

チーズホエー由来のラクトフェリンの 静菌活性について

Bacteriostatic Activity of Lactoferrin from Cheese Whey

中野 道晴 長谷川伸作 金島 弘恭

Michiharu Nakano, Shinsaku Hasegawa
and Hiroyasu Kaneshima

ラクトフェリン (Lf) は、乳腺・腸管などで生産され、乳汁 (ウシ 0.1mg/ml ヒト 2~4 mg/ml)・初乳 (ウシ 1 mg/ml ヒト 6~8 mg/ml) をはじめとして広く分泌液中に含まれる糖タンパク質¹⁾ (分子量77,000~93,000) である。このタンパク質は金属結合部位を2ヵ所もち²⁾、自然型 Lf では、この部位の8~30%が鉄と結合している。自然型およびアポ Lf (鉄フリー型) は、周囲の鉄を分子中に取り込み、*Escherichia coli* などの細菌の増殖を抑制する³⁾。

一方、我々はチーズ生産に際して副生する大量のチーズホエーの有効利用を図る目的で共同研究を行っており、今回は、加熱処理 (75~80℃ 約15秒間) を施されたチーズホエーから分離された Lf を含む3種類の Lf の静菌作用について検討したので以下報告する。

ラクトフェリン・菌株および装置

ラクトフェリン

チーズホエー由来の Lf (ホエー Lf)

初乳 (ウシ) 由来の Lf (初乳 Lf)

牛乳由来の Lf (牛乳 Lf オレオフィーナ社製)

ホエー Lf・初乳 Lf の分離法の概略を以下に記す。

ラクトフェリンの分離法

チーズホエーパウダーおよび脱脂粉乳を蒸留水に溶解し、5 mM のリン酸バッファー (pH6.0) に対して透析した。ついで同じバッファーで平衡化した CM-⁺SP-トヨパール650M (東ソー製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行なった。透析した試料をカラムに添加後、NaCl 濃度を上げて吸着成分を溶出した。得られた画分について Chibacron Blue F3G-A を用いた吸着クロマトグラフィーを行なった。50mM Tris-HCl バッファー (pH8.0) で平衡化し、試料をカラムに吸着させた後 0~3M KCl の濃度

勾配溶出により溶出した。分離したタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および TSK-GEL G3000SW カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより純度の検定を行なった。

すべての Lf は、Masson らの方法⁴⁾ で鉄を除いてアポ Lf として用いた。

菌株 *Escherichia coli* NIHJ

Pseudomonas aeruginosa NCTC 10490

Candida albicans

道立衛生研究所において保存する菌株をそれぞれの培地で一夜培養 (細菌: 37℃ 酵母: 28℃) して用いた。

使用培地 *E. coli*; 感受性ブイオン培地 (栄研化学製)

P. aeruginosa; 感受性ブイオン培地

(栄研化学製)

C. albicans; サブロー培地

振とう恒温培養装置 (タイヨー社製 MONOSIN II^A型)

分光光度計 (日立製 557型)

実験方法

L 字型培養試験管にそれぞれの培地 9 ml, Lf 溶液 1 ml ($1.8\sim 2.1\times 10^{-5}$ M) を加え、そこに培養菌液 0.2ml (10^6 個) を加えた。試験管を培養装置にセットして細菌は37℃で、酵母は28℃で振とう培養を行なった。経時的に培養液 0.5ml を取り 650nm の吸光度を測定し、菌の増殖を観測した。また、Lf 溶液のかわりに水 1 ml を加えて同様に培養し、これをコントロールとした。

結果および考察

図1に示したように、初乳 Lf は *E. coli* の増殖をわずかながら抑制し、ホエー Lf では明らかな増殖の抑制と菌体

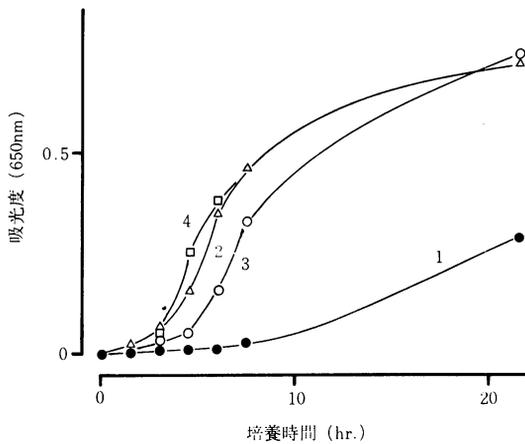


図1 *E. coli* の増殖におよぼすラクトフェリンの影響
 1 (●) ; ホエー Lf, 2 (○) ; 初乳
 3 (△) ; 牛乳 Lf, 4 (□) ; コントロール

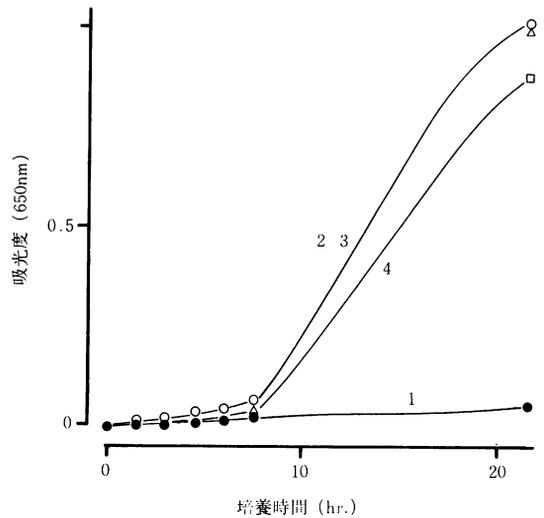


図3 *C. albicans* の増殖におよぼすラクトフェリンの影響
 増殖曲線の番号は図1に同じ

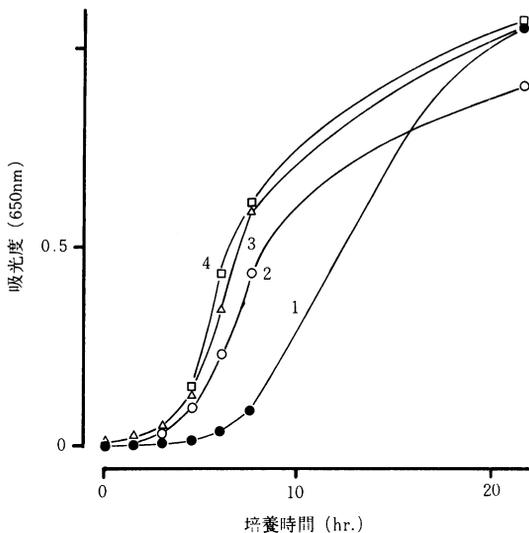


図2 *P. aeruginosa* の増殖におよぼすラクトフェリンの影響
 増殖曲線の番号は図1に同じ

の凝集が観察された。

図2に示したように、ホエー Lf は *P. aeruginosa* の増殖をわずかに抑制した。

図3に示したように、牛乳および初乳 Lf は *C. albicans* の増殖に全く影響を与えなかったが、ホエー Lf では明らかに抑制が認められた。

以上、ホエー Lf は初乳 Lf と同様の静菌活性をもち、限

定された条件下ではより強い活性を示すことが確認された。

母乳を授乳する新生児は、人工栄養児に比べ細菌感染に対して抵抗力が強いと言われており、その理由のひとつとして Lf が関与することが示唆されている⁴⁾。最近、Lf を添加した粉ミルクも市販された。今後、Lf の鉄吸着力の確認などの検討が必要と考えるが、今回得た結果はチーズホエーの有効利用を図る上で有意義なものであると考える。

本報告は昭和61年度より開始された産学官共同研究「道産バイオマスの有効利用におけるバイオリクター利用技術に関する研究」の一環として行なわれたものであり、ここに関係各位に謝意を表します。また精製 Lf を供与下さいました帯広畜産大学酪農化学研究室 島崎敬一博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Reiter, B. : Int. Dairy Fed. Bull., 191, 1 (1985).
- 2) Anderson, B. F. *et al.*, : Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1769 (1968).
- 3) Masson, P. and Heremans, J. : Eur. J. Biochem., 6, 579 (1968).
- 4) Ballen, J. J. *et al.*, : Br. Med. J., 8, 68 (1972).