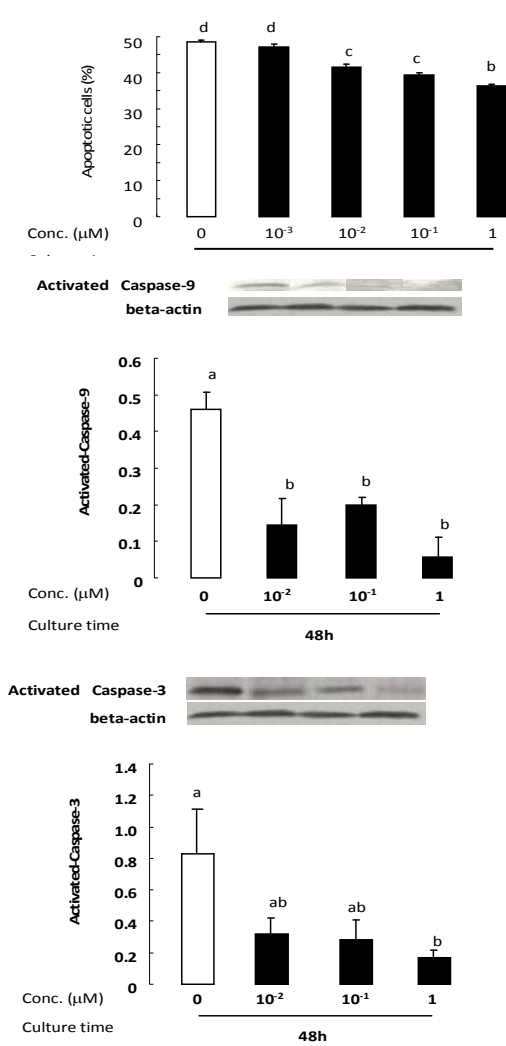


図7. ペプチドの卵胞細胞抗アポトーシス作用

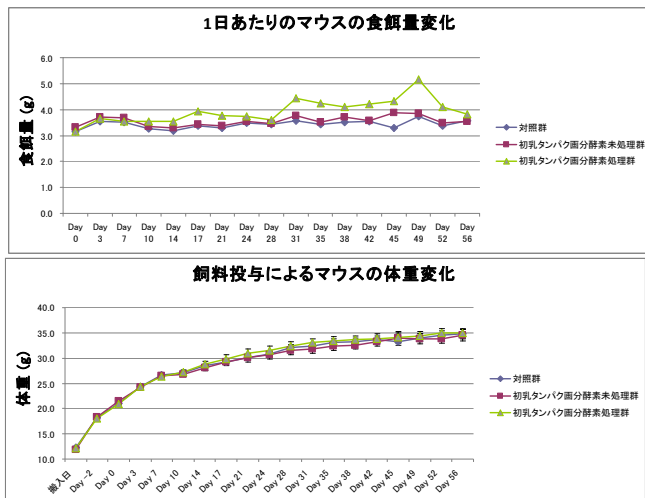


図8. ウシ初乳タンパク質画分給餌がマウスの体重に与える影響

(A/PR/8/34)

素材	IC50 (μg/ml)
3'-SL -N-C12	286.5
3'-SL -N-C14	56.5±21.9
3'-SL -N-C16	22.5± 4.7
3'-SL -N-C18	4.0
3'-SLN-N-C14	114.0
6'-SL -N-C14	99.4±51.6
6'-SLN-N-C14	85.3±11.1
薬剤	IC50 (μg/ml)
オセルタミビル(タミフル)	0.9±0.13
ザナミビル(リレンザ)	0.5
アマンタジン塩酸塩	30.9

素材添加条件: 感染時(-)・感染後(+)

IC<sub>50</sub>: 対照群の50%まで阻害する濃度(μg/ml)

表1. シアログリコサイド素材のインフルエンザウイルス阻害作用

不織布	シアログリコサイド	
	6'-SLN-N-C14 (U)	6'-SLN-N-C18 (L)
LPO 252D PPスパンボンド 25g/m <sup>2</sup>	45.0	89.0
3201A スパンボンド PPT100% 20g/m <sup>2</sup>	81.0	96.0
3301A スパンボンド PPT100% 30g/m <sup>2</sup>	95.3	95.8
QC-25 サーマルボンド PP/PE 25g/m <sup>2</sup>	78.0	95.4
QC-30 サーマルボンド PP/PE 30g/m <sup>2</sup>	83.0	97.3
BT-0605W 30g/m <sup>2</sup>	81.0	96.2

\* 50 μg/cm<sup>2</sup>を不織布に含浸

\* 1X10<sup>6</sup>PFU/ml ウィルス (A/PR/8/34) を作用

表2. シアログリコサイド含浸不織布の抗ウイルス効果

(A/PR/8/34)

素材	IC50 (μg/ml)
高分子1	0.3±0.03
高分子2	1.3±0.40
低分子1	0.6±0.28
低分子2	1.5±0.66
薬剤	IC50 (μg/ml)
オセルタミビル(タミフル)	0.9±0.13
リレンザ(ザナミビル)	0.5
アマンタジン	30.9

素材添加条件: 感染時(-)・感染後(+)

IC<sub>50</sub>: 対照群の50%まで阻害する濃度(μg/ml)

表3. トリプシンインヒビターのインフルエンザウイルス増殖阻害活性