

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11662

研究課題名(和文) 乳腺炎の食事成分による抑制

研究課題名(英文) Suppression of the mastitis by a diet constituent

研究代表者

江藤 望 (Eto, Nozomu)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90232959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：有用な母乳哺育を阻害する要因の一つとして乳腺炎が挙げられる。このうち、乳のうっ滞に起因する「うっ滞性乳腺炎」は、日常生活で摂取する程度のスクロースによっても炎症が重篤化することを見出した。また、スクロースの過剰摂取によって肝臓に炎症が惹起されるが、スクロースの摂取のみでは乳腺に炎症は起こらず、乳のうっ滞が必須であることを確認した。更に、ローズマリー抽出物は、炎症の抑制に効果のあることをin vitro試験で確認した。

研究成果の概要(英文)：Mastitis is one of the inhibitory factors in breastfeeding. We found that inflammation of stagnation mastitis due to galactic stagnation becomes severe by intake of the sucrose of the quantity to take routinely. However, inflammation did not occur in a mammary gland only by eating of the sucrose, and galactic stagnation was essential. It was confirmed that rosemary extract was effective in inflammatory suppression in an in vitro study.

研究分野：応用生物化学

キーワード：mastitis

## 1. 研究開始当初の背景

ユニセフ、WHO により世界的に母乳育児が推奨されている。研究代表者らは、宮崎県内の母親に対して母乳育児の実態調査を実施したところ、母乳育児を阻害する要因として、乳腺炎等の母乳トラブルの発症が明らかとなった。乳腺炎は授乳期の母親の疾病の一つで、なかでもうっ滞性乳腺炎は、乳汁の排出障害が原因とされており、その発症危険因子として食事が経験的に昔から指摘されている。しかしながら、科学的根拠に基づいた系統的な研究事例はなく、医療者側にも統一した見解がないことから、母親たちの間に戸惑いが認められる。

こうした背景を踏まえ、研究代表者らは、先ず乳腺炎乳を定義するために、乳腺炎乳と正常乳との成分比較（一般分析）を行った。その結果、乳腺炎乳では乳糖含量が有意に低くなることを見いだした。これは、炎症が起きることで、合成された乳糖が血管に漏出することに原因があると考察した。また、味覚センサーを用いた分析により乳腺炎乳の味は「渋味」と「苦味」等の乳児にとって不快な味覚が増加していることを客観的に明らかにした。以上より、乳腺炎乳の特徴の一部はつかめてきた。しかし、母親の食事調査との関連を見いだすのは困難であり、介入試験や乳腺組織そのものの分析が望まれていた。

こうした状況から、研究代表者らはマウスに乳腺炎を発症させる実験動物モデルを開発した。次いで、本モデルを改良して摂食試験を実施したところ、乳汁をうっ滞させて誘導された乳腺炎が、スクロースの摂食によりその症状が重篤化することを見いだした。これは、研究代表者らの知りうる限り食事成分と乳腺炎との係わりを実験で観察した世界で初めての例である。

更に、乳汁をうっ滞させずに食餌組成の違いのみで乳腺に炎症が生じるのか確認したところ、スクロース摂食群はマルトース摂食群と比較して、炎症に係わる NF- $\kappa$ B 経路が乳腺組織で亢進しており、炎症の初期反応が惹起されていることを明らかにした。しかし、好中球の浸潤などは非常に少なく重篤な炎症には至っていなかった。こうしたことから、スクロース（或いはフルクトース）の過剰摂取によって乳腺炎の初期反応が起きるが、児の飲み残し等で乳がうっ滞すると更に重篤化することが考えられた。

一方で、研究代表者らはインフォマティクスを利用して食品成分の機能性を推定するハイスループット食品機能性評価システムを開発し、実用化してきた。本システムは、抗炎症作用を有する食品抽出物および化合物のスクリーニングを簡便に実施出来、乳腺炎を起こしにくくする食品成分の有力な候補を見いだしていた。

## 2. 研究の目的

乳腺炎の発症は、母乳育児を困難にする。乳のうっ滞が乳腺炎を発症させるが、別の発症危険因子として経験的に食事が挙げられている。マウスによる実験で強制的に離乳させると、乳腺に炎症が発症するが、高濃度のスクロースを摂食させておくと、その炎症が重篤化することを既に見出だしている。そこで、スクロース（或いはフルクトース）に起因する乳腺炎の発症を、抗炎症効果が期待される食品成分によって抑制可能であることを確認するために、以下の3点を申請時の目標とした。

(1) 乳腺炎を引き起こすスクロースの摂取量を明らかにすること。

(2) 乳腺炎の発症は肝臓の炎症から独立しているのか、依存しているのか、検証すること。

(3) 抗炎症作用を有する食品成分によって、乳腺炎の発症を予防できるかどうか *in vitro* 及び *in vivo* で検証すること。

このうち、(3)に関しては、実際の配分額から計画を再検討し、動物実験に至る前までを実施した。

## 3. 研究の方法

(1) 授乳・離乳条件を課したマウスの摂食試験

摂取スクロース濃度 10%(WHO 推奨上限)と 20%(米国人女性平均摂取濃度)の AIN-76 組成に準じた2種のスクロース食（他の糖質はマルトース）を作製し、4週間妊娠 ddY マウスに自由摂食させた。出産、授乳期、強制離乳を経て、うっ滞性乳腺炎を起こさせた状態でマウスを安楽死させ、血液・肝臓・乳腺を採取した。血中 CRP 濃度測定(ELISA 法)で炎症の有無を確認し、局所的な炎症は NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化(Western Blot)および炎症関連遺伝子の発現(Real-time PCR)で評価した。また、高脂質・高糖質食摂食試験では、AIN-76 組成に準じた高脂質・高糖質食 (Lard 20%, Sucrose 30%, Maltose 0%, -Corn starch 15%) 及びコントロール食 (Lard 0%, Sucrose 0%, Maltose 30%, -Corn starch 35%) を作製し、交配後の ddY マウスに5週間自由摂食させた。安楽死以降は上記のスクロース食の実験条件と同様に行った。

(2) 授乳・離乳条件を課さないマウスの摂食試験

AIN-76 組成の糖質の全てをスクロースとしたスクロース食と全てをマルトースとしたマルトース食を作製し、妊娠していない6週齢の ddY マウスに8週間自由摂食させた。安楽死以降は、上記の摂食試験と同様に行った。

(3) 抗炎症効果を有する食品成分の *in vitro* 試験による検証

NF B 認識配列を導入した A549 細胞を TNF- で刺激し、食品成分の抗炎症効果をレポートアッセイにより評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 出産適齢期の女性が摂取しうるスクロースが乳腺炎に与える影響

乳腺において、スクロース 20%群(エネルギー換算でスクロースを 20%含む飼料を摂食した群)はスクロース 10%群よりも p65 のリン酸化が有意に亢進していた。また、TNF- (炎症)、IL-1 (炎症)、IL-6(CCL2 産生誘導)、Cxcl1(好中球の遊走)、CCL2(MCP-1: 単球の遊走)の発現も上昇傾向にあったことから、乳腺炎が重篤化していることが示唆された。また、血中 CRP 濃度も前者で高くなる傾向が認められた。スクロース 20%はアメリカ人女性の平均摂取量に相当するため、日常的な量のスクロースの摂取でも乳腺炎が重篤化することが考えられた。

##### (2) 乳腺組織のフルクトース利用の有無

マルトース食摂食群では、肝臓に p65 のリン酸化が認められなかったが、スクロース食(50%スクロース)摂食群では、有意にリン酸化が亢進しており、炎症反応が惹起されていることが認められた。後者では、ChREBP- の発現が上昇傾向にあり、更に、フルクトースのトランスポーターである GLUT-5 及び、脂肪肝の進行と関連のある ChREBP- が有意に亢進していた。こうしたことから、肝臓がフルクトースを利用していることが示唆された。

一方で、乳腺組織では、両群共に p65 のリン酸化が亢進せず炎症が認められなかったが、本結果は授乳と離乳をしていないマウスの乳腺におけるものなので、想定通りの結果であった。すなわち、肝臓では妊娠・出産・授乳・離乳といったイベントとは関連なく高スクロース食によって炎症が惹起されるが、乳腺組織では、食事成分に加えて授乳や離乳のステップが加わることで炎症を引き起こすことが再確認された。また、肝臓の炎症が乳腺組織に影響を与えている可能性は低いことが推測されたが、更なる検討が必要とも考えられる。更に、遺伝子発現に関しては、スクロース摂食群で GLUT-5、ChREBP- の発現に増加傾向が認められたが、有意ではなかった。このことは、授乳・離乳前の乳腺組織ではフルクトースの利用を積極的に行っていないことを示唆しているが、授乳中や離乳直後のデータを得ていないので、更なる検討が必要と考えられた。

##### (3) スクロース以外の危険因子

助産師及び授乳婦に対するアンケート調査では、高糖質食品だけでなく、高脂質食品も避けられている実態があった。そこで、高脂質・高スクロース食摂食の影響を検証した。

その結果、離乳 1 日後に乳腺組織で急激に好中球数が増加し、NF- Bp65 のリン酸化の有意な上昇も認められ、強い炎症を生じたが、マルトース食群では認められなかった。高スクロース食よりも強い炎症が惹起されることが示唆された。

##### (4) 抗炎症が期待される成分の効果

ハイスループット食品機能性評価法 (*in silico*) によってスクリーニングされた抗炎症作用が期待される 3 種類の化合物と 1 種類の農産物抽出物を *in vitro* 試験で検証した。その結果、いずれも NF B の活性化を抑制することを確認した。特に、抽出物の効果が高く有効成分の同定が望まれた。また、今後、*in vivo* 試験での検証を試みたい。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 3 件)

永濱清子、江藤望、他 9 名 8 番目、疲労感を有する健常人に対する完熟きんかんの有効性を探索する非対照・非盲検試験、薬理と治療、査読有、Vol. 45、No. 11、2017、pp. 1831-1842

Takateru Nozaki、Nozomu Eto、他 3 名 5 番目、A novel *in vitro* model of sarcopenia using BubR1 hypomorphic C2C12 myoblasts、Cytotechnology、査読有、Vol. 68、No. 5、2016、pp. 1705-1715

Kiyoko Nagahama、Nozomu Eto、他 6 名 2 番目、Effect of kumquat (*Fortunella crassifolia*) pericarp on natural killer cell activity *in vitro* and *in vivo*、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、査読有、Vol. 79、No. 8、2015、pp. 1327-1336

##### [学会発表](計 17 件)

永濱清子、江藤望、他 4 名 3 番目、食品成分の活性値と作用機序の同時推定方法(第 2 報)、日本農芸化学会 2018 年度大会名古屋大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学(名古屋市)

山口貴史、江藤望、他 2 名 3 番目、高濃度のグルコース存在下におけるフルクトースの脂肪組織由来幹細胞の脂肪分化に与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会名古屋大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学(名古屋市)

寺尾莉奈、江藤望、他 7 名 9 番目、金柑果皮成分による NK 細胞の IFN- 産生増強、日本農芸化学会・関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大会、2017 年 9 月 22 日、大阪府立大学(堺市)

松田亜沙美、篠原久枝、窪野昌信、江藤望、  
他 2 名 6 番目、つっ滞性乳腺炎を重篤化さ  
せるスクロース摂取量、2017 年度（第 21  
回）生物機能研究会、2017 年 6 月 17 日、  
広島大学（東広島市）

永瀆清子、江藤望、他 4 名 3 番目、食品機  
能性評価における活性値と作用機序の同時  
予測の可能性、日本農芸化学会 2017 年度大  
会京都大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子  
大学（京都市）

永瀆清子、江藤望、他 8 名 7 番目、完熟き  
んかん摂取によるナチュラルキラー細胞活  
性への効果：非対称・非盲検探索的試験、  
第 21 回日本フードファクター学会(JSoFF)、  
2016 年 11 月 20 日、富山県立大学(射水市)

Akira Murata、Nozomu Eto、他 4 名 6 番目、  
Kumquat pericarp enhances natural killer  
cell activity、The 29th Annual and  
International Meeting of Japanese  
Association for Animal Cell Technology、  
2016 年 11 月 12 日、Kobe International  
Conference Center (Kobe)

Yuri Sugimura、Nozomu Eto、他 1 名 3 番  
目、Negative effects of sarcopenia-like  
dysfunctional myoblasts on normal  
myotubes、The 29th Annual and  
International Meeting of Japanese  
Association for Animal Cell Technology、  
2016 年 11 月 12 日、Kobe International  
Conference Center (Kobe)

〔図書〕(計 1 件)

江藤望、永瀆清子、技術情報協会、機能性  
食品表示への科学的なデータの取り方と  
表示出来る許容範囲、2015、pp.81-97

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江藤 望 (ETO, Nozomu)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号：90232959

(2) 研究分担者

窪野 昌信 (SAKONO, Masanobu)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：70253515

篠原 久枝 (SHINOHARA, Hisae)  
宮崎大学・教育学部・教授  
研究者番号：40178885

(3) 連携研究者

松原 まなみ (MATSUBARA Manami)  
聖マリア学院大学・看護学部・教授

研究者番号：80189539

菅沼 ひろ子 (SUGANUMA Hiroko)  
宮崎県立看護大学・看護学部・教授  
研究者番号：40405585