

# 最近20年間の酪農科学研究の国内外での進展と将来

齋藤 忠夫\*

(東北大学大学院農学研究科, 〒980-8572 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉468-1)

## Domestic and International Progress and Future of Dairy Science Research over the Last 20 Years

Tadao SAITO

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba 468-1, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8572, Japan)

### I. はじめに

公益財団法人日本乳業技術協会は創立70周年を迎え、2000年の創立記念50周年記念号(第50巻)の執筆より、早20年が経過した。そこで、この20年間の国内外における乳・乳製品の酪農科学研究の進展について俯瞰し、今後の将来研究について考えてみたい。

### II. 乳成分に関する研究

#### 1. 糖質

哺乳類は、乳を分泌する脊椎動物と定義され、現存する種としては単孔類、有袋類、真獣類(有胎盤類)の3系統に分類される。真獣類の哺乳類の大半が分泌する乳の主要糖質は、「乳糖(ラクトース)」である。乳糖は、泌乳期の乳腺上皮細胞内で乳糖合成酵素によりグルコース(Glc)をアクセプター、UDP-ガラクトース(Gal)をドナーとして生合成される。この乳糖合成酵素は、 $\beta$ 4ガラクトース転移酵素と乳清タンパク質の $\alpha$ -ラクトアルブミン(La)から構成される。 $\alpha$ -Laは細菌の細胞壁ペプチドグリカンを加水分解する殺菌性のリゾチームと構造に相同性があることから、リゾチームからの分

子進化により出現したものと考えられている。初期の哺乳類においては、乳腺上皮細胞での $\alpha$ -Laの発現量が低く、乳糖の合成速度が遅いため、ミルクオリゴ糖(MO)の方が優先的に多く合成されていたと考えられる<sup>1,2)</sup>。

#### 1.1. 乳糖(ラクトース)

牛乳の主要糖質成分は乳糖であり、グルコースとガラクトースから構成された還元性2糖である。グルコースとガラクトースは、その化学構造は類似しているにも拘わらず、生体内での反応は全く異なる。グルコースはエネルギーとして利用され、ガラクトースは脳神経系の成熟にも重要であると考えられている<sup>3,4)</sup>。

グリコーゲンは運動時の主要なエネルギー源であり、体内のグリコーゲンが枯渇すると運動パフォーマンスは低下する。グリコーゲンを素早く回復させる方法は、これまでに数多くの研究が報告されている。具体的には、糖質は運動後すぐに摂取する、糖質とタンパク質を同時に摂取することにより、グリコーゲンの回復を早める<sup>5)</sup>。また、糖質の種類によって差があり、グルコースよりもガラクトースの方が素早くグリコーゲンを回復させる。牛乳は糖質に加えてタンパク質も豊富に含む栄養素組成から、運動後の回復期に摂取する飲料として非常に適してい

\* 日本酪農科学会前会長, 東北大学名誉教授  
E-mail: tadao.saito.a3@tohoku.ac.jp

る。

また、乳糖の試験法については、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）」では加糖練乳などの乳製品にはレイン・エイノン法を用いているが、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による国際酪農連盟（IDF）による国際標準法（IDF198）は、液状乳や粉乳の分析法として多くの国々で実施されている。（公財）日本乳業技術協会において両試験法の国際的な整合性を検討した結果、整合性が確保されていることが確認された<sup>6)</sup>。

## 1.2. ミルクオリゴ糖（MO）

哺乳動物乳では、とくに初乳において乳糖以外のオリゴ糖が含まれており、「ミルクオリゴ糖（MO）」と呼ばれている。ウシ常乳ではほとんど検出されないが、ウシ初乳にはMOが含まれている。人乳は初乳で22-24 g/L、常乳でも12-13 g/Lと高濃度のMOを含んでいる。人乳に関してはこれまでに100種類以上のMOの化学構造が解明されており、人乳MOはコア骨格に基づいて13系列に分類されている。これらのMOの化学構造における多様性は、還元末端に位置する乳糖の基本コア骨格に、さらにN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、ガラクトース（Gal）、フコース（Fuc）やシアル酸（Neu5Ac, Neu5Gc）などが転移・付加することで生まれる。また、一部の哺乳類ではオリゴ糖に硫酸基やリン酸基を結合しているものが存在し、その生理的な意義が注目されている<sup>7)</sup>。

MOにおいて構造化学的に興味深いのは、ヒトMOではGal( $\beta$ 1-3)GlcNAcを含む「タイプI型」オリゴ糖と、Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAcを含む「タイプII型」オリゴ糖が共存するが、I型が優先的である。一方、ヒト以外の多くの哺乳動物乳では、タイプII型オリゴ糖しか発見されていないことより、I型MOの存在はヒト固有の特徴であると考えられる<sup>8)</sup>。

MOの生物学的な存在意義は、ビフィズス菌などの腸内有用細菌の特異的な糖源の「ビフィズス因子」として増殖・定着を促進し、また病原菌の認識結合する糖鎖受容体と近似した化学構造を有することに

よる「感染防御因子」としての役割が推定されている<sup>9,10)</sup>。

MOのビフィズス因子と感染防御因子としての機能性の他に、最近では「腸脳相関」の観点から、MO摂取が腸内細菌叢を介して脳機能にどのような影響を与えるかを検討した研究もある。シアル酸を含む酸性3糖である3'-シアリルラクトース（SL）と6'-SLを成体マウスに2週間経口投与した後、社会的ストレスを与えた後の不安傾向を測定すると、不安様行動の程度がMO投与により緩和した。乳由来のシアル酸化合物の利用については、福留と酒井の解説が優れている<sup>11)</sup>。

また、2'-フコシルラクトース（FL）を成体マウスに投与すると、空間記憶試験の成績が上昇し、海馬CA3-CA1シナプスの長期増強が亢進した。また、授乳期に2'-FLを投与することで、成体になってからの学習や記憶能力が上昇した。ラット幼少期のガラクトオリゴ糖（GOS）投与は、成体のシナプスマーカータンパクの発現や神経機能に深く関わるN-Methyl-D-Aspartate(NMDA)受容体や神経栄養因子（Brain derived neurotrophic factor: BDNF）の発現量を上昇させた。また、授乳期に3'-SLや6'-SLを仔豚に投与すると、前頭葉におけるシアル酸濃度が上がった。ただし、これらの研究も脳機能や脳発達におけるオリゴ糖の作用機序については、限定的にしか明らかにしていない。

このように、MOにはプレバイオティクス、感染防御、免疫調整、腸管成熟、腸脳相関などの多種類の生理的な役割が示唆され、種特異的なMOの進化が乳仔を感染から守り、成長や健康維持に対して重要な役割をもつようになったことが推定される。

## 1.3. ガラクトオリゴ糖（GOS）

ガラクトオリゴ糖（GOS）は、牛乳や人乳など哺乳動物乳中の、とくに初乳中に含まれるMOの一種である。プレバイオティクスとしての機能を持つGOSは、工業的には高濃度の乳糖に乳糖加水分解酵素である $\beta$ -ガラクトシダーゼを作用させ、糖転移反応により製造する。GOSはヒトの消化酵素

では消化されないが、ビフィズス菌などの腸内細菌により利用され腸内環境が改善される。

国内では、担子菌酵母の1種である *Sporobolomyces singularis* を育種改良し、微生物変換法による GOS 製造プロセスが確立されている。2012年には、GOS に含まれる微量のオリゴ糖により日本国内や東南アジアにおいてアレルギーの発症例があり<sup>12)</sup>、2014年にはその原因となる中性オリゴ糖 [(Gal $\beta$ 1-4(Gal $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-6)Glc)] が同定された<sup>13)</sup>。Kaneko らにより、本アレルギー性オリゴ糖を含まない GOS が、*Sp. singularis* の高力価変異株の濃縮液 (YC-Y) と酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼを組み合わせて製造された<sup>13)</sup>。

GOS には、腸内環境改善効果、便性改善、ミネラル吸収促進などの生理効果が期待されるが、これらはビフィズス菌に優先的に利用され「酢酸 (さくさん)」が活発に下部消化管で産生されるためと考えられている。

#### 1.4. グリコサミノグリカン

グリコサミノグリカン (プロテオグリカン) は、複合糖質の多糖鎖部分の総称であり、100残基にも及ぶ高分子量の糖鎖構造を有し、構成糖はアミノ糖誘導体とヘキソース誘導体の繰り返し2糖単位が直鎖状に配列する特徴がある。この2糖単位の種類により、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸などの種類に分類される。

1978年には、Lis らが牛乳脂肪球皮膜にグリコサミノグリカンが含まれることを報告し、1981年には Shimizu らは人乳脂肪球皮膜にヘパリン硫酸が含まれることを報告した。1995年には、Newburg らは人乳中のグリコサミノグリカンが、宿主細胞の CD4 受容体にエイズウイルス糖タンパク質 (gp120) が結合するのを阻害する機能特性を報告した。牛乳と人乳では、グリコサミノグリカンの組成が異なること、人乳では泌乳期によっても組成が変化することが報告されている。

1999年には、Almeida らにより連鎖球菌がウシ

乳腺上皮細胞に感染する際に、グリコサミノグリカンと  $\beta$ -カゼインの分子架橋を利用することが報告された。2010年には、Nadolska らによりラクトフェリンは細胞表層のヘパラン硫酸と結合し、繊維芽細胞によるポリープ形成を阻害することが報告された<sup>14)</sup>。2011年には、Coppa らによりグリコサミノグリカンが人乳には牛乳の約7倍多く含まれることが報告された<sup>15)</sup>。消化されなかったグリコサミノグリカンは、腸管での病原体との相互作用や、腸管への付着阻止などの作用が推定されている。

## 2. 乳タンパク質

牛乳中のタンパク質は、約80%を占めるカゼインと約20%を占める乳清 (ホエイ) タンパク質からなっている。脱脂乳において、pH4.6で沈殿する画分をカゼイン、沈殿しない画分が乳清タンパク質と定義される。これら乳タンパク質の進化経路については、2013年の Oftedal<sup>16)</sup>の解説が詳しい。

また、乳タンパク質の摂取後の免疫系を介した多様な生体防御機能に関しては、大谷の考察<sup>17)</sup>が、乳タンパク質と乳ペプチドの生化学的解析からの腸管生理学については、清水の総説<sup>18)</sup>が、乳・乳製品に含まれる糖付加タンパク質については、松田の総説<sup>19)</sup>が優れている。

### 2.1. カゼインとカゼインミセル

牛乳中の主要タンパク質であるカゼインは、消化性に優れていることから、これまでは「アミノ酸の供給源」としてのみ考えられてきた。しかし、1979年には、Brantl らが牛乳カゼインの消化物からオピオイド活性を持つペプチドを単離し、その後も沢山の生理活性ペプチドが報告された。現在では、カゼインのアミノ酸配列に含まれる潜在的な生理活性は、新生仔の健全な発育にとって重要な役割を担っていると考えられている。牛乳カゼインから分離された「カゼインホスホペプチド (CPP)」や「アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害ペプチド」は、わが国の消費者庁の許可する特定保健用食品 (トクホ) 用の素材としても利用されている。

カゼインの乳中での存在形態については、1992年の Holt により、極めて大きな学説と解釈の進展があった。それは、「カゼインミセル (CM) の存在の否定」であった。これまで、カゼインは、 $\alpha_{s1}$ 、 $\alpha_{s2}$ -および  $\beta$ -カゼインの疎水領域で結合したサブミセルを内部に、外部には表面に親水性の  $\kappa$ -カゼインの存在比の高いサブミセルが覆い、それらの集合体としてのカゼインミセルとして存在する、と考えられていた。また、CM 構造を強固にするために、サブミセル間を結合する「コロイド状リン酸カルシウム (CCP)」により架橋された構造が広く信じられていた。電子顕微鏡観察でも、その考え方と理論を裏付けする美しく鮮明な写真が学会誌には掲載されていた。

1958年に、Waugh は初めて CM の第一号を発表し<sup>20)</sup>、その後  $\alpha_s$ - $\beta$ -カゼインポリマーを  $\kappa$ -カゼインが取り囲む有名なコート・コアモデルを発表した。その後、多くの研究者により沢山の CM モデルが提案されている。現在でも、CM 中にサブミセルが存在するのか否か、また CM 中における架橋状の CCP の位置づけについては、統一的な見解は得られていない。

1967年に、Morr らは初めてサブミセルモデルを提案した<sup>21)</sup>。このモデルでは  $\kappa$ -カゼインが CM 内に均一に分布していたが、これはミセルサイズが小さくなるほど  $\kappa$ -カゼイン含量が増加するという事実をうまく説明できなかった。1976年には、Slattery がカゼイン成分組成の異なる両親媒性のサブ

ミセルから成る CM モデルを発表した<sup>22)</sup>。このモデルでは小 CM ほど  $\kappa$ -カゼインが多いことを説明できたが、内部の構造が曖昧であった。(図 1A) 1982年には、Schmidt はサブミセル間をカゼインのリン酸基を介して CCP が架橋する CM モデルを提案した。1990年には、Walstra によりサブミセル表面に  $\kappa$ -カゼインの糖ペプチド部分が溶媒中に突き出した髪の毛のように見える「ヘアモデル」を提案した<sup>23)</sup>。(図 1B)

サブミセルの存在は疑う余地が無いように思われたが、1992年に Holt は従来の CM モデルを否定した「ナノクラスターモデル」を提案した<sup>24)</sup>。このモデルは、ある程度均一な乳タンパク質のマトリックスの内部に、リン酸カルシウムのナノクラスターが存在し、ミセルの周囲には  $\kappa$ -カゼインの糖ペプチド部分が付き出した構造である。(図 1C) 1999年には、サブミセル構造を提唱している Walstra ですら、真のミセル構造は CM とサブミセルとの中間的な構造であるかもしれないと述べている。

2012年には、de Kruif らは、中性子小角散乱 (SANS) と X 線小角散乱 (SAXS) の測定とモデル計算により、種々の CM モデルの中では Holt のナノクラスターモデルが最も実験結果を説明できると報告した<sup>25)</sup>。最近の論文で引用されるのは多くが Holt モデルを基本としており、国際的にはこのカゼインナノクラスターモデルが主流となりつつある。これまでの CM モデルやサブミセルの存在と形態については、優れた総説がある<sup>26-30)</sup>。

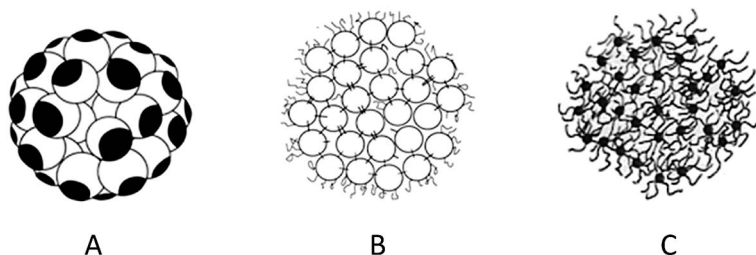


Fig. 1 3種の代表的なカゼインミセル(CM)モデル

- A Slattery モデル(1976年)
- B Walstra モデル(1990年)
- C Holt モデル(1992年)

## 2.2. 乳清タンパク質

チーズ産業より排出されるチーズホエイからの乳清タンパク質などの有用成分が分離され、それらの栄養補助食品や機能性食品への応用は近年盛んに行われている<sup>31)</sup>。

また、乳清タンパク質の健康機能とその利用性については、今井の総説が優れている<sup>32)</sup>。

### 1) ラクトフェリン (Lf)

「ラクトフェリン (Lf)」は、689のアミノ酸残基からなる分子量約8万 (78k) の糖タンパク質であり、多くの哺乳動物乳に含まれる。Lfは乳以外にも、涙、唾液などの外分泌液、好中球の二次顆粒にも含まれ、乳児だけでなく幅広い世代における生体防御に寄与する。古くから多機能タンパク質として知られ、鉄イオン結合能による抗菌作用や抗炎症作用、感染防御作用、抗肥満作用や腸内細菌叢の多様性を増加させ腸内環境を改善させる作用などが報告されている。

Lfはヒト初乳および常乳に、それぞれ1-3g/Lおよび5-7g/Lと多量に含まれている。Lfの受容体が消化管のマクロファージや白血球細胞に存在していることより、免疫調節タンパク質として推定されている<sup>33)</sup>。また、マウスを用いた研究では、Lfはサイトカインのインターロイキン(IL)-6や腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF)- $\alpha$ の産生を抑制する抗炎症作用を示した<sup>34-36)</sup>。また、Lfの示す乳がんや消化器がんなどに対する抗腫瘍作用の報告もある<sup>37,38)</sup>。Lfは、細菌やインフルエンザウイルスなどの一部の病原体による感染症に対して防御的に働いた<sup>39)</sup>。例えば、マクロファージ (RAW264.7細胞株) の培養液中にLfを投与すると、マウスノロウイルスの増殖抑制効果が認められた<sup>40)</sup>。

最近、中枢神経系における作用についても注目されており、Lfは血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) を通過して、脳内に到達すること<sup>41)</sup>やLf投与マウスでは、長期記憶や学習能力の向上が見られたこと<sup>42)</sup>、Lf投与マウスでは神経系の発達と認知

機能発達を促進する効果がみられること<sup>43)</sup>などの報告がある。また、これらのマウス脳では、シナプスの形成や神経細胞の増加や発達に必要な神経栄養因子 (BDNF) の増加がみられている<sup>44)</sup>。

また、摂取されたLfが消化過程でペプシンにより分解されると、さらに強力な抗菌作用を示す「ラクトフェリシン」というペプチドが副生する。牛乳Lf (f17-41) からの「ラクトフェリシンB」は、鉄結合性領域を含まないにもかかわらず、未消化のLfよりもグラム陰性菌、グラム陽性菌、酵母およびカビに対して強い抗菌作用を有している<sup>45)</sup>。Schibliらは、Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg領域のArgとTrpを介して、細菌細胞膜のリン脂質に結合することで、抗微生物活性の発現することを示した。また、ヒトLf由来の「ラクトフェリシンH (f1-47)」にも、大腸菌や黄色ブドウ球菌などへの抗菌作用が知られている。

また、Lfのトリプシン消化物から、回腸の収縮活性のあるヘキサペプチドである「ラクトメジン-2」 (LM-2: Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg) が報告されていたが、その後オキソトシン様の中枢神経系への作用を示すことも報告された<sup>46)</sup>。

ウシLfの健康増進効果や医療領域での応用性については、武田ら、川上、および上野の優れた総説がある<sup>47-49)</sup>。

### 2) 乳塩基性タンパク質 (MBP)

骨組織では、破骨細胞と骨芽細胞がそれぞれ骨吸収と骨形成を担い、骨代謝を制御している。この制御機構は、骨密度と骨質の維持に必須である。「乳塩基性タンパク質 (Milk Basic Protein: MBP)」は、牛乳に含まれる等電点が塩基性のタンパク質の集合体である。ヒトの研究やマウス個体または培養細胞を用いた解析により、MBPが破骨細胞の骨吸収を制御することが報告されている<sup>50)</sup>。

MBPの有効成分は、骨吸収抑制因子としてミルクスタチンとアンジオジェニンが、また骨形成促進因子として高分子キニノーゲンフラグメント1・2とHigh mobility group (HMG) タンパク質が同

定されている<sup>51,52</sup>)。高杉による乳・乳製品摂取が骨代謝に及ぼす影響についての報告がある<sup>53</sup>)。

ラットに MBP を投与し、二重エネルギー X 線吸収測定 (DXA) 法で大腿骨の骨塩量と骨密度を測定した結果、両値を増加させ骨強度を増強した<sup>54,55</sup>)。成人を対象とした研究により、MBP の摂取により血清中の骨芽細胞の分子マーカーが増加し、破骨細胞の分子マーカーが減少することが報告された<sup>56</sup>)。

さらに MBP のヒト介入試験も行われている。健康な日本人女性 (平均28歳) に対する二重盲検プラセボ対照試験で、6 ヶ月にわたり1日40 mg の MBP を投与すると、骨吸収マーカーの減少、骨形成/骨吸収比の上昇、骨密度の上昇が認められた。また、成人男性に16日間 MBP を投与 (300 mg/日) した場合、骨のリモデリングのバランスを保ちながら、骨形成を促進し、骨吸収を抑制することが確認されている<sup>57-60</sup>)。その後、マウスを用いた研究から、MBP の摂取が骨密度を増加させること<sup>61</sup>) が、また培養細胞を用いた研究より、MBP がマウス骨芽細胞 (造骨細胞) の分裂を促進すること<sup>62</sup>) が報告された。

さらに生化学的な解析により、MBP に含まれる「ラクトペルオキシダーゼ」が破骨細胞の活性を低下させることが明らかにされた<sup>63</sup>)。また、MBP には、「カテプシン K」という破骨に関わるプロテアーゼの阻害物質も含んでおり、骨を丈夫にするという機能性の一端を担っていると考えられている。

以上より、MBP は骨密度を増加させることが明らかにされたが、分子レベルでの MBP の破骨細胞への活性制御の分子機構は、いまだ未解明の点が多く存在する。

### 3) $\beta$ -ラクトグロブリン

乳清タンパク質のアレルゲン性を化学的アプローチで低減させた研究がある。乳清タンパク質の主成分である  $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -Lg) や  $\alpha$ -ラクトアルブミンは、分子内に SS 結合を多く含み、他のタンパク質と比較して消化性が低いことによりア

ルギーの原因となる「アレルゲン」となりやすい。

また、 $\beta$ -Lg の低アレルゲン化を目指しての研究も進められている。1977年、Lee と Sehon は、タンパク質にポリエチレングリコールなどの低免疫原性の物質を化学的に結合させてハイブリッド化することにより、低アレルゲン化を達成した<sup>64</sup>)。その後、糖質とのハイブリッド化により、低アレルゲン化を含めたタンパク質の機能改変が試みられるようになり、作出された新規の糖タンパク質は「ネオグリコプロテイン」と命名された。

Hattori らは、アレルゲン性の高い  $\beta$ -Lg に、免疫原性の低い酸性多糖であるカルボキシルメチルデキストランを結合させ、タンパク質の基本構造をほぼ維持した状態で、熱安定性の著しい上昇、レチノール結合能の保持、乳化性の改善、免疫原性の低減化などの機能改変に成功した。 $\beta$ -Lg 分子の遮蔽効率の高いハイブリッドでは免疫原性の低下が顕著であり、タンパク質の低アレルゲン化には分子量の大きい多糖とのハイブリッド化が有効であることが明らかにされた<sup>65,66</sup>)。

また、Tatsumi らはメイラード反応を利用して、 $\beta$ -Lg のオリゴ糖とのハイブリッド化や位置指定的なグリコシル化も試み、免疫原性の低減化を行った<sup>67</sup>)。このような研究は、アレルゲン性を発現するエピトープ部位に、位置指定的に糖鎖を導入すれば希望するタンパク質の機能改変が出来る可能性を示唆している。

### 4) $\alpha$ -ラクトアルブミン

$\alpha$ -ラクトアルブミン ( $\alpha$ -La) は、乳清タンパク質の主要成分の一つで、乳糖の乳腺上皮細胞での酵素的生合成には必須のタンパク質である。分子内の8個のシステインは SS 結合を形成しており、熱処理にも強く消化抵抗性も示すので、牛乳アレルギーの原因にもなる。2006年には、Pettersson らによりヒト  $\alpha$ -La はがん細胞のアポトーシスを引き起こすことが報告され、その後ウシ  $\alpha$ -La にも同様の機能のあることが報告された。この機能は、カルシウムの遊離により部分的にアンフォールディングした

$\alpha$ -La と乳脂肪に豊富に含まれるオレイン酸との複合体 (HAMLET) による<sup>68)</sup>。

## 5) ラクトフォリン

1970年, Kanno により, ウシ乳脂肪球皮膜から調製された可溶性糖タンパク質に対する特異抗体と交差反応性を示す乳清中の糖タンパク質として, ラクトフォリンが発見された。その後, ラクトフォリンは, プロテオースペプトン (牛乳を加熱後, 変性して凝集した沈殿を除去した上清画分) の画分 3 (分子量17 kDa) と同一であることが分かった。ラクトフォリンは135のアミノ酸残基からなり, その多様性は翻訳後のリン酸化 (5か所) や糖鎖付加 (N-型糖鎖が一本, O型糖鎖が2本) による。人乳中では, ラクトフォリンは見つかっていない。2004年には, Campagna らにより, ラクトフォリンのC末端の両親媒性を示す塩基性アミノ酸に富む部位 (ラクトフォリシン) には, グラム陽性・陰性の種々の細菌に対する静菌作用が示された。また, 2010年には, Inagaki らにより, ラクトフォリン18 kDa 断片がヒトロタウイルスの *in vitro* での増殖を抑制することが示された<sup>69)</sup>。

## 6) ラクトペルオキシダーゼ (LPO)

乳清タンパク質の約1%を占める「ラクトペルオキシダーゼ (LPO)」は, 牛乳中の酵素の中では最も含有量が高い。LPOは微生物が産生する過酸化水素を分解し, 酸素を発生させる。この時にチオンアン酸イオン ( $\text{SCN}^-$ ) が存在すると酸化されて  $\text{OSCN}^-$  となり, グラム陰性菌の細胞膜を破壊したり SH 酵素を失活させて死滅させる。グラム陽性菌には静菌効果を示し, これらの抗菌作用全体を「LPO システム」と呼ぶ。

国際酪農連盟 (IDF) では, 経済的な理由により生乳の冷蔵設備を持っていない場合に限り, このシステムによる抗菌使用を許可している。また, LPOはヨーグルトの保蔵中の過剰な酸性化 (オーバーアンディフィケーション) を防止でき, キムチや野沢菜漬けにも応用されている。

LPOには, 抗菌性の他に抗炎症作用, 抗ウイルス活性, 抗がん細胞活性, 免疫調節作用も報告されている。2007年には, Shin らにより LPO の経口投与は, マウスのデキストラン硫酸誘導大腸炎を抑制することが報告された<sup>70)</sup>。この作用は, 炎症を抑制するサイトカインである IL-10の遺伝子発現を亢進したことによる。同年には, Wakabayashi らにより LPO の経口投与がマウス小腸に及ぼす影響は, グルチコルチコイド類似の遺伝子発現抑制により抗炎症作用を発揮することが示された<sup>71)</sup>。2011年には, 石川らによるウシ LPO の *in vitro* での細胞障害防止効果についての報告がある<sup>72)</sup>。

また, ラクトフェリンと LPO を配合した錠菓が, リパーゼ活性を抑え口中での硫化水素やメチルメルカプタンの発生を減少させる, 短期的な口臭抑制効果のあることが報告された<sup>73)</sup>。

## 2.3. 乳ペプチド

乳タンパク質のカゼインや乳清タンパク質は, 乳仔の小腸での消化過程で酵素的分解により生じるアミノ酸の単なる給源ではなく, その前駆体であるペプチドに多くの機能性が報告されている。乳タンパク質は, 乳仔用の食品としてアミノ酸配列に合目的性を配して分子設計されている点が, 他のタンパク質と異なり差異の生じる原因と考えられている。牛乳タンパク質由来の生体調節機能を示すペプチドは多数報告されている<sup>74,75)</sup>。

### 1) カゼイン由来のペプチド

カゼインは, 摂取後に胃ペプシンや小腸トリプシンにより消化されるが, ホスホセリン (リン酸化されたセリン残基) が集中するペプチド部分は, 消化抵抗性を示し長く小腸に留まり, カルシウムの吸収促進作用を示す。この様なペプチドは, 「カゼインホスホペプチド (CPP)」と呼ばれ,  $\beta$ -カゼイン 4P (f1-25) と  $\alpha_{s1}$ -カゼイン 5P (f59-79) が相当する。この作用機序は, CPP が乳中のリン酸カルシウムの腸内沈殿を阻止し, 可溶性カルシウムの濃度を高めることでカルシウム吸収を促進することによ

る。

2000年および2001年には、OtaniらによりCPP中の $\alpha_{s1}$ -カゼイン5Pにはマウス脾臓細胞やウサギパイエル板細胞の増殖やIgAの産生を促進する作用が見いだされた。その後、この活性は $\beta$ -カゼイン4Pや市販のCPPにも同様の免疫調節作用のあることが確認された<sup>76-78</sup>。

2000年には、Matinらにより、 $\kappa$ -カゼイン由来の「 $\kappa$ -カゼシジン (f17-21)」が黄色ブドウ球菌やセレウス菌、大腸菌、サルモネラ菌に対して抗菌活性を示すことが確認された。さらに、2002年に同ペプチドは、マウス脾臓細胞、ヒト白血病患者由来株化TおよびB細胞にアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘導した<sup>79</sup>。

2003年には、OtaniとSuzukiにより、 $\alpha_{s1}$ -カゼイン由来の「 $\alpha$ -カゼシジン (f1-3, f101-103, f104-105)」に抗菌活性は無かったが、マウスTおよびB細胞、ヒト白血病患者由来の株化TおよびB細胞にネクローシス（壊死）を誘導することが報告された<sup>80</sup>。

また、牛乳 $\kappa$ -カゼイン由来の「カゼイノグリコペプチド (CGP)」は、マウス脾臓細胞や腸管パイエル板細胞の培養系で、B細胞やT細胞の増殖やIgGの産生を抑制した。2000年には、MatinとOtaniは、人乳CGPが低濃度でB細胞やT細胞の増殖を抑制し、高濃度ではマウス脾臓細胞や白血病患者由来の株化リンパ球にアポトーシスを誘導することを報告した<sup>81</sup>。

## 2) 乳清タンパク質由来のペプチド

乳清タンパク質は、様々な生理機能を持つことが知られている<sup>82</sup>。脂質代謝研究では、ヒトを対象とした複数の試験結果のメタ解析で、乳清タンパク質は血中の中性脂肪を低下させる効果を持つことが示された<sup>83</sup>。とくに、乳清タンパク質の分解ペプチド（ラクtoastatin）が、高脂肪食を摂取させたマウスのコレステロール代謝を改善し、肝臓の蓄積脂肪量を減少させることが報告された<sup>84-86</sup>。

Kumeら、およびNiiらは、マウスやラットを用い乳清タンパク質由来ペプチドの摂取が抗炎症作用を示すことを明らかにした<sup>87,88</sup>。さらに、乳清タンパク質を含有した流動食を開発し、慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD)患者の慢性炎症抑制効果を示した<sup>89</sup>。

また、Sasakiは、乳清タンパク質摂取がタンパク質代謝と脂質代謝に対しても影響を与え、mTOR, PPAR $\gamma$ , SREBP1cを介して、骨格筋のタンパク質合成促進、内臓脂肪組織の中性脂肪分解促進、脂肪酸合成抑制の効果を持つことを示した<sup>90,91</sup>。

2019年には、Kitaらにより多様な乳タンパク質の酵素分解物よりスコボラミン誘導健忘症の改善ペプチドとして、トリプトファン-チロシン (Trp-Tyr) を基本配列としたペプチド類が報告された<sup>92</sup>。その中でも、 $\beta$ -ラクトグロブリンに由来するテトラペプチドである「 $\beta$ -ラクトリン」(Gly-Thr-Trp-Tyr) は、高い比活性を示した<sup>93</sup>。 $\beta$ -ラクトリンは、海馬におけるドーパミン放出およびドーパミンD1受容体シグナル伝達を活性化させ、空間記憶を増強して機能を改善することを示唆した<sup>94,95</sup>。

## 3) チーズ中のペプチド

熟成型のチーズは、保藏中にカゼインの酵素的な加水分解が進み、多くのペプチドが生成する。2010年には、チーズ由来のペプチドが腸管上皮細胞のタイトジャンクション機能を強化することで、腸管バリア保護に寄与していると報告された<sup>96</sup>。

荻田らは、各種ナチュラルチーズの70%エタノール抽出物をマウス腹腔マクロファージ由来細胞株に添加し、24時間培養した。ウオッシュタイプチーズにおいてIL-22mRNAの増加を認め、メタボローム解析の結果、主要成分として「カダベリン (Cadaverin)」を同定している。この成分は、チーズ製造に使用した乳酸菌やカビが作り出したアミン類と考えられ、腸管バリア保護効果が報告されている。また、IL-22は「抗菌ペプチドReg3 $\gamma$ 」の産生誘導に関与するサイトカインであり、両者



(Cadaverin と Reg3γ) の誘導が腸管免疫の増強に寄与する可能性を示した<sup>97)</sup>。

チーズ中の乳ペプチドには、腸管上皮細胞からの抗菌ペプチド分泌を促進させる成分の存在が示唆される。腸管上皮細胞から分泌される抗菌ペプチドの Reg3γ や α-ディフェンシンは、腸内細菌叢を制御することで腸管免疫機能の増強に働くことが知られている<sup>98)</sup>。腸管免疫の強化は、疾病や加齢による感染症の予防において重要であり、将来的に腸管バリアの破綻を防ぐ食品や医薬品の開発に繋がる可能性がある<sup>99,100)</sup>。

また、酸乳製造に用いられている乳酸菌 (*Lactobacillus helveticus*) によりカゼインから産生する血圧降下ペプチド (ラクトリペプチド: IPP, VPP) は、ブルーチーズを含む様々なヨーロッパ産チーズから検出されており、熟成型チーズでの降圧効果が期待できる<sup>101)</sup>。

## 2.4. アミノ酸

高齢者において筋肉が減少する「(加齢性) 筋肉減少症 (サルコペニア)」は、身体機能の低下、転倒や骨折のリスクを増加させ、寝たきりや要介護状態につながる原因として、その機構解明や予防法の確立が急がれている。サルコペニアの最適な治療方法は、運動と密接に関係するタンパク質の栄養摂取 (種類・量・摂取タイミング) をすることである。筋タンパク質合成は、筋肉に抵抗をかけるレジスタンス運動終了 1-3 時間後に最も高まるため、消化吸収の早い牛乳由来の乳清タンパク質などの早急な摂取が、骨格筋増に効率よく寄与できると考えられている。

骨格筋は、運動機能の他に「マイオカイン」と呼ばれる各種のサイトカイン (IL-6, IL-8, IL-15, 脳由来神経栄養因子: BDNF) を産生する。運動不足や加齢、あるいは糖尿病や肥満により慢性炎症が起こると、TNF-α などの炎症性サイトカインの産生がサルコペニアを増悪させると考えられている。マイオカインの一つである IL-6 は、運動直後の骨格筋から産生され、内臓脂肪や肝臓での脂肪分解、

血管での炎症抑制や血管新生に作用し、脂肪酸 β 酸化の亢進や糖の取り込み増加にも作用することが知られている。従って、IL-6 を産生する時期に乳清タンパク質の栄養摂取が望まれる<sup>102,103)</sup>。

乳タンパク質のカゼインおよび乳清タンパク質も、筋肉合成を高める「分岐鎖アミノ酸 (BCAA)」としてのバリン、ロイシン、イソロイシン含量が他の食品タンパク質と比較しても高い。とくに、乳清タンパク質には「ロイシン」が多く含まれており、高齢者の筋肉増加を目的とした理想的な栄養療法に用いられる (図 2)。ロイシンは、mTORC1 シグナル経路を活性化させる。すなわち、「ラバマイシン標的タンパク質キナーゼ (mTOR)」というシグナル伝達タンパク質をリン酸化し、タンパク質合成を促進し筋量を増加させることが知られている<sup>104-106)</sup>。

サルコペニア解消の横断研究としては、乳製品摂取の多い方が骨格筋量が多かったと報告されている<sup>107,108)</sup>。介入研究として、通常食にチーズを添加した摂取試験において、介入群で骨格筋量が増加することも示された<sup>109,110)</sup>。

Mori らは、健常高齢者を対象とした介入研究において、レジスタンス運動中に総タンパク質量を 1.2 g/kg 標準体重/日以上摂取した場合、筋肉量や筋力が有意に増加し、サルコペニアを防止する作用を確認した<sup>111)</sup>。

さらに、Mori らは健常高齢者を対象に総タンパク質摂取量を 1.2 g/kg 標準体重/日以上摂取した条件下でマシンまたは自体重・セラバンドを用いたレジスタンス運動終了直後に乳清タンパク質 (タンパク質量 0.4 g/kg 標準体重) を摂取した群は、運動

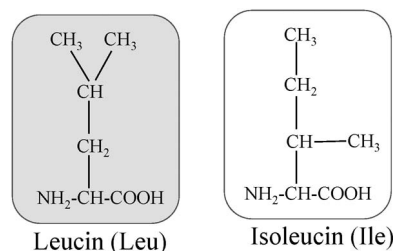


Fig. 2 筋肉を作る分岐構造を持つ必須アミノ酸ロイシンとイソロイシン

単独介入群より筋肉や筋力が増加しており、運動後に摂取する乳清タンパク質の併用効果を明らかにした<sup>112)</sup>。

### 3. 脂質

乳脂肪の主成分は、グリセロールに3分子の脂肪酸がエステル結合した「トリアシルグリセロール（トリグリセリド，TAG）」である。TAGは乳脂肪の98%以上を占めており、その種類と構成する脂肪酸組成は、乳脂肪の物性や栄養に重要な役割を果たしている。乳脂肪には複合脂質であるリン脂質（ホスファチジルコリン，ホスファチジルエタノールアミン）も約2%含まれており、脂肪球皮膜に約60%以上が局在している。

#### 3.1. 乳脂肪

バター中の乳脂肪には、天然型の「トランス脂肪酸：TFA」として、バクセン酸（C18:1, 11-trans）と共役リノール酸：CLA（C18:2, 9-cis, 11-trans）が存在する。前者は、反芻動物のルーメン微生物叢による多価不飽和脂肪酸の生体内水素添加反応で生じる（図3B）。後者は、ルーメン内で飼料中のリノール酸が *Butyrivibrio fibrisolvens* のリノール酸イソメラーゼの作用で水素添加されて生成する。工業的にパーム油などの水素添加で作られる脂肪には、トランス脂肪酸としてエライジン酸（C18:1, 9-

trans）が多量に含まれるので問題視されることが多い。エライジン酸は、部分水素添加油脂（部分水添油）や工業型 TFA とも呼ばれる（図3A）。食品中のとくに乳脂質における TFA については、山内の総説が参考になる<sup>113)</sup>。また、牛乳・乳製品における CLA に関する研究動向は、山内らの総説が参考になる<sup>114)</sup>。

近年、食事からの TFA の多量摂取により、血中 LDL 濃度を増加させ、動脈硬化により虚血性心疾患のリスクを高めることが指摘されている。2003年、WHO/FAO 合同専門家会議は、食品からとる総脂質、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸の摂取目標値を公表し、TFA 摂取量は最大でも一日の総摂取エネルギーの1%未満とすることを目標とした<sup>115)</sup>。2004年、コーデックス委員会は TFA を「トランス型の非共役二重結合を有するモノおよび多価不飽和脂肪酸の全ての幾何学的異性体」と定義した。

2006年1月には、FDA（米国食品医薬品庁）より商品の全脂肪の表記に加えて、TFA の含量表示が義務付けられた。2015年6月、FDAが部分水素添加油脂の食品への使用規制を公表した（3年後の2018年から規制開始）。また、部分水素添加油脂は一般的に安全と認められるGRAS（Generally Recognized As Safe）には該当しないとしたが、含まれるトランス脂肪酸がすべて天然由来のもの（天然型トランス脂肪酸）のみである油脂（乳脂肪、牛脂）は

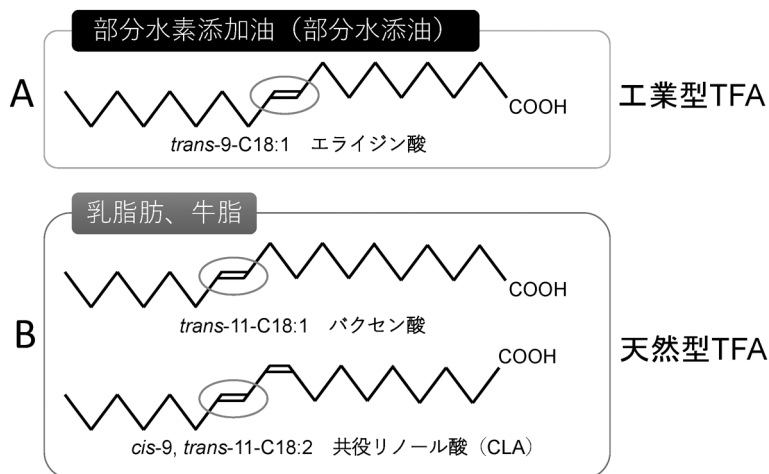


Fig. 3 食品油脂に含まれる代表的なトランス脂肪酸（TFA）

規制対象外とした。

WHO の提言を受けて、すでに米国のニューヨーク州やカリフォルニア州、カナダ、台湾、タイ等では、トランス脂肪酸を含む部分水素添加油脂の食品への使用を禁止している。また、EU 加盟国は、消費者向けに販売される食品中の TFA（天然由来のものを除く）について、シンガポールは、包装容器入り食用油脂について TFA の摂取上限値を設定したうえ表示を義務付け、韓国、中国、香港では食品中の TFA 濃度の表示が義務付けられている。日本では総脂肪量の摂取量が欧米諸国と比べて低く、現時点では TFA の表示義務も摂取制限もない [厚生労働省、日本人の食事摂取基準（2020）]。

乳脂肪は多様な脂肪酸を構成脂肪酸として含み、中でも短鎖・中鎖脂肪酸を含有する特徴を有している。中鎖脂肪酸は炭素鎖 8~10 から成り、エネルギー効率が高く、すぐにエネルギー源として利用される特徴がある。すなわち、乳脂肪は蓄積型の脂肪ではなく、燃焼型の脂肪であると考えられる。摂食量が減少した低栄養やサルコペニアの高齢者には、乳脂肪は極めて有用な栄養素の一つであろう<sup>116)</sup>。乳脂肪中の中鎖脂肪酸の経口摂取で、摂食促進ホルモンであるグレリンの分泌を促すことが判明しており、食欲亢進の点からも乳脂肪は注目されている<sup>117-119)</sup>。1日1杯の牛乳摂取は、タンパク質摂取のみならず乳脂肪の中鎖脂肪酸摂取を介して食欲を増進させ、高齢者のサルコペニア対策に有効性を発揮している<sup>120)</sup>。

### 3.2. スフィンゴ脂質

哺乳動物において最も主要なスフィンゴ脂質は、リンを結合するスフィンゴミエリンである。乳中のスフィンゴ脂質は、乳脂肪球皮膜の構成成分として存在する。1986年の Zeisel らの研究によると、牛乳中のスフィンゴ脂質含量は  $123 \mu\text{mol/L}$  であった。2005年には、Rombaut らにより人乳にはシアル酸が付加されたスフィンゴ糖脂質であるガングリオンドが約  $10 \text{ mg/L}$  と多く含まれていることが報告された。牛乳中のガングリオンドは、シアル酸 (N-

アセチルノイラミン酸 : Neu5Ac) が 2 分子の GD3 (Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer) が主要成分であり、次にシアル酸が 1 分子の GM3 (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer) が多く、両者で全ガングリオンドの 80% 以上を占める。

人乳中のガングリオンドは泌乳初期では GD3 が優勢で、後期では GM3 が主要成分となり、泌乳期における組成変化が認められた。近年は、スフィンゴ脂質に、血中コレステロールの低下作用、脳機能への作用、細菌増殖抑制作用、大腸がんの抑制作用、腸管免疫系の発達への寄与など、が報告されている<sup>121)</sup>。また、牛乳由来のスフィンゴミエリンの示す表皮機能改善効果についても研究されている<sup>122)</sup>。

1993年には、Hungund らにより妊娠中のラットに投与された放射性標識ガングリオンド GM1 (Neu5Ac $\alpha$ 2-3 [Gal $\beta$ 1-4GalNAc $\beta$ 1-4] Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer) が胎盤を通して胎児の組織に移行し、母親の脳にも相当量の標識 GM1 が検出されたことより、GM1 は血液脳関門 (BBB) を通過して脳内に到達することが示された。2003年には、Wang らは母乳保育で育てられた子供の脳の方が、育児用調製乳保育と比較して、統計的に優位の多くのガングリオンドを含むことを報告した<sup>123)</sup>。牛乳から製造した育児用調製粉乳はガングリオンド量が少なく、脳機能を高める効果を期待してガングリオンドを粉乳に添加する可能性もある。

### 3.3. 脂肪酸

2015年、Ano らは、ヒトのアルツハイマー認知症 (AD) に有効な 2 成分を白カビチーズより発見した。マウスの動物実験では、これらの認知症予防成分 (オレイン酸アミドとデヒドロエルゴステロール) が脳内の唯一の免疫細胞であるミクログリアを活性化し、アミロイド  $\beta$  を貪食能で減少させ、脳内炎症を抑制させる作用機序が推定されている。オレイン酸アミドは、牛乳脂肪を白カビ (*Penicillium candidum*, *P. camemberti*) が分解し、生じたオレイン酸に同じくカビが生成したアンモニアが結合して

生成した成分である。牛乳脂肪は限られた主要15種類の構成脂肪酸からなり、オレイン酸はパルミチン酸に次ぐ2番目に多い脂肪酸である。乳脂肪を構成する主要な脂肪酸が修飾され、新たな機能性を発揮することが実験的に証明された例は少なく注目された<sup>124,125)</sup>。

### 3.4. 脂肪酸分析

牛乳脂肪のトリアシルグリセロール (TAG) は、グリセロールに3つの脂肪酸がエステル結合しており、その特徴を明らかにするために脂肪酸分析が用いられる。分析は主にガスクロマトグラフ-水素炎イオン化型検出器 (GC-FID) が汎用され、脂肪から脂肪酸メチルエステルを調製し、極性カラムを用いてガスを移動相として分離・検出する。

しかし、TAGの性質は、脂肪酸の種類と組合せおよびグリセロールでの結合位置が重要であり、脂肪酸組成の情報のみでは乳脂肪を特徴づけることはできない。牛乳脂肪のTAGに対して、構成脂肪酸の組合せと結合位置を同時に明らかにする分析法は、いまだ開発されていない。この目的の達成には、全てのTAG異性体を分離定量する技術開発が必要である。

TAGの分子種や位置異性体の分離と各種検出法は数多く報告されているが、TAGの鏡像異性体 (Enantiomer) のHPLCでの直接分離の研究は極めて少ない。2001年に、Iwasakiらは多糖誘導体型キラルカラムを用いて順相モードで、化学合成した鏡像異性体を初めて分離したが、天然動植物油脂の分析にはそのまま応用できなかった。2011年に、Nagaiらは鏡像異性体分離用のキラルカラムを逆相モードでリサイクルHPLCと併用することで、乳脂肪中のパルミチン酸 (P) とオレイン酸 (O) からなる鏡像異性体 (*sn*-PPO と *sn*-OPP) の相互分離に初めて成功した<sup>126,127)</sup>。

一般にグリセロールの $\alpha$ 位 (*sn*-1位と*sn*-3位) に結合している脂肪酸は、小腸内で遊離脂肪酸となるために、その一部はカルシウムと塩を作り吸収されにくくなる。しかし、 $\beta$ 位 (*sn*-2位) に結合し

ている脂肪酸は、2-モノアシルグリセロールとして存在し、アルコール基はカルシウムと塩を作らないため、 $\alpha$ 位の脂肪酸よりも体内に吸収されやすい。人乳脂肪では、パルミチン酸のような融点の高い飽和脂肪酸をTAG中では $\beta$ 位に結合しており、消化過程でのカルシウム塩の形成を防ぎ、安定分散を図り効率的に乳児体内に吸収させる仕組みが存在する<sup>128,129)</sup>。

一方、牛乳脂肪の脂肪酸分布では、パルミチン酸 (P) は*sn*-1,2位に多く存在し、*sn*-3位にはあまり存在していない。オレイン酸 (O) は*sn*-1位にやや多いが、特定の結合部位に偏在はしていない。2分子のOと1分子のPが結合したTAG分子の位置異性体比を測定した研究では、 $\beta$ -OPO/ $\beta$ -OOP = 57/43であり、パルミチン酸に特定の偏りはなかった。一方、1分子のOと2分子のPが結合したTAG分子では、 $\beta$ -POP/ $\beta$ -OOP = 12/88であり、*sn*-2位にパルミチン酸を結合している傾向がある。また、酪酸、カプロン酸、カプリル酸の低級脂肪酸は、*sn*-3位に偏在している<sup>130)</sup>。

とくに、2分子のPおよび1分子の酪酸 (C<sub>4</sub>) からなる $\beta$ -PPC<sub>4</sub>は、牛乳脂肪に特徴的な分子であるため、食品中の乳脂肪を測定する際の「乳脂マーカー」として使用可能と考えられる<sup>131)</sup>。

乳脂肪のTAGは、乳腺上皮細胞で「グリセロール-3-リン酸経路」で生合成され、3種類の酵素 (GPAT, AGPAT, DGAT1) により、グリセロール骨格に*sn*-1位から順番に2位、3位と脂肪酸がエステル結合で導入されていく。パルミチン酸や短鎖・中鎖脂肪酸の結合位置は、厳密に制御され生合成されている。DGAT1とDGAT2を同時発現する肝細胞とは異なり、乳腺上皮細胞ではDGAT1酵素のみが発現しており、選択的に短鎖・中鎖脂肪酸をTAGの*sn*-3位に結合させている。舌リパーゼや胃リパーゼは、TGAの*sn*-3位に対する加水分解性が高く、結合する中鎖脂肪酸を効率の良いエネルギー供給手段として利用しているかもしれない。なぜなら、中鎖脂肪酸は遊離脂肪酸のまま小腸上皮細胞を経由して門脈に入り、肝臓内でアシル CoA

に変換されエネルギー源となるからである<sup>132)</sup>。

将来的に全ての TAG 異性体分離が達成されれば、より詳細な TAG の構造や物性が明らかになり、さらに TAG の生合成や代謝に関わる生体内の酵素の選択性なども TAG 分子のレベルでより詳しい研究が可能になるものと期待される。

### 3.5. 牛乳脂質の酸化防止

牛乳のオフフレーバーは、牛乳脂質の酸化が原因である。脂質の酸化には、酵素的酸化、光誘導酸化、自発性酸化があり、反応機構がそれぞれ異なる。牛乳本来の風味を保つには、生乳中の溶存酸素を除去して殺菌し、遮光することにより酸化を抑制することが必要である。乳等省令により、牛乳には酸化を防ぐビタミン E などの抗酸化剤を添加できない。そのため、牛乳の酸化を抑制するには、乳中の溶存酸素を除くことが重要である。

牛乳の長期保存を実現するために、日本では超高温殺菌法（120～150℃、1～3 秒間）が一般的であるが、硫化ジメチル： $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ （ジメチルスルフィド）による加熱臭が発生する。深見らが開発した「低温脱気法」では、牛乳自体を10℃以下の低温に保ったまま、牛乳に当初10 ppm 存在した溶存酸素量を 2 ppm 以下に瞬間的に除去して味の変化を抑えた（おいしさキープ製法：特許第4015134号<sup>133)</sup>。また、店頭の蛍光灯や日光などから牛乳を光酸化より守る、光を通しにくい遮光性の高い紙容器で保存性を高めた（おいしさキープバック：特許第4628669号<sup>134)</sup>。また神谷らは、不活性ガスである窒素ガスと接触させて牛乳中の溶存酸素と置換させることで溶存酸素量を低下させる方法を開発した（ナチュラルテイスト製法：特許第3083798号、第3091752号<sup>135)</sup>。さらに岩槻らは、直接加熱殺菌法より風味が良いとされるスチームインフュージョン法により加熱工程以降で脱酸素を行う方法（Fresh Taste Process: FTP 製法：特許第3490428号）を開発した<sup>136)</sup>。

## 4. 灰分（ミネラル）とビタミン

### 4.1. カルシウム

乳はカルシウムの主たる供給源であり、牛乳・乳製品による1日当たりのカルシウム供給量は50%程度を占める。成長過程におけるカルシウム摂取は骨形成において重要であり、最大骨量（ピークボーンマス）を迎える20～40歳代までの摂取不足が、高齢期における骨粗鬆症発症因子として報告されている。

1998年には、上西らによりカルシウムを多く含む食品の中でも、牛乳は約40%と体内での吸収率が非常に高いことが報告された<sup>137)</sup>。

牛乳・乳製品の摂取が骨粗鬆症の予防に関連する研究報告は、これまでに多数報告されている。2015年のカルシウム摂取と骨密度の関係の研究では、50歳以上を対象に食事からのカルシウムの摂取増加は、ビタミン D の有無に関わらず、腰椎、大腿骨、全身骨、前腕骨骨密度を半年から2年間で0.6～1.8%程度増加させていた<sup>138)</sup>。2016年には、ヨーグルトの摂取の高い者は、低い者に比べて大腿骨の骨密度（BMD）が有意に高く、身体機能の指標である time-up-and-go test の結果が有意に良いことが報告された<sup>139)</sup>。また、カルシウムとビタミン D の併用と骨折リスクのメタ解析では、カルシウムとビタミン D の併用により中年期以降の対象者の骨折リスクを減少させた<sup>140)</sup>。

さらにサルコペニア（筋肉減少症）と栄養の研究では、ロイシンの補給は高齢者の筋肉の萎縮を改善させると結論づけている<sup>141)</sup>。高齢者の高い生活の質を維持し、健康寿命の延伸に貢献するために、日本人女性を対象に骨折・骨粗鬆症予防のための大規模コホート研究が行われている。牛乳・乳製品の摂取による骨粗鬆症や認知症等の非感染性慢性疾患の予防や健康維持への効果について、これまでに検討されている<sup>142)</sup>。牛乳の習慣的摂取は、骨密度低下抑制だけでなく、椎体の海綿骨微細構造と関連する指標(trabecular bone score, TBS)による評価で、骨強度を増強させる可能性が明らかにされている

る<sup>143)</sup>。また、牛乳・乳製品由来のカルシウムには歯周病予防に効果があったが、乳由来でないカルシウムには有効性が見られなかったという報告もある。65歳以上の高齢者において、牛乳・乳製品の摂取が、身体活動や体組成の維持向上や疾病発症の抑制に寄与することが報告されている<sup>144)</sup>。

#### 4.2. リポフラビン (ビタミン B<sub>2</sub>)

牛乳を酸化させる要因は溶存酸素だけでなく、蛍光灯などの光照射による影響がある。水溶性ビタミンのリポフラビン (ビタミン B<sub>2</sub>) は、光により分解し、風味に影響することが確認されている。この分解は520 nm 以下の波長、とくに450 nm の照射光において最も促進される。光酸化を防止する方法としては、遮光性の高い包材の利用が効果的である。紙容器の遮光性を高める研究は進み、印刷方法や紙の材質構成の工夫などがある。水上らは、高い紫外線散乱効果を持つ濃赤色のベンガラ (酸化鉄の別名) による赤色印刷法を開発した。牛乳容器に赤色印刷した場合、リポフラビンの最大吸収波長帯の140-550 nm の光を遮断し、その高い実用性が確認されている<sup>134)</sup>。今後は、酸素吸収機能を有する包材 (アクティブバリア系包材) による牛乳容器などが、開発実用化されるかもしれない。

### 5. その他の乳成分

#### 5.1. エクソソーム (細胞外小胞)

エクソソームは、細胞から放出される直径が50~200 nm 程度の脂質二重膜でできた微小な膜小胞で、血液1 ml 中に約50億~100億個含まれている。生体内では乳や唾液、血液、尿、羊水、乳、悪性腹水などの体液中で観察され、また培養細胞からの分泌も確認されている。エクソソームは、体を構成するあらゆる細胞から放出され、特殊なタンパク質やRNA (リボ核酸) 成分やマイクロペプチド (遺伝子のごく短い読取り枠から生産される小さな機能性ペプチド) 等を内包し、由来する細胞や組織から離れた別の標的細胞や組織へと情報を伝達する役割を持つことが推定されている。乳中のエクソ

ソームについては、詳しく解説された総説や成書がある<sup>145-148)</sup>。

1983年、エクソソームはヒツジ網状赤血球が分泌する粒子として発見された。1980年代には、エクソソームは細胞の老廃物を細胞外に運び出す「ゴミ袋」と考えられていたが、2000年代に入り、細胞同士の情報伝達に不可欠の物質を含んで、体内を行き交う様子が明らかになった。2007年には、Valadi らにより、エクソソーム内にはタンパク質だけでなく miRNA (マイクロ RNA)、mRNA (伝令 RNA) も存在し、内包された mRNA は細胞内でタンパク質に翻訳されることが示された<sup>149)</sup>。さらに2010年には、エクソソーム内の miRNA が受容細胞で機能することが証明され、細胞間の情報伝達を担うメッセンジャーとして注目され始めた<sup>150-152)</sup>。2018年までに、ヒトでは約2,500種類の miRNA が見つかっており、全遺伝子の約5-6割が影響を受けると推定される<sup>153)</sup>。

乳の研究分野では、2002年に Oshima らにより、マウス乳腺上皮細胞の培養液中にエクソソームが見いだされたのが初めてであり<sup>154)</sup>、その後マウス乳中にも存在が確認された<sup>155)</sup>。この研究では、表面に MFG-E8 (乳脂肪球皮膜の糖タンパク質の一つ) を発現したエクソソームの存在より、乳腺退縮期のアポトーシスに至った乳腺細胞が、速やかに貪食されるための機構であると考察している。

その後、Izumi らはヒト、ウシ、ラットなどの広範な動物の乳中にもエクソソームが存在し、miRNA、mRNA、タンパク質などを内包すること、また標的細胞へ取り込まれることにより、それらが機能することを示した。また、牛乳エクソソームは、ヒトマクロファージに取り込まれることも明らかにされた。この研究では、牛乳中の RNA の存在場所について、miRNA はエクソソーム中とそれ以外にも存在し、mRNA はエクソソーム中のみ含まれることを明らかにした<sup>156)</sup>。

乳からのエクソソーム調製では、カゼイン除去により乳清を調製し、さらに密度勾配、沈殿試薬、抗体、カラムなど様々な選択肢があるが、超遠心分離

による方法が一般的である。その他にも、最近では、エクソソームの表面にホスファチジルセリン(PS)が発現している点を利用して、PS結合性のタンパク質を用いたアフィニティークロマトグラフィー法が開発され、高純度のエクソソームを大量調製することが可能となった。超遠心分離で単離されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真を図4に示した。

また、ヒト母乳中のエクソソームは、表層にCD63やCD81の細胞表面抗原を発現し、多くの免疫に関係するmiRNAを内包していた。これらのmiRNAが母親から乳児に移動して、免疫系を制御する役割が示唆された<sup>157-159</sup>。

また、ブタ初乳中のエクソソームは、乳仔の腸管上皮細胞に対して直接増殖促進の機能が確認され、マウスへの経口投与により十二指腸、空腸の絨毛長や陰窩の深さを有意に増加させ、腸管バリア機能向上の役割も示唆されている<sup>160</sup>。

また、食品由来の細胞外小胞もしくはRNAが体内に取り込まれ、機能し得るという報告がある。最も初めの報告は、2012年にGuらにより、ブタ乳中のmiRNAがブタ新生仔の血中から検出されたこと

である<sup>161</sup>。また、牛乳中のRNAがヒトの血中に移行して検出された報告もある<sup>162</sup>。

牛乳や母乳中のエクソソームには、免疫機能を調節するmiRNAが豊富に含まれており<sup>163</sup>、それ自体が培養細胞レベルで吸収されることが示されていることから、エクソソームやmiRNAが母乳を介して乳仔の免疫機能を調節していることが推定されている<sup>164</sup>。生体に対して、乳由来のエクソソームは、基本的には抗炎症作用的に働くことが多いようであるが、少数であるが炎症を促進するという報告もある。

エクソソームを介する個体間の情報伝達は、食品成分の示す「全く新しい機能性発現の概念」であり、エクソソームを利用した乳児の健康維持や成人の健康機能強化などが期待される<sup>165,166</sup>。

## 5.2. 乳酸菌・ビフィズス菌など

### 1) ビフィズス菌の生菌数測定法

乳製品に広く使用されている乳酸菌やビフィズス菌は、プロバイオティクスと考えられている。2001年、FAO/WHOの合同会議によりプロバイオティクスの概念が初めて提唱された。2014年には、

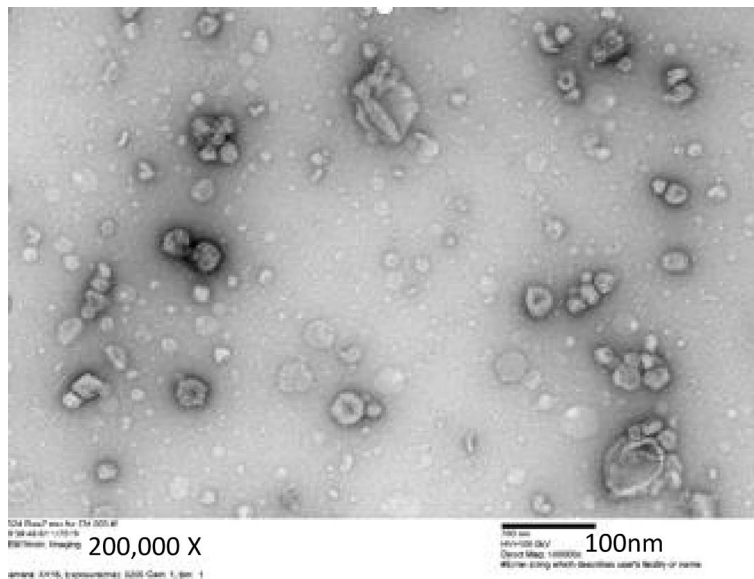


Fig. 4 牛乳エクソソームの透過型電子顕微鏡写真  
倍率は20万倍、図中の黒線は100 nmを示す  
写真は森永乳業株式会社より提供

Hill らにより「適量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」と定義された<sup>167)</sup>。ヨーグルトや乳酸菌飲料に生理作用を期待するには、一定量の生きたプロバイオティクスの菌数を摂取することが望ましいとされ、製品中の菌数測定法の研究が進んだ。近年では、とくに培養の難しいビフィズス菌数を安定的に測定できる菌数測定法が求められている。

ビフィズス菌は乳等省令では、乳酸菌として扱われることはなく、菌数測定法は規定されていない。2000年には、全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会のもとビフィズス菌検査法検討委員会が結成され、ガイドラインが発行された。2014年には、国際標準化機構 (ISO)/国際酪農連盟 (IDF) 法に沿う形で、発酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌の菌数測定法が改訂された。このガイドラインでは、培地としては TOS-Mup 寒天培地、希釈液として 1/4 強度リンゲル液等の使用が認められた<sup>168)</sup>。

近年、培養法に代わる新規の生菌数測定法が開発されている。2018年には、Hansen らにより生菌と死菌を区別する試薬：PMA (propidium monoazide) を使用した viability PCR 法が提案された。PMA は細胞膜不透過性で二本鎖 DNA を修飾する色素であり、死菌や損傷菌の DNA を選択的に修飾することで、死菌を生菌と区別することができる。また測定ウェルの 1 つ 1 つにおいて生菌の DNA 量を正確に測定することができ、従来の PCR 法よりも高精度に生菌数測定が可能となった<sup>169)</sup>。さらに、蛍光検出をベースにしたフローサイトメトリーを使用した菌数測定法も技術開発が進んでいる。2015年には、ISO/IDF として国際標準法が発行されている。2018年には、Chiron らにより、加熱による殺菌処理をした菌体に菌体表層タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより、菌株特異的な菌数測定も可能であること示した<sup>170)</sup>。将来的には、培養法に代わってこれらの PCR やフローサイトメトリーにより菌数測定が標準法として定着する可能性もある。

## 2) 腸内細菌叢と宿主免疫系

ヒトの腸内には多種多様な腸内細菌が腸内細菌叢を形成して共生している。その微生物間のバランスの破綻 (腸内細菌叢の乱れ) は炎症性腸疾患やアレルギー疾患など様々な疾病の引き金となるため、宿主の健康の維持には腸内環境の維持や改善は重要である<sup>171)</sup>。中でも、腸内細菌叢が宿主に及ぼす影響の多くが免疫系に関与することから、乳酸菌やビフィズス菌などの有用菌であるプロバイオティクスの免疫調節作用が期待されている。

腸内細菌叢は、腸管粘膜上皮から分泌される免疫グロブリン A (IgA) により制御されている<sup>172)</sup>。牛乳や乳製品にはレチノールが豊富に含まれており、レチノールの代謝物であるレチノイン酸は、粘膜において外来抗原の防御に必須である IgA 産生細胞に重要な役割を果たしている<sup>173)</sup>。マウス腸管パイエル板細胞を用いたスクリーニングでは、乳酸菌 (*Lactobacillus sakei* NBRC15893株) が作り出す膜小胞 (membrane vesicle: MV) が IgA 産生を増強することが報告された<sup>174)</sup>。

MV は細菌が細胞膜の一部を直径 20–500 nm の膜小胞として放出したものであり、内部にはタンパク質や核酸、シグナル物資などを含んでいる。MV は細菌間の相互作用だけでなく、細菌-宿主間の相互作用にも関与するかもしれない。最近では、厚い細胞壁をもつグラム陽性菌も MV を放出することが分かって来ている。ヨーグルト中に発酵乳酸菌が生産した IgA 産生増強作用を持つ未知の MV が多数存在する可能性もあり、新しい概念の発酵乳製品の開発に繋がる可能性がある<sup>175–178)</sup>。

また、食物アレルギーは、発症機構としてまず腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) が起こり、これを起点として宿主免疫機能の恒常性維持の破綻に繋がること知られている。dysbiosis では、腸内細菌叢の構成が変化し、マクロファージや Th17 細胞などが誘導されて、制御性 T 細胞 (Treg) の誘導異常も起こり、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-23 など) が誘導される<sup>179)</sup>。

現在までに、抗アレルギー効果を持つ乳酸菌など



の有用菌を摂取し、腸内細菌叢を改善、アレルギー性疾患を緩和することを目的とする様々な発酵乳製品が製品化されている。発酵食品に含まれる乳酸菌には、摂取後に宿主小腸パイエル板より吸収され、樹状細胞に取り込まれ、Th-1（ヘルパー T 細胞 1 型、細胞性免疫）状態を誘導することで、Th-2（ヘルパー T 細胞 2 型、体液性免疫）優位によって発症したアレルギー疾患に対して Th-1/Th-2 バランスを平衡化し、アレルギー抑制効果を発揮するものが報告されている。

近年、発酵食品の免疫系に対する効果がさらに注目されている。腸内の共生細菌叢は宿主の免疫系の成熟に必須であり<sup>180,181</sup>、Treg を誘導することでその恒常性維持にも重要である<sup>182-184</sup>。発酵食品に含まれる細菌は腸内細菌叢に影響し、抗アレルギー効果、抗炎症作用を発揮する<sup>185,186</sup>。例えば、乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilis* KK221株) は、樹状細胞に直接作用して、IFN- $\beta$  を生産、Th1/Th2 バランスを回復し、抗アレルギー効果、抗炎症作用を示した<sup>187</sup>。また、発酵食品に含まれる酢酸、酪酸などの短鎖脂肪酸は免疫系に働き、免疫系の恒常性に重要な役割を果たす<sup>188,189</sup>。

しかし、発酵食品の種類およびそこに含まれる菌の種類、さらにその代謝物は膨大であり、有用菌の探索が精力的に行われているが、詳細な作用機序が明らかになっているものは少ない。ビフィズス菌 (*Bif. lactis* LKM512株) は、耐酸性で生きて腸管に到達し、腸内で増殖するプロバイオティクスの一つであり、本菌を用いた発酵乳は、特定保健用食品として認可されている。本菌は腸内で大腸菌やフェカリス菌と連携してブレッツィンというポリアミンを生成することで、アトピー性皮膚炎の軽減効果<sup>190</sup>や寿命伸長効果<sup>191</sup>を示すことが報告されている。

### 3) エリスロポエチン (EPO)

エリスロポエチン (EPO) は、牛乳中に含まれる造血促進作用を示すホルモンであり、臨床面では腎性貧血の治療薬として長年使用されている。

EPO は母乳にも含まれ、乳幼児の成長に影響を及ぼしている。乳幼児の成長とサルコペニア治療の方向性は共通性があり、牛乳中の EPO がサルコペニア治療に有用な可能性は高い。EPO の生理作用の標的である骨髄系細胞では、EPO の結合により EPO 受容体の二量化が起こり、その下流に JAK2/STAT 系や GATAbox のシグナル伝達経路の活性化が示唆されている。

### 4) ナイアシン

体内時計は、睡眠や代謝といった多様な生理機能に観察される日周変動を作り出す生体の恒常性維持機構である。この機構は、生物の全身の各細胞に内在する日周性を有する転写機構（細胞時計）により制御される。正常な体内時計の維持には、細胞時計の日周性が適切に制御されること、および細胞時計が外環境の光情報を利用して全身の組織内で互いに同じ時刻に同調（光同調）することが必須である。夜勤などのシフトワークの増加や夜食の常習化といった現代の社会的要因は、細胞時計の日周性形成や組織内同調を乱し体内時計を破綻させ、睡眠障害や代謝異常などの様々な疾患を引き起こす。

ナイアシンはチーズや育児用調製粉乳などに含まれる水溶性ビタミンの一つであり、生体内では主にピリジヌクレオチドである NAD<sup>+</sup> の形で存在する。NAD<sup>+</sup> は、500種以上の酵素の補酵素として働き、脂質と糖質の代謝、エネルギー産生、および神経系の調節などの様々な生体機能を制御する。ナイアシンに体内時計調節因子としての機能があることが報告されている。その機構については、細胞時計がナイアシンの生合成を担う酵素 NAMPT1 の発現制御を介してナイアシンの細胞内濃度を日周的に調節すること、およびこの調節により SIRT1 の酵素活性に日周変動が形成されることが報告されている<sup>192,193</sup>。

### 5) パントテン酸

疫学調査より、乳児アトピー性皮膚炎発症と母親母乳中の CoA 量との間には正の相関がみられるこ

とより、その構成成分である乳中のパントテン酸の過剰摂取がアレルギーの病態形成に関わる可能性が指摘されている。

#### 6) アペリン

1998年、アペリンは非常に塩基性の強い新規生理活性ペプチドとして発見された。生体ラットでは妊娠期の乳腺で最もアペリン産生量が高く、1999年には牛乳中にも存在することが報告された<sup>194)</sup>。牛乳中にはアミノ酸の鎖長が異なるアペリン・アイソフォーム（13-37のアミノ酸残基）が報告され、鎖長により特異的受容体との結合親和性の異なることが報告された。

アペリンを牛乳から摂取すると効率良く体内に吸収され、その後標的臓器に運搬され、生理機能を十分に発揮することが予想されている。アペリンは、その受容体が血管やリンパ管の内皮細胞に発現することが認められており、血管新生作用が推定されている。2010年には、ヒト乳汁にもアペリンの分泌が確認された<sup>195)</sup>。アペリンおよびその特異的受容体を欠損させたマウスでは、顕著な皮下脂肪の蓄積が観察されたことから、アペリンには体脂肪蓄積抑制効果が示された<sup>196)</sup>。この研究結果より、アペリンは血管・リンパ管の内皮細胞の機能を安定化させ、脂肪の漏洩を防ぐことで、皮下脂肪の蓄積が抑制されることが推定される。アペリンの生理作用に関する国内外の研究では、循環器や代謝系の疾患に対する創薬の可能性が期待されている。

#### 7) オステオポンチン (OPN)

オステオポンチン (OPN) は乳に含まれるリン酸化糖タンパク質である。1986年に、骨におけるリン酸化タンパク質として報告され、翌年には人乳でも同定された。OPNは、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列などのインテグリンやCD44などへのレセプターを介したシグナル伝達に関与する。OPNは骨の石灰化やリモデリング、細胞の接着や転移、免疫機能の調節などの機能を有する。最近では、乳児の消化管での作用として、腸管上皮細胞の組成に影響

し、脳の発達や記憶学習能力への関与などが考えられている。OPNについては、上野の詳しい総説がある<sup>197)</sup>。

### III. 酪農科学分野における将来研究

#### 1. 牛乳アレルギーの研究

2016年度（平成28年度）の厚生労働省の報告では、乳幼児の即時型食物アレルギーの有病率は5～10%と頻度が高く、そのうち10%でショック症状を生じる。即時型食物アレルギーの6割を占める鶏卵・牛乳・小麦の3大アレルゲン（タンパク質）は、日常的に様々な用途で食品に用いられ、日常生活の中で予期せぬ症状誘発のリスクを常に抱える。そのため、患者は日常生活に強い食事制限を余儀なくされ、食物アレルギーの予防法や治療法の確立は急務と考えられる。近年は食物の早期摂取がアレルギーを予防する可能性を示す報告が相次いでおり、ピーナッツや卵で予防効果があったことが報告されている。

食物アレルギーに対する有効な治療法ははまだ見出されていない。アレルギー誘発食材（乳など）を計画的に経口摂取することで、食材に対する症状誘発閾値の上昇と耐性獲得を目指し、アレルギー症状を緩和させる「経口免疫療法 (OIT)」の開発研究が進められている。しかし、消化管へのデリバリー効率が低い上、現時点ではアレルギー誘発エピトープを介したアナフィラキシーショックなど重篤な副作用発現の危険性も高く、広く臨床応用される見込みは立っているとは言えない<sup>198)</sup>。

牛乳のOITにより、患者が脱感作状態（連日摂取で無症状で摂取可能）へ到達できた場合でも、耐性獲得へ誘導できる症例は少なく、とくに牛乳は他の食物と比較して治療成績が悪い傾向にある<sup>199)</sup>。ヒト小児では、牛乳アレルギーに対する経口免疫療法が臨床的に施行されている<sup>200,201)</sup>。牛乳アレルギー患者に対する国内外で牛乳を用いたOITが行われてきた。その結果、無作為試験の少数例で概ね有効性が証明されているものの、安全性に問題がありアナフィラキシーを起こす場合もあった<sup>202)</sup>。国

内の報告では、OIT 開始 2 年後には鶏卵では約 60%、小麦では約 80% の症例で除去負荷試験陰性となったが、牛乳に対しては約 30% 程度であり、牛乳に対する治療効果が低いことを示している<sup>203)</sup>。

一方、アレルギーを誘発する食材タンパク質の抗原エピトープに対する研究は広く行われており、同定されたエピトープは「データベース」として公表されている<sup>204)</sup>。

牛乳に関しては、生後 14 日以内の人工乳開始で牛乳アレルギーの頻度が低下したが、生後 105 日～194 日の人工乳開始では牛乳アレルギーの頻度が上昇したと報告されている<sup>205)</sup>。しかし、系統的レビューでは、加水分解乳は母乳や乳児用ミルクと比較して発症率を下げる効果はないと結論付けられた<sup>206)</sup>。電子レンジで加熱した牛乳による OIT では、極めて良好な結果を得た報告例もあるが、クラス 4 以上の重症牛乳アレルギー患者の場合は、しばしば OIT 実施期間中の急速増量期にはアナフィラキシーが頻発し、安全性に問題は残る<sup>207)</sup>。

また、人工乳導入時期が牛乳アレルギーの発症頻度に大きく影響することが示されたが、導入後の摂取頻度については検討されていなかった。Onizawa らは、牛乳アレルギー患者では生後早期（1 か月以内）に継続的な人工乳摂取が行われていなかったことから、人工乳の早期導入と継続的な摂取が、牛乳アレルギーを予防する可能性を示した<sup>208)</sup>。

また、近年は腸内細菌叢の多様性が学童期のアレルギーの発症に影響している、との報告が多く存在する<sup>209)</sup>。人工乳の早期導入は乳児の腸内細菌叢の形成に影響を与える可能性があり、牛乳だけではなく、卵、小麦などの食物アレルギーなどにも影響を与える可能性があると考えられる。人工乳早期摂取とアレルギー疾患発症の関係を明らかにするとともに、腸内細菌がどのように関与するかについても明らかにする必要がある。食物アレルギーにおいて、腸管免疫が寛容（耐性）になるか感作になるかは、腸内細菌叢が関与している可能性が高い<sup>210)</sup>。

人工乳の早期摂取がアレルギー疾患に対して防衛的に働くとするれば、出生後の哺乳方法についても変

更の余地があり、出生後より定期的に人工乳を摂取するような分娩施設での指導につながるかもしれない。

## 2. 糖尿病の研究

1981 年、Jenkins らにより、食後の血液中のグルコース含量（血糖値）の上昇度合いを表す指数として「Glycemic index（GI 値）」が提唱された。糖尿病の予防や治療には、GI 値を指標として指導することが推奨されている。GI 値の高い糖質を単品で摂取するよりも、乳や乳製品と共に摂取することで食後の血糖値上昇が抑制されることが明らかにされている。GI 国際表では、牛乳は 27、スキムミルクは 32、ヨーグルトは 27 と低 GI 食品である。

日本の糖尿病有病患者は 1,000 万人を越え、その予備軍も約 1,000 万人と推計されている（平成 28 年国民健康・栄養調査 厚生労働省）。とくに 60 歳以上では、3 人に 1 人が糖尿病患者もしくは予備軍であり、加齢に伴う糖尿病の発症や重症化の予防と治療、患者 ADL（activity of daily living）および QOL（quality of life）の改善、また増大する医療費の抑制は重要である。

日本の糖尿病患者の約 95% を占める「2 型糖尿病」の発症は、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌の低下と、標的臓器でのインスリン作用の低下（インスリン抵抗性）が主な原因である。欧米人では肥満を原因とするインスリン抵抗性からの糖尿病発症が多いが、日本人ではインスリン分泌自体の悪化が原因での発症が多い。そこで、我が国ではインスリン分泌が低下した膵臓の機能を改善する方法の開発が、社会および臨床現場から強く求められている。

従来、糖尿病治療は食事療法と薬物療法による血糖値コントロールが主流であったが、最近は運動療法の重要性が注目されてきている。食事療法と運動療法を中心とする生活改善プログラムにより薬物投与量が減少できることが報告されている<sup>211)</sup>。糖尿病とその予防に関する食事療法においては、牛乳の摂取が食後の血糖値上昇を抑制することが報告されている<sup>212)</sup>。また、ヨーグルトの摂取がインスリン

感受性を改善して2型糖尿病の発症リスクを下げること<sup>213</sup>)やヨーグルトに含まれる乳酸菌が糖尿病患者の慢性炎症を抑制すること<sup>214</sup>)などの報告もあり、糖尿病の予防と病状改善に対する牛乳と乳製品の有効性が明らかにされつつある。

牛乳および乳製品の食後血糖値の抑制機構については、食品中の乳糖のGI値が低いために、その後摂取した糖質の分解を抑制し、グルコースの血清上昇を穏やかにすることが考えられている。

一方、今村らによる63,682名を対象としたコホート研究では、乳脂肪摂取量を反映する脂肪酸であるpentadecanoic acid(15:0)、heptadecanoic acid(17:0)、およびtrans-palmitoleic acid(t16:1n7)の血中濃度が高値である群では、2型糖尿病の発症が30%程度有意に抑制されることが報告された<sup>215</sup>)。この予防効果は、特定の食品成分の予防効果としては非常に大きい。これらの脂肪酸は、化学構造的にパルミチン酸に類似しているため、膵β細胞に対する脂肪毒性を抑制するという仮説や、肝臓での*de novo*脂肪合成を抑制するといった仮説、乳脂肪が腸内細菌叢の組成に影響するという報告があるものの、その作用機構は不明である<sup>216</sup>)。さらに、これらの脂肪酸が単独で直接的に糖尿病発症を予防しうるかについても不明であり、将来的な研究課題といえる。

また、糖尿病は加齢とともに有病率が高まり、わが国の糖尿病患者の約3分の1は75歳以上の後期高齢者と推定される。また、後期高齢者が要介護に至る原因として「フレイル(虚弱)」が多い。フレイルとは、高齢期に生理的能力の低下することで生活機能障害、要介護、死亡などに陥りやすくなる状態をさす。身体的問題、精神・心理的問題、社会的問題の3要素が関連している。高齢の糖尿病患者はフレイルになりやすく、その原因としてサルコペニアを引き起こしやすい。高齢者の筋肉量の減少は、食後の血糖が取り込まれる場所が少なくなること示す。

### 3. 高血圧の研究

欧米では乳製品の摂取と血圧の関連について比較的多くの報告があり、米国の食事ガイドライン2010策定のために検討されたレビューでは、2004年～2009年までに報告された系統的レビュー1編、ランダム化比較試験1編、コホート研究6編、横断研究5編において、乳製品の摂取量が多いほど血圧値が低いまたは高血圧リスクが低いことが報告された<sup>217</sup>)。

2010年以降は、スペインの高齢者を対象に、習慣的な低脂肪乳製品の摂取と24時間血圧には負の関連があること<sup>218</sup>)やオランダの過体重の中年男女を対象とした1日5～6単位(摂取量:ポーション)の低脂肪乳製品の追加補給の介入試験で血圧を有意に下げた報告<sup>219</sup>)など、血圧値と乳製品、とくに低脂肪乳製品の摂取量と負の関連が報告されている。

我が国では、1998年に40～49歳の男性を対象とした横断研究で、乳製品の摂取頻度と血圧値に負の関連性のあることが示され<sup>220</sup>)、2013年には30～71歳の男性労働者を対象としたコホート研究で毎日の乳製品摂取による10年間の高血圧リスクの有意な低下が報告された<sup>221</sup>)。中年男性を対象とした適正体重に管理する食事介入試験に毎日300gの乳製品を追加で補給した比較試験では、余暇時間に身体活動が多い集団において収縮期血圧の低下を認めた報告がある<sup>222</sup>)。しかし、日本人は欧米と比べて乳製品の摂取量が少ないので、乳製品摂取と血圧の関連性についての詳細な研究は今後の課題である。

乳製品摂取が血圧降下に働く機構としては、乳製品に含まれているカルシウム、カリウム、リンおよび乳タンパク質の消化過程で生じるラクトリペプチドや乳に含まれるラクtoferrinなどの乳塩基性タンパク質(MBP)の働きなどにより複合的に起こるものと考えられている。

すなわち、カルシウムの摂取不足は副甲状腺ホルモンの分泌増加による昇圧に関連するし、カリウムは血管拡張作用においてナトリウムと拮抗的に働く。リンの摂取量と降圧関係はまだ明らかにされていないが、米国の大規模コホート研究MESA

(Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) と ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities study) からリン摂取と血圧には負の関連が示されている<sup>223)</sup>。

乳由来のラクトリペプチド (IPP, VPP) はアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性を阻害することにより降圧に働き、同ペプチドを補給した9編のランダム化比較試験のメタ解析により、高血圧前症および高血圧患者において降圧効果があることが示されている<sup>224)</sup>。

乳製品はこれらの栄養素の複合的な作用により降圧効果を示すと考えられるが、まだ未解明の部分もあるので、将来的にはさらに研究が進むだろう。

#### 4. サイトカインやケモカインによる疾病予防

ヒト母乳中には、新生児の疾病予防に関係する多くの免疫タンパク質が含まれており、その中からは多種類のサイトカインやケモカインが発見されている<sup>225,226)</sup>。しかし、これらのサイトカイン類の機能性を検討した実験研究は非常に少ない。

ヒト母乳中に含まれるサイトカインの一つである IL-7 は、ノックアウトマウスを用いた研究で、新生仔の胸腺発達に関与していることが示された<sup>227)</sup>。また、母乳中の IL-7 の含量が、母親の栄養状態により変化し、その含有量が少ない場合には新生児の胸腺発達が遅れることも報告されている<sup>228)</sup>。

最近、茶山らは、ケモカインの一つである CCL25 が母乳や牛乳中に存在することを見出した。また、CCL25 添加マウス人工乳を用いたマウス新生仔の人工保育試験により、母乳由来 CCL25 にマウス新生仔の成長や免疫器官の機能発達に対する促進作用が確認された<sup>229)</sup>。しかしながら、これらの微量免疫タンパク質の新生児に対する生理学的機能性についてはほとんど未知であり、今後の研究が大いに期待される。

#### 5. 代替乳の研究と市場拡大

2015年に国際連合が提案した17の「持続可能な開発目標」(SDGs) の考え方にに基づき、安全で持続的な乳生産や乳使用が重要視されるであろう。現

在、地球環境を温暖化に導くメタンガスを産生する乳牛や肉牛の存在、そしてトウモロコシなどの濃厚飼料を多給しないと継続できない現代畜産業の否定等により、世界的な牛乳離れが起こっている。その代表的な流れは、「代替乳」の開発と普及にも顕著である。

現在、市乳市場に大きな変化が起きつつある。「第3のミルク」として植物由来ミルク市場が世界的に急成長している。中でも突出しているのが、アーモンドミルクであり、ヨーロッパのみならず、豆乳となじみ深いアジア圏でも成長している。とくに米国では過去5年間で145%もの成長を示している。乳代替飲料市場の約65%は、アーモンドミルクという数値は非常に高い。

これは、世界の潮流として動物性からプラントベース(植物由来)の乳代替製品への意識の高まりがある。これは、環境負荷が少ない飲料という側面と、ビタミンEや食物繊維などを豊富に含む栄養面からも人気が高く、牛乳の代わりに飲む人が増えている。我が国の豆乳の市場規模は、年間400億円と大きいですが、国内のアーモンドミルクにおいては約100億円と大きな市場を獲得しつつあり、さらに代替乳の研究と市場は拡大するものと予想される。

#### 6. エクソソームによる DDS システムの開発と臨床応用

エクソソームにも含まれる miRNA は、約22残基程度の塩基からなる Non-coding small RNA の一種であり、標的とする mRNA の主に 3'-非翻訳領域に結合し、翻訳抑制、mRNA の分解を引き起こすことで発現を抑制する。現在、ヒトでは約2,700種類、ウシでは約1,000種類が見つかっており、ヒトでは全遺伝子の約6割程度が影響を受けると推定されている。

落谷らは、牛乳中に含まれるエクソソームの研究を進めている。牛乳は入手しやすく、かつ量産もし易い。牛乳由来のエクソソームのカプセル内に抗がん作用のある核酸医薬を充填する実験にも成功している。また、マウスの体に入れて、毒性やアレルギー

反応などの安全性も確認された。国内の企業と連携して免疫細胞を活性化させる薬を配達するエクソソームの研究を進めている<sup>230)</sup>。

このエクソソームを応用した、薬物運搬システム(DDS)によるがん治療は将来有望と考えられる。カプセルの中のがん遺伝子を狙って直す核酸医薬を詰め、血液中で分解されることなく、がん細胞まで届ける技術がこれまで必要であった。2020年12月には、英国や米国でコロナワクチンが投与されたが、ここでは脂質の膜からできたりポソームや、ミセルと呼ばれるナノ粒子が用いられた。これらの人工の粒子は毒性があったり、細胞にうまく取り込まれない可能性があった。生体由来のエクソソームを使用すれば、細胞同士が情報交換する方法に便乗しており、がん細胞に見破られにくい利点がある。

海外でも、エクソソームをがん治療に使用する動きが出てきている。体内の宅配網を生かし、がんや感染症など多くの病気の治療に繋がると大きな期待が寄せられている。とくに、体の深部のがんなど、難治療性のがんを治せる可能性を秘めており、将来的に牛乳エクソソームは重要な役割を果たすかもしれない。

エクソソームの表面には、CD9, CD63, CD81といった細胞表面抗原が存在し、これらに特異的なモノクローナル抗体で中和することにより、がん転移を抑制できることもわかって来ている<sup>231)</sup>。さらに、乳由来のエクソソームには、IncRNAと呼ばれる200塩基以上のタンパク質情報を持たない(non-coding)RNAが存在するが、近年一部のIncRNAがタンパク質に翻訳される例も見いだされ、翻訳された新規ポリペプチドが生体に機能する可能性を追求する将来研究も大いに期待されよう。

## 7. 乳糖不耐の克服

乳糖不耐は、摂取した牛乳・乳製品中の乳糖が小腸で分解できずに、大腸に移行することで、腸内細菌により分解され、腸管刺激性の酸やガスを産生することで鼓腸や下痢などの不快症状を起こす。離乳した哺乳動物では、小腸内の乳糖分解酵素(ラク

トースフロリジン・ハイドロラーゼ、国際酵素番号: EC3.2.1.108)が分泌されないため、地球上の3分の2の成人はこの症状を示すとされる。乳糖不耐を克服するために、牛乳・乳製品中の乳糖を酵母や細菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ(EC3.2.1.23, 別名ラクターゼ)を添加して加水分解してしまう方法は、世界中で広く使用されている。最近では、プレーンタイプヨーグルトの甘みを増して酸味を和らげる砂糖不添加で、かつ嗜好性を向上させることにも使用されている。

また、高濃度の乳糖に $\beta$ -ガラクトシダーゼを作用させることで、分解されて生じたガラクトースの糖転移反応によるガラクトオリゴ糖(GOS)の製造にも使用されている。GOSは、育児用調製粉乳に添加されたり、機能性ヨーグルトに添加されプレバイオティクスとしての利用が進む。広く使用されているラクターゼには、酵母、細菌、カビ由来のものがある。酵母(*K. lactis*)由来の中性 $\beta$ -ガラクトシダーゼは、牛乳中の乳糖を分解して乳糖不耐を避けるために乳糖分解乳(ラクターゼミルク)の製造に広く使用されている。また、ヨーグルト中の乳糖や乳糖不耐用の市販 $\beta$ -ガラクトシダーゼには、麴カビ(*Asp. oryzae*)由来の酸性酵素が用いられている。麴カビ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼは、至適pHが3付近の酸性域にあることが特徴であり、酸性食品や胃などの消化管の中でも効力を発揮する。

一方、*Bacillus circulans*などの細菌起源の $\beta$ -ガラクトシダーゼは、乳糖の加水分解活性よりも糖転移活性の高いものが多い。2011年、*B. circulans*の培養条件を制御することで、産生する複数の $\beta$ -ガラクトシダーゼから乳糖分解活性の高い製品(ラクトレス)と糖転移活性の高い製品(ビオラクタ)を作り分ける技術が開発された。カビ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼは、pH5-9と広領域で作用し、温度域も低温から高温まで広く作用し、牛乳中の金属イオンの影響を受けず、かつ遊離ガラクトースの活性阻害を受けない優れた特徴を示した。今後世界的に $\beta$ -ガラクトシダーゼの必要性は増加するため、遺伝子組換え生物(GMO)により生産されるGMラ

クターゼの製造が増加することが予想される。すでにビフィズス菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼは酵母での大量調製により製造、販売されており、現在の $\beta$ -ガラクトシダーゼ市場は天然酵素とGM酵素が共存する時代が来ている。また、米国では乳糖不耐の比率が高く、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを医療用に使用する製品が薬局でも容易に購入できる。我が国でも将来的にはこのような商品が登場することが予想される。

以上、この20年間における国内外の酪農科学分野での研究を振り返ってみた。本稿に含めきれなかった科学情報が沢山あることを、ご容赦願いたい。将来の日本の酪農科学の発展のためには、常に海外の研究や特許情報を迅速に収集し、それらの文献内容を解析し、有用な情報を酪農関係団体や研究者と共有し、将来に向けて共に発展していくことは極めて重要であるということ、再確認することができた。今後の公益財団法人日本乳業技術協会の益々のご発展を祈念する。

## 引用文献

- 1) Messer, M. and Urashima, T., Evolution of milk oligosaccharides and lactose., ミルクオリゴ糖とラクトースの進化, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14**(77), 153-176 (2002)
- 2) Urashima, T., *et al.*, Evolution of milk oligosaccharides and lactose: a hypothesis, *Animal (The international journal of animal biosciences)*, **6**, 369-374 (2012)
- 3) Chichlowski, M. *et al.*, The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **2**, 331-351 (2011)
- 4) Prado, E. L. and Dewey, K. G., Nutrition and brain development in early life., *Nutr. Rev.*, **72**, 267-284 (2014)
- 5) Ivy, J. L. *et al.*, Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement., *J Appl Physiol.*, **93**, 1337-1344 (2002)
- 6) 箸方麻希子・佐川未弥, 乳糖試験法の国際的な整合性についての検討, *乳業技術*, **69**, 60-63 (2019)
- 7) 浦島匡, ミルクオリゴ糖を中心とした乳成分の進化, *乳業技術*, **64**, 34-63 (2014)
- 8) Urashima, T. *et al.*, The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk., *Adv. Nutr.*, **3**, 473S-482S (2012)
- 9) Urashima *et al.*, Milk oligosaccharides, in "Oligosaccharides sources, properties and applications", Nova Science, pp. 1-58 (2011)
- 10) Urashima *et al.*, Indigenous oligosaccharides in milk, in "Encyclopedia of Dairy Science", Academic Press, pp. 241-273 (2011)
- 11) 福留博文・酒井史彦, 乳由来シアル酸化合物の利用, *ミルクサイエンス*, **69**, 40-44 (2020)
- 12) Chiang, W. C. *et al.*, Anaphylaxis to cow's milk formula containing short-chain galacto-oligosaccharide. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **130**, 1361-1367 (2012)
- 13) Kaneko. K. *et al.*, Development of hypoallergenic galacto-oligosaccharides on the basis of allergen analysis., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **78**, 100-108, 2014
- 14) Nadolska, B. *et al.*, Lactoferrin inhibits the growth of nasal polyp fibroblasts, *Pharmacol. Rep.*, **62**, 1139-1147 (2010)
- 15) Coppa, G. V. *et al.*, Composition and structure elucidation of human milk glycosaminoglycans., *Glycobiology*, **21**, 295-303 (2011)
- 16) Oftedal, O. T., Origin and evolution of the major constituents of milk. in "Advanced Dairy Chemistry-1A. Proteins: Basic Aspects. 4th edition.", Springer Science,

- New York, pp. 1-42 (2013)
- 17) 大谷元, 牛乳たんぱく質に秘められた免疫系を介した多様な生体防御機能に関する一考察, *ミルクサイエンス*, **55**, 1-14 (2006)
  - 18) 清水誠, 乳タンパク質・ペプチドの研究—生化学的解析から腸管生理学まで, *ミルクサイエンス*, **57**, 35-44 (2008)
  - 19) 松田幹, 乳および乳製品に含まれる糖付加タンパク質の化学と生物学, *ミルクサイエンス*, **59**, 23-36 (2010)
  - 20) Waugh, D. F., The interaction of  $\alpha$ s-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in micelle formation, *Faraday Society Discus.*, **25**, 186-192 (1958)
  - 21) Morr, C. V., Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skimmilk casein micelles., *J. Dairy Sci.*, **50**, 1744-1751 (1967)
  - 22) Slattery, C. W., Review: Casein micelle structure; an examination of models., *J. Dairy Sci.*, **59**, 1547-1556 (1976)
  - 23) Walstra, P., On the stability of casein micelles., *J. Dairy Sci.*, **73**, 1965-1979 (1990)
  - 24) Holt, C, Structure and stability of bovine casein micelles, *Adv. Protein Chem.*, **43**, 63-151 (1992)
  - 25) de Kruif, C. G. *et al.*, Casein micelles and their internal structure., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **171-172**, 36-52 (2012)
  - 26) 石井哲也, カゼインミセルの構造および性質に関する最近の研究動向 *ミルクサイエンス*, **54**, 1-8 (2005)
  - 27) 堂迫俊一, いろいろな視点から見たカゼインミセル, *乳業技術*, **61**, 35-59 (2011)
  - 28) Holt, C. *et al.*, Caseins and the casein micelles: Their biological functions, structures, and behavior in foods., *J. Dairy Sci.*, **96**, 6127-6146 (2013)
  - 29) 青木孝良, コロイド状リン酸カルシウムの研究の歩みとカゼインミセル, *乳業技術*, **65**, 1-22 (2015)
  - 30) 青木孝良ら, カゼインミセルの構造モデルと乳の加工, *ミルクサイエンス*, **66**, 125-143 (2017)
  - 31) 桑田有, ホエイからの各種有用成分の分離と栄養, 機能食品への応用研究, *ミルクサイエンス*, **61**, 95-103 (2012)
  - 32) 今井哲哉, ホエータンパク質の健康機能と利用, *ミルクサイエンス*, **55**, 227-235 (2006)
  - 33) Molinari, C. E., Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk., *J. Proteome Res.*, **11**, 1696-1714 (2012)
  - 34) Kuhara, T. *et al.*, Bovine lactoferrin ingestion protects against inflammation via IL-11 induction in the small intestine of mice with hepatitis., *Br. J. Nutr.*, **111**, 1801-1810 (2014)
  - 35) Ulloa, P. E. *et al.*, Lactoferrin decreases the intestinal inflammation triggered by a soybean meal-based diet in Zebrafish., *J. Immunol. Res.*, **2016**, 1639720 (2016)
  - 36) Puddu, P. *et al.*, Bovine lactoferrin counteracts Toll-like receptor mediated activation signals in antigen presenting cells, *PLoS ONE.*, **6**(7), e22504 (2011)
  - 37) Rulan Jiang and Bo Lonnerdal, Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways., *Biochem Cell Biol.*, **95**, 99-109 (2017)
  - 38) Pereira, C. S. *et al.*, Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H<sup>+</sup>-ATPase., *Oncotarget*, **7**(38), 62144-62158 (2016)
  - 39) Wakabayashi, H. *et al.*, Lactoferrin for prevention of common viral infections., *J. Infect. Chemother.*, **20**, 666-671 (2014)



- 40) Ishikawa, H., *et al.*, The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **434**, 791–796, (2013)
- 41) Kamemori, N. *et al.*, Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats., *J. Vet. Med. Sci.*, **70**, 313–315 (2008)
- 42) Wang, B. *et al.*, Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets., *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**, 561–569 (2007)
- 43) Chen, Y., Lactoferrin promotes early neurodevelopment and cognition in postnatal piglets by upregulating the BDNF signaling pathway and polysialylation., *Mol. Neurobiol.*, **52**, 256–269 (2015)
- 44) Andrea, G–P–S *et al.*, Neurotrophins and synaptic plasticity (Chapter), (editors, Belzung, C. and Wigmore, P.), in “Neurogenesis and Neural Plasticity”, a series of “Curr. Topics Behavioral Neurosci.”, **15**, 117–136 (2013)
- 45) Shimazaki, K. and Watanabe, in the Bio-defensive Function of Dairy Foods (editors Shimazaki, K. and Otani, H.), Research Signpost, pp. 19–46 (2002)
- 46) Yoshikawa, M. *et al.*, Anxiolytic-like activity and mode of action of Lactomedin-2, an oxytocin receptor agonist peptide derived from human lactoferrin., *Ann. Pharmacol. Pharmacol.*, **2**(10), 1–4, Article 1098 (2017)
- 47) 武田安弘ら, 牛ラクトフェリンの健康増進・医療領域での応用, *ミルクサイエンス*, **68**, 167–179 (2019)
- 48) 川上浩, 乳中の塩基性タンパク質の物理化学的および生化学的特性に関する研究, *ミルクサイエンス*, **62**, 85–104 (2013)
- 49) 上野宏, 機能性食品素材としての鉄・ラクトフェリンの応用, *ミルクサイエンス*, **61**, 105–113 (2012)
- 50) Morita, Y. *et al.*, Purification and identification of lactoperoxidase in milk basic proteins as an inhibitor of osteoclastogenesis., *J. Dairy Sci.*, **94**, 2270–2279 (2011)
- 51) Yamamura, J. *et al.*, Bovine milk kininogen fragment 1·2 promotes the proliferation of osteoblastic MC3T3–E1 cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 628–632, (2000)
- 52) Matsuoka, Y. *et al.*, Cystatin C in milk basic protein (MBP) and its inhibitory effect on bone resorption *in vitro.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 2531–2536 (2002)
- 53) 高杉論, 乳・乳製品摂取が骨代謝に及ぼす影響, *ミルクサイエンス*, **61**, 229–237 (2012)
- 54) Toba, Y. *et al.*, Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis., *Bone*, **27**, 403–408 (2000)
- 55) Seto, H. *et al.*, Milk basic protein increases alveolar bone formation in rat experimental periodontitis., *J. Periodontal Res.*, **42**, 85–89 (2007)
- 56) Toba, Y., *et al.*, Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1353–1357 (2001)
- 57) Aoe, S. *et al.*, Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 913–918 (2001)
- 58) Yamamura, Jun-ichi *et al.*, Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 702–704 (2002)
- 59) Aoe, S. *et al.*, A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal

- women., *Osteoporos. Int.*, **16**, 2123–2128 (2005)
- 60) Uenishi, K. *et al.*, Milk basic protein increases bone mineral density and improves bone metabolism in healthy young women., *Osteoporos.* **18**, 385–390 (2007)
- 61) Ishida, Y., *et al.*, Milk basic protein increases ghrelin secretion and bone mineral density in rodents., *Nutrition*, **39–40**, 15–19 (2017)
- 62) Yasueda, T., *et al.*, A new insight into cystatin C contained in milk basic protein to bone metabolism: Effects on osteoclasts and osteoblastic MC3T3–E1 cells *in vitro.*, *Anim. Sci., J.*, **89**, 1027–1032 (2018)
- 63) Morita, Y., *et al.*, Purification and identification of lactoperoxidase in milk basic protein as an inhibitor of osteoclastogenesis., *J. Dairy Sci.*, **94**, 2270–2279 (2011)
- 64) Lee, W. Y.; Sehon, A. H., Abrogation of reaginic antibodies with modified allergens. *Nature*, **267**, 618–619 (1977)
- 65) Hattori, M., Functional Improvements in Food Proteins in Multiple Aspects by Conjugation with Saccharides: Case Studies of  $\beta$ -Lactoglobulin–Acidic Polysaccharides Conjugates. *Food Sci. Technol. Res.*, **8**, 291–299 (2002)
- 66) Kobayashi, K., Modulation of T cell response to  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Bioconjugate Chem.*, **14**, 168–176 (2003)
- 67) Tatsumi, Y. *et al.*, Introducing site-specific glycosylation using protein engineering techniques reduces the immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**, 478–485 (2012)
- 68) Pettersson, J. *et al.*,  $\alpha$ -Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 260–270 (2006)
- 69) Inagaki, M. *et al.*, The bovine lactoporphin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **74**, 1386–1390 (2010)
- 70) Shin, K. *et al.*, Effects of orally administered bovine lactoperoxidase on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 1932–1935 (2008)
- 71) Wakabayashi, H. *et al.*, Orally administered lactoperoxidase increases expression of the FK506 binding protein 5 gene in epithelial cells of the small intestine of mice: A DNA microarray study., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 2274–2282 (2007)
- 72) 石川稿太郎ら, ウシラクトペルオキシダーゼの *in vitro* での細胞障害防止効果について, *ミルクサイエンス*, **60**, 1–6 (2011)
- 73) 中野学ら, ウシラクトフェリン+ラクトペルオキシダーゼの口臭抑制作用とメカニズムの検討, *ミルクサイエンス*, **64**, 107–114 (2015)
- 74) Marcone, S. *et al.*, Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **83**, 152–162 (2017)
- 75) Cicero, A. F. G. *et al.*, Potential role of bioactive peptides in prevention and of chronic diseases: a narrative review., *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 1378–1394 (2017)
- 76) Otani *et al.*, Enhancement of intestinal IgA levels in piglets by oral administration of a commercially available casein phosphopeptide preparation., *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **55**, 429–432 (2000)
- 77) Otani, H. *et al.*, Effects of bovine  $\beta$ -casein

- (1028) and its chemically synthesized partial fragments on proliferative responses and immunoglobulin production in mouse spleen cell cultures., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 2489–2495 (2001)
- 78) Otani, H. and Wakatsuki, S., Reduction of allergic symptoms in NC/Jic Jcl mice fed a diet containing casein phosphopeptide preparation, CPP-III., *Anim. Sci. J.* **75**, 147–153 (2004)
- 79) Matin, MD, A. and Otani, H., Cytotoxic and antibacterial activities of chemically synthesized  $\kappa$ -caseicin and its partial peptide fragments., *J. Dairy Res*, **69**, 329–334 (2002)
- 80) Otani, H. and Suzuki, H., Isolation and characterization of cytotoxic small peptides,  $\alpha$ -caseicidins, from bovine  $\alpha$ s1-casein digested with bovine trypsin., *Anim. Sci. J.*, **74**, 427–435 (2003)
- 81) Matin, M. A. and Otani, H., Release of cytotoxic glycopeptides from human acid casein fraction by the action of stomach proteinases., *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **55**, 6–10 (2000)
- 82) El Khoury Dalia and Anderson G. Harvey, Recent advances in dietary proteins and lipid metabolism. *Curr. Opinion in Lipidology*, **24**, 207–213 (2013)
- 83) Zhang, J-W. *et al.*, Effect of whey protein on blood lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials., *Eur. J. Clin. Nutr.*, **70**, 879–885 (2016)
- 84) Nagaoka, S. *et al.*, Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 11–17 (2001)
- 85) Nagaoka, S., Structure–function properties of hypolipidemic peptides., in Structural basis of detection, stability, bioavailability and function of food-derived bioactive peptides, *J. Food Biochem.*, **43**(1), e12539 (2019)
- 86) Yokoyama, D. *et al.*, Whey protein-hydrolyzed peptides diminish hepatic lipid levels in rats consuming high-sucrose diets. *Food Sci. Technol. Res.*, **22**, 631–638 (2016)
- 87) Kume, H., *et al.*, A newly enteral formula containing whey peptides and fermented milk product protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by suppressing overproduction of inflammatory cytokines., *Clin. Nutr.*, **31**, 283–289 (2012)
- 88) Nii, A. *et al.*, A hydrolyzed whey peptide-based diet ameliorates hepatic ischemia–reperfusion injury in the rat nonalcoholic fatty liver, *Surgery Today*. **44**, 2354–2360 (2014)
- 89) Sugawara, K., *et al.*, Effect of anti-inflammatory supplementation with whey peptide and exercise therapy in patients with COPD. *Respiratory Medicine* **106**, 1526–1534 (2012)
- 90) Sasaki, H., Consecutive-Day Intake of Whey Protein Upregulates mTOR mRNA and Protein Expression in Resting Skeletal Muscle of Mice. *Food and Nutr. Sci.*, **10**, 1035–1044 (2019)
- 91) Sasaki, H., Whey Protein Intake Modulates Lipid Metabolism by Transcriptionally Affecting PPARs and SREBP1c and Their Downstream Enzymes in Mice. *Food and Nutr. Sci.*, **10**, 1045–1055 (2019)
- 92) Kita, M. *et al.*, Effect of supplementation of a whey peptide rich in tryptophan-tyrosine-related peptides on cognitive performance in healthy adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled study., *Nutrients*, **10**(7), 899 (2018)
- 93) Ano, Y., *et al.*, Tryptophan-tyrosine dipeptide, the core sequence of  $\beta$ -lactolin, im-

- proves memory by modulating the dopamine system., *Nutrients*, **11**(2), 348 (2019)
- 94) Ayabe, T. *et al.*, The lacto-tetrapeptide Gly-Thr-Trp-Tyr,  $\beta$ -lactolin, improves spatial memory functions via dopamine release and D1 receptor activation in the hippocampus., *Nutrients*, **11**(10), 2469 (2019)
- 95) 金留理奈・阿野泰久,  $\beta$ -ラクトリン高含有ホエイペプチドによる海馬での神経新生への効果, *ミルクサイエンス*, **68**, 159-166 (2019)
- 96) Yasumatsu, H. and Tanabe, S., The casein peptide Asn-Pro-Try-Asp-Gln enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells, *Br. J. Nutr.*, **104**, 951-956 (2010)
- 97) Setephania L. Sanos *et al.*, Control of epithelial cell function by interleukin-22-producing RORyt<sup>+</sup> innate lymphoid cells., *Immunology*, **132**, 453-465 (2011)
- 98) Vaishnava, S. *et al.*, The antibacterial lectin RegIII  $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine., *Science*, **334**, 255-258 (2011)
- 99) Angela L. Man *et al.*, The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system., *Cellular Immunol.*, **289**, 112-118 (2014)
- 100) Peniche, A. G. *et al.*, Aging impairs protective host defenses against Clostridioides (*Clostridium difficile*) infection in mice by suppressing neutrophil and IL-22 mediated immunity., *Anaerobe*, **54**, 83-91 (2018)
- 101) 松浦啓一ら, ブルー, オランダ, スイスチーズにおける血圧降下ペプチド, Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の遊離, *ミルクサイエンス*, **66**, 97-106 (2017)
- 102) Sievanen, H., Hormonal influences on the muscle-bone feedback system: A perspective., *J. Musculoskeletal Neuronal Interactions* (JMNI), **5**, 255-261 (2005)
- 103) Jaalouk D. E. and Lammerding, J., Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 63-73 (2009)
- 104) 下村吉治, 北浦靖之, 門田吉弘, 分岐鎖アミノ酸の生理機能の多様性, *生化学*, **84**, 938-942 (2012)
- 105) Borack M. S. and Volpi, E., Efficacy and safety of leucine supplementation in the elderly. *J. Nutr.*, **146**, 2625S-2629S (2016)
- 106) Cooper L. AM *et al.*, The role of exercise, milk, dairy foods and constituent proteins on the prevention and management of sarcopenia., *Int. J. Dairy Technol.*, **69**, 13-21 (2016)
- 107) Radavelli-Bagatini, S. *et al.*, Association of dairy intake with body composition and physical function in older community-dwelling women. *J. Academy Nutrition Dietetics*, **113**, 1669-1674 (2013)
- 108) Radavelli-Bagatini, S. *et al.*, Dairy food intake, peripheral bone structure, and muscle mass in elderly ambulatory women. *J. Bone Miner. Res.*, **29**, 1691-1700 (2014)
- 109) Alemán-Mateo, H. *et al.*, Physiological effects beyond the significant gain in muscle mass in sarcopenic elderly men: evidence from a randomized clinical trial using a protein-rich food. *Clinical Interventions in Aging.*, **7**, 225-234 (2012)
- 110) Alemán-Mateo H *et al.*, Nutrient-rich dairy proteins improve appendicular skeletal muscle mass and physical performance, and attenuate the loss of muscle strength in older men and women subjects: a single-blind randomized clinical trial. *Clin. Interv. Aging.*, **9**, 1517-1525 (2014)
- 111) Mori, H. and Tokuda, Y., Effect of increased

- daily intake of protein, combined with a program of resistance exercises, on the muscle mass and physical function of community-dwelling elderly women. *J. Aging Res. & Clin. Practice*, **6**, 56–61 (2017)
- 112) Mori, H. and Tokuda, Y., Effect of whey protein supplementation after resistance exercise on the muscle mass and physical function of healthy older women: A randomized controlled trial. *Geriatrics Gerontol. Int.* **18**, 1398–1404 (2018)
- 113) 山内康生, 食品中のトランス脂肪酸(乳脂質を中心に), *ミルクサイエンス*, **56**, 227–236 (2008)
- 114) 山内清ら, 共役リノール酸に関する研究動向: 牛乳・乳製品, *ミルクサイエンス*, **52**, 17–31 (2003)
- 115) 農林水産省 HP (トランス脂肪酸に関する国際機関の取組み: [https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans\\_fat/t\\_kokusai/](https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/t_kokusai/))
- 116) 吉村芳弘, サルコペニアの最新知見: 中鎖脂肪はサルコペニアに有効な栄養素か?, *オレオサイエンス*, **18**, 383–391 (2018)
- 117) Nishi, Y. *et al.*, Chapter Nineteen-Ghrelin acylation by ingestion of medium-chain fatty acids., *Methods Enzymol.*, **514**, 303–315 (2012)
- 118) Nishi, Y. *et al.* Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology*, **146**, 2255–2264 (2005)
- 119) Savino, F. *et al.*, Assay of ghrelin concentration in infant formulas and breast milk., *World J. Gastroenterol.*, **17**(15), 1971–1975 (2011)
- 120) Murayama H, *et al.* The Hatoyama Cohort Study: design and profile of participants at baseline. *J Epidemiol.*, **22**, 551–558 (2012)
- 121) 松田幹, ミルクのスフィンゴ脂質の吸収と生理機能: スフィンゴミエリンとガングリオンド, *乳業技術*, **59**, 1–14 (2009)
- 122) 小野裕子, 牛乳由来スフィンゴミエリン濃縮物の表皮機能改善効果に関する研究, *ミルクサイエンス*, **61**, 33–40 (2012)
- 123) Wang, B. *et al.*, Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants., *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 1024–1029 (2003)
- 124) Ano, Y. *et al.*, Identification of a novel dehydroergosterol enhancing microglial anti-inflammatory activity in a dairy product fermented with *Penicillium candidum*., *Plos ONE*, **10**(3), e0116598 (2015)
- 125) Ano, Y., *et al.*, Preventive effects of a fermented dairy product against Alzheimer's disease and identification of a novel oleamide with enhanced microglial phagocytosis and anti-inflammatory activity., *PLoS ONE*, **10**(3), e0118512 (2015)
- 126) Nagai, T., *et al.*, Enantiomeric separation of asymmetric triacylglycerol by recycle high-performance liquid chromatography with chiral column., *J. Chromatogr., A* **1218**, 2880–2886 (2011)
- 127) 吉永和明・後藤直宏, トランス脂肪酸位置異性体分析技術の進展, *ミルクサイエンス*, **63**, 71–80 (2014)
- 128) 永井利治・後藤直宏, トリアシルグリセロール (TAG) 異性体分析の発展と乳脂分析への応用, *乳業技術*, **64**, 10–26 (2014)
- 129) 永井利治・後藤直宏, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるトリアシルグリセロール (TAG) 鏡像異性体分離と乳脂分析への応用, *ミルクサイエンス*, **64**, 139–149 (2015)
- 130) Gotoh, N. *et al.*, Actual ratio of triacylglycerol positional isomers in milk and cheese. *J. Oleo. Sci.*, **61**, 173–180 (2012)

- 131) Yoshinaga, K. *et al.*, Simple method for the quantification of milk fat content in foods by LC-APCI-MS/MS using 1,2-dipalmitoyl-3-butyroyl-glycerol as an indicator., *J. Oleo Sci.*, **62**, 115-121 (2013)
- 132) Nagao, K. and Yanagida, T., Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome., *Pharmacol. Res.*, **61**, 208-212 (2010)
- 133) 深見久郎・森田俊雄, 仲村義平ほか, 飲料中の溶存酸素濃度を低下させる方法, 特許第4015134号 (2007)
- 134) 水上佳也・先曾稔・松浦弘明・持地恭子, 食品包装体, 公開特許公報: 特開2005-178850 (2005)
- 135) 神谷哲・豊田活・稲垣宏樹ほか, 牛乳等の溶存酸素を窒素ガスと置換して殺菌する方法及び窒素ガス置換装置, 特許第3091752号, (2000)
- 136) 岩槻慧二・溝田泰達・今野降道ほか, 牛乳類の製造方法および製造装置, 特許第3490428号 (2004)
- 137) 上西一弘ほか, 日本人若年成人女性における牛乳, 小魚 (ワカサギ, イワシ), 野菜 (コマツナ, モロヘイヤ, オカヒジキ) のカルシウム吸収率, 日本栄養・食糧学会誌, **51**, 259-266 (1998)
- 138) Tai V, *et al.*, Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis., *BMJ*, **351**, h4183 (2015)
- 139) Laird, E, *et al.*, Greater yogurt consumption is associated with increased bone mineral density and physical function in older adults. *Osteoporosis Int.* **28**, 2409-2419 (2017)
- 140) Weaver, C. M. *et al.*, Erratum and additional analyses re: Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation., *Osteoporosis Int.*, **27**, 2643-2646 (2016)
- 141) Nicastrò, H. *et al.*, An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions., *Amino Acids*, **40**, 287-300 (2011)
- 142) Gil, Á and Ortega, R. M., Introduction and executive summary of the supplement, role of milk and dairy products in health and prevention of non communicable chronic diseases: A series of systematic reviews., *Advances in Nutr.*, **10**(suppl 2), S67-S73 (2019)
- 143) Sato, Y. *et al.*, Greater milk intake is associated with lower bone turnover, higher bone density, and higher bone microarchitecture index in population of elderly Japanese men with relatively low dietary calcium intake: Fujiwara-kyo Osteoporosis risk in men (FORMEN) study., *Osteoporosis Int.*, **26**, 1585-1594 (2015)
- 144) 川上浩ら, 高齢者における牛乳摂取と身体活動に関する研究, ミルクサイエンス, **63**, 145-153 (2014)
- 145) Hoshino, A, *et al.*, Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis., *Nature*, **527**, 329-335 (2015)
- 146) 和泉裕久, 乳中マイクロRNA・エクソソームについて, ミルクサイエンス, **68**, 207-212 (2019)
- 147) 和泉裕久, 乳の膜小胞/エクソソーム, 乳業技術, **69**, 34-46 (2019)
- 148) 加藤久典・加藤将夫編, 「核酸の分子栄養学」, NTS, p.157-167 (2019)
- 149) Valadi, H. *et al.*, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells., *Nature Cell Biol.*, **9**, 654-659 (2007)
- 150) Pegtel, D. M. *et al.*, Functional delivery of viral miRNAs via exosomes., *Proc. Natl.*

- Acad. Sci., U.S.A.*, **107**(14), 6328–6333 (2010)
- 151) Zhang, Y., *et al.*, Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration., *Molecular Cell*, **39**, 133–144 (2010)
- 152) Kosaka, N. *et al.*, Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells., *J. Biol. Chem.*, **285**, 17442–17452 (2010)
- 153) Friedman, R. C., *et al.*, Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNA., *Genome Res.*, **19**, 92–105 (2009)
- 154) Oshima, K. *et al.*, Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1209–1218 (2002)
- 155) Nakatani, H., *et al.*, Weaning-induced expression of a milk-fat globule protein, MFG-E8, in mouse mammary glands, as demonstrated by the analyses of its mRNA, protein and phosphatidylserine-binding activity., *Biochem. J.*, **395**, 21–30 (2006)
- 156) Agrawal, A. K. *et al.*, Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel., *Nanomedicine*, **13**, 1627–1636 (2017)
- 157) Admyre C., *et al.*, Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk., *J. Immunol.*, **179**, 1969–1978 (2007)
- 158) Ono, M. *et al.*, Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells., *Science Signaling*, **7**(332), ra63
- 159) Naslund, Tanja I. *et al.*, Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4<sup>+</sup> T cells., *AIDS*, **28**, 171–180 (2014)
- 160) Chen, T. *et al.*, Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells., *Scientific Reports*, **6**, 33862 (2016)
- 161) Gu, Y. *et al.*, Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes., *PLoS ONE*, **7**(8), e43691 (2012)
- 162) Baier, S. R. *et al.*, MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers, *J. Nutr.*, **144**, 1495–1500 (2014)
- 163) Izumi H, *et al.*, Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions., *J Dairy Sci.*, **95**, 4831–4841 (2012)
- 164) Kosaka N, *et al.*, MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, *Science*, **1**(1), 7. (2010)
- 165) Izumi H, *et al.*, Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages., *J Dairy Sci.*, **98**, 2920–2933 (2015)
- 166) Zempleni, J. *et al.*, Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants., *J. Nutr.*, **147**, 3–10 (2017)
- 167) Colin Hill *et al.*, The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 506–514 (2014)
- 168) 武藤正達ら, 粉乳製品中のビフィズス菌数測定法: 懸濁液の影響とビフィズス菌種選択的培地の開発, *ミルクサイエンス*, **64**, 15–23 (2015)
- 169) Hansen, Sarah J. Z., *et al.*, Absolute enumeration of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis*

- subsp. *lactis* BI-04 via chip-based digital PCR., *Frontiers Microbiol.*, **9**, 704 (2018)
- 170) Chiron, C. *et al.*, Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain., *J. Appl. Microbiol.*, **124**, 572–584 (2018)
- 171) Gilbert, J. A. *et al.*, Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease., *Nature*, **535**, 94–103 (2016)
- 172) Brandtzaeg, P., Secretory IgA: designed for anti-microbial defense., *Frontiers in Immunol.*, **4**, 222 (2013)
- 173) Mora, J. R., *et al.*, Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells., *Science*, **314**, 1157–1160 (2006)
- 174) Molina-Tijeras, J. A. *et al.*, The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: A novel approach for the management of gastrointestinal diseases., *Nutrients*, **11**, e1038 (2019)
- 175) Shen, Y. *et al.*, Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection., *Cell Host & Microbe*, **12**, 509–520 (2012)
- 176) Bitto, N. J. *et al.*, Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells., *Scientific Rep.*, **7**, 7072 (2017)
- 177) Al-Nedawi K. *et al.*, Gut commensal microvesicles reproduce parent bacterial signals to host immune and enteric nervous systems., *FASEB J.* (Federation of American Society for Experimental Biology), **29**, 684–695 (2015)
- 178) Toyofuku, M. *et al.*, Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*., *Nature Commun.*, **8**, 481 (2017)
- 179) Bunyavanich, S. *et al.*, Food allergy and the microbiome: Current understandings and future directions., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **144**, 1468–1477 (2019)
- 180) Chung, H. *et al.*, Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota., *Cell*, **149**, 1578–1593 (2012)
- 181) Wu, H.-J. *et al.*, Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, **32**, 815–827 (2010)
- 182) Mazmanian S. K. *et al.*, A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease., *Nature*, **453**, 620–625 (2008)
- 183) Round, J. L. and Mazmanian, S. K., Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**(27), 12204–12209 (2010)
- 184) Atarashi, K. *et al.*, Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species., *Science*, **331**(Iss6015), 337–241 (2011)
- 185) Kalliomäki, M. *et al.*, Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial with probiotics., *Lancet*, **357**, 1076–1079 (2001)
- 186) Kalliomäki M, *et al.*, Positive interactions with the microbiota: Probiotics., in “*Adv Exp Med Biol.*”, **635**, 57–66 (2008)
- 187) Kawashima T. *et al.* Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon-beta., *Immunity*, **38**, 1187–1197 (2013)
- 188) Furusawa Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells., *Nature*, **504**, 446–450 (2013)
- 189) Lee, W.-J. and Hase, K., Gut microbiota-



- generated metabolites in animal health and disease., *Nature Chem. Biol.*, **10**, 416–424 (2014)
- 190) Matsumoto, M. *et al.*, Antipruritic effects of the probiotic strain LKM512 in adults with atopic dermatitis., *Annals Allergy Asthma Immunol*, **113**, 209–216 (2014)
- 191) Matsumoto, M. *et al.*, Dynamics of fecal microbiota in hospitalized elderly fed probiotic LKM512 yogurt., *Microbiol Immunol*, **53**, 421–432 (2009)
- 192) Ramsey, K. M., *et al.*, Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis., *Science*. **324**, 651–654 (2009)
- 193) Nakahata Y. *et al.*, Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK–SIRT1., *Science*. **324**, 654–657 (2009)
- 194) Habata, Y., *et al.*, Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum., *Biochim. Biophys. Acta-Molecular cell research*, **1452**, 25–35 (1999)
- 195) Suleyman Aydin, The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus., *Peptides*, **31**, 2236–2240 (2010)
- 196) Sawane, M., *et al.*, Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrin., *Diabetes*, **62**, 1970–1980 (2013)
- 197) 上野宏, 乳由来オステオポンチンの諸性質および栄養生理機能, *ミルクサイエンス*, **68**, 106–116 (2019)
- 198) Pablo Rodriguez del Rio *et al.*, Evaluating primary end points in peanut immunotherapy clinical trials., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **143**, 494–506 (2018)
- 199) Nagakura, K-I. *et al.*, Novel immunotherapy and treatment modality for severe allergies., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **17**, 212–219 (2017)
- 200) Frischmeyer-Guerrero, P. A. *et al.*, Mechanistic correlates of clinical responses to omalizumab in the setting of oral immunotherapy for milk allergy., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **140**, 1043–1053 (2017)
- 201) Amat, F. *et al.*, Is a slow-progression baked milk protocol of oral immunotherapy always a safe option for children with cow's milk allergy? A randomized controlled trial, *Clin. Exp. Allergy*, **47**, 1491–1496 (2017)
- 202) Taniuchi S, *et al.*, Immunotherapy for cow's milk allergy, *Human Vaccin Immunotherapeutics.*, **13**, 2443–2451 (2017)
- 203) Sato, S. *et al.*, Clinical studies in oral allergen-specific immunotherapy: Differences among allergens., *Int. Arch Allergy Immunol.*, **164**, 1–9 (2014)
- 204) 中村亮介ら, アレルゲンデータベース (ADFS) のデータ改訂とアレルゲン性予測ツールの信頼性評価, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **127**, 44–49 (2009) (国立衛研報 第127号)
- 205) Katz, Y. *et al.*, Early exposure to cow's milk protein in protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **126**, 77–82. E1, (2010)
- 206) Boyle R. J. *et al.*, Hydrolysed formula and risk of allergic or autoimmune disease: systematic review and meta-analysis., *BMJ.*, **352**, i974 (2016)
- 207) Takahashi M. *et al.*, Erratum to: Two-weeks-sustained unresponsiveness by oral immunotherapy using microwave heated cow's milk for children with cow's milk allergy., *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **12**, 57

- (2016)
- 208) Onizawa, Y. *et al.*, the association of the delayed introduction of cow's milk with IgE-mediated cow's milk allergies., *J. Allergy Clin. Immunol. in practice.*, **4**, 481–488 (2016)
- 209) Abrahamsson, T. R. *et al.*, Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age., *Clin. Exp. Allergy.* **44**, 842–850 (2014)
- 210) Chinthrajah, R. S. *et al.*, Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **137**, 984–997 (2016)
- 211) Botha, S. *et al.*, Effect of non-surgical weight management on weight and glycaemic control in people with type 2 diabetes: A comparison of interventional and non-interventional outcomes at 3 years., *Diabetes Obesity Metabolism*, **20**, 879–888 (2018)
- 212) Kung, B. *et al.*, Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake., *J Dairy Sci.*, **101**, 8688–8701 (2018)
- 213) Chen, Mu. *et al.*, Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis., *BMC Medicine.*, **12**, Article number 215 (2014)
- 214) Sato, J. *et al.*, Probiotic reduces bacterial translocation in type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled study., *Scientific Reports*, **7**, 12115 (2017)
- 215) Imamura, F. *et al.*, Fatty acid biomarkers of dairy fat consumption and incidence of type 2 diabetes: A pooled analysis of prospective cohort studies., *PLoS Medicine* **15**(10), 1002670 (2018)
- 216) Unger A. L. *et al.*, Colonic bacterial composition is sex-specific in aged CD-1 mice fed diet varying in fat quality., *PLoS ONE.* **14**(12), e0226635 (2019)
- 217) McGrane M. M., Dairy consumption, blood pressure, and risk of hypertension: An evidence-based review of recent literature., *Current Cardiovascular Risk Reports*, **5**, 287 (2011)
- 218) Lana, A. *et al.*, Association of dairy consumption and 24-hour blood pressure in older adults with hypertension., *Am. J. Med.*, **131**(10), 1238–1249 (2018)
- 219) Rietsema, S. *et al.*, Effect of high compared with low dairy intake on blood pressure in overweight middle-aged adults: results of a randomized crossover intervention study., *Am. J. Clin. Nutr.*, **110**, 340–348 (2019)
- 220) Takashima, Y. *et al.*, Relationship of food intake and dietary patterns with blood pressure levels among middle-aged Japanese men., *J. Epidemiology*, **8**(2), 106–115 (1998)
- 221) Umesawa, M. *et al.*, Association between dietary behavior and risk of hypertension among Japanese male workers., *Hypertens. Res.*, **36**(4), 374–380 (2013)
- 222) Tanaka, S. *et al.*, A randomized intervention trial of 24-wk dairy consumption on waist circumference, blood pressure, and fasting blood sugar and lipids in Japanese men with metabolic syndrome., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo), **60**(5), 305–312 (2014)
- 223) Alonso, A. *et al.*, Dietary phosphorus, blood pressure, and incidence of hypertension in the atherosclerosis risk in communities study and the multi-ethnic study of atherosclerosis., *Hypertension.*, **55**(3), 776–784 (2010)
- 224) Xu, J-Y. *et al.*, Effect of milk tripeptides on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials., *Nutrition.*, **24**(10), 933–940 (2008)

- 225) Kverka, M. *et al.*, Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array., *Clin. Chem.*, **53**(5), 955–962 (2007)
- 226) Garofalo Roberto, Cytokines in human milk, *J. Pediatrics*, **156**(2): Supplement, S36–40 (2010)
- 227) Aspinall, R. *et al.*, Interleukin 7 from maternal milk crosses the intestinal barrier and modulates T-cell development in offspring., *PLoS ONE.*, **6**(6), e20812 (2011)
- 228) Ngom P. T. *et al.*, Improved thymic function in exclusively breastfed infants is associated with higher interleukin 7 concentrations in their mothers' breast milk, *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 722–728. (2004)
- 229) 茶山和俊, 乳児の腸管免疫機能の向上を目的とした乳汁中 CCL25 の生理学的機能性の解明, 25560048 研究成果報告書—KAKEN (2014)
- 230) Somiya, M. *et al.*, Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*, **7**(1), 1440132 (2018)
- 231) Nao Nishida-Aoki, *et al.*, Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis., *Mol. Ther.* **25**, 181–191 (2017)