

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593368

研究課題名(和文) 食事成分に起因する乳腺炎発症の生化学的解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of the mastitis that occurred by dietary components.

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) 4,100,000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乳腺炎は、スクロースを摂食することで炎症が重篤化する事を見いだした。これは、我々の知りうる限り食品成分が乳腺炎発症あるいは重篤化と関連ある事を実験的に確認した最初の例である。また、スクロースによって炎症が発生した際に発現が上昇する遺伝子群を同定した。さらに、ハイスループット食品機能性評価法を用いて、抗炎症作用を有する食品成分を推定した。今後、食品成分による乳腺炎の予防効果を実証する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Mastitis is one of the inhibitory factors in breast-feeding. Dietary sucrose increased the severity of mastitis caused by milk stasis. As far as we know, this is the first examination that confirmed experimentally the dietary constituent causes the mastitis. Also, we identified the up-regulated gene cluster in the mammary glands inflamed with sucrose. Furthermore, using a high-throughput food functionality evaluation system, we estimated food constituents having the anti-inflammatory effect. It will be necessary to demonstrate protective efficacy of the mastitis with the food constituent in future.

研究分野：応用生物化学

キーワード：乳腺炎

## 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(宮崎看護学術振興財団平成 16 年度事業実績報告書)。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(18th International Congress of Nutrition, 2005 年)。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(第 48 回日本母性衛生学会, 2007 年)。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相関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(宮崎大学農学部研究報告, 55 巻, 75-82, 2009)。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、ショ糖の摂食によりその症状が重篤化することを見いだした(平成 22 年度日本栄養・食糧学会支部大会, 2010 年)。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事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、ショ糖摂食群はマルトース摂食群と比較して、乳腺組織に好中球が有意に存在することを明らかにした。しかし、その程度は非常に低く、重篤な炎症ではなかった(第 26 回母乳哺育学会, 2011 年)。このことは、乳腺炎の原因を食事組成のみには求められないことを示唆している。母乳育児を支持する医療機関の指導にも拘わらず、児の飲み残しを搾乳していない授乳婦は多い。こうした授乳婦が、特定の食事成分を多量に摂ることで、乳腺炎を誘発しているという仮説が導かれた。

## 2. 研究の目的

乳腺炎の発症は、母乳育児を困難にする。

発症危険因子として経験的に食事が挙げられているが、科学的根拠は全く解明されていない。そこで、乳腺炎発症と食事成分との関係を実験的に解明することを目的とし、以下 3 点を目標とした。

(1) 乳腺組織における炎症を主に遺伝子発現レベルで観察すること。

(2) 乳腺における炎症の発症が、肝臓の炎症から独立していることを培養細胞を用いて検証すること。

(3) ハイスループット食品機能性評価法を用いた抗炎症食品成分を *in silico* スクリーニングすること。また、抗炎症作用以外の検証が容易な生体調節機能について、*in silico* スクリーニングの有効性を *in vitro* 系及び *in vivo* 系で検証すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 摂食試験と乳腺組織の炎症観察

仔マウス 10 匹を哺乳する 13 週齢の ddY マウスを AIN-76 組成に準じた各食餌群に分け、自由摂食させた。実験モデルによっては、途中で仔マウスを強制離乳させ、親マウスにうっ滞性乳腺炎を誘導した。飼育終了後、血清サンプルについては、CRP、グルコース、フルクトース濃度を測定した。肝臓と乳腺組織については、HE 染色を行い好中球数を測定した。また別途、DNA マイクロアレイ、qRT-PCR あるいは半定量的 RT-PCR によって、トランスクリプトーム解析を行った。さらに、組織のウエスタンブロッティングを行い、KF B p65 のリン酸化を検出した。

### (2) 培養細胞における炎症反応観察

乳腺上皮細胞株 HC11 を分化誘導培地(グルコース培地、或いはフルクトース培地)で培養し、分化マーカーである *Csn2* の発現上昇を確認後に退縮誘導培地(グルコース培地、或いはフルクトース培地)にて培養した。この間、炎症関連遺伝子の発現を qRT-PCR 或いは半定量的 RT-PCR にて確認した。

### (3) 抗炎症効果を有する食品成分のスクリーニング

研究代表者らが開発したハイスループット食品機能性評価法(Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 巻, 8575-8588, 2011)を用いて、抗炎症作用を有する食品成分と農産物抽出物の *in silico* スクリーニングを行った。ハイスループット食品機能性評価法は、人工ニューラルネットワークを機械学習によって至適化したもので、同時に 10 種類の生体調節機能を評価できる。すなわち、がん細胞(肝臓がん、成人 T 細胞白血病(ATL))増殖抑制作用、抗ウイルス(抗 C 型肝炎ウイルス(HCV))作用、抗炎症作用、血管新生抑制作用(血管内皮増殖因子(VEGF)産生抑制作用、低酸素応答エレメント(HRE)転写抑制作用)、抗がん転移作用、抗酸化ストレス作用、ナチュラルキラー細胞賦

活作用、インターフェロン 産生増強作用、の各生体調節機能である。この中で、特に高い抗炎症作用が推定された食品成分や農産物抽出物について、培養細胞を用いた *in vitro* 系で実測値を測定した。すなわち、NF B 認識配列が導入してあるヒト肺がん上皮細胞 A549 を用いたレポーターアッセイを実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 前提となる現象の再確認

授乳群と離乳群を比較すると、マルトース食摂食群でもスクロース食摂食群でも、離乳群の方で CRP 濃度が高まっており、体内に炎症が惹起されている事が再確認された。また、食事の違いを比較すると、離乳群において有意差が認められ、マルトースよりもスクロースを摂食させることで、より炎症が重篤化することが改めて示された。

##### (2) 乳腺組織にフルクトースが輸送されていることの確認

スクロースやその構成糖であるフルクトースが小腸から吸収され門脈を経て肝臓に運ばれ炎症を引き起こすことは、よく知られている。しかし、乳腺組織にフルクトースが到達するためには、循環器系を介さなければならない。そこで、スクロースやフルクトース摂食マウスの血中フルクトース濃度を測定した。その結果、摂取されたフルクトースは速やかにグルコースに変換されていたが、一部は血中に流れており対照区よりも有意にフルクトース濃度が増加していた。また、血中フルクトースが乳腺組織に取り込まれていることを間接的に評価するため、受動輸送のフルクトーストランスポーターである *Glut5* の発現量を RT-PCR で確認した。その結果、グルコース摂食群と比較してフルクトース摂食群で *Glut5* の発現亢進が認められ、乳腺組織はフルクトースを利用していることが示唆された。但し、乳腺組織内のフルクトース濃度は未確認である。

##### (3) フルクトース摂食マウスの炎症について NF B を指標とした評価

前述のように、フルクトース摂食マウスの乳腺組織では *Glut5* の発現が亢進していた。先行研究によると、種々の組織で GLUT5 発現量と炎症に相関が認められている。そこで、フルクトース摂食マウスについて、NF B の p65 サブユニットのリン酸化を指標とし、肝臓組織と乳腺組織の状態を確認した。その結果、フルクトース食摂食マウスでは、グルコース摂食マウスと比較して脂肪肝が発症し、NF B 経路も活性化の傾向が認められたが有意な差ではなかった。これは、実験のデザイン上、マウスの出産から離乳直前までの短い期間を試験食餌の摂食期間としており、その期間が短かった事によるものと考えられた。

また、乳腺組織の方もグルコース食摂食マウスと比較してフルクトース食摂食マウスでは、NF B 経路が亢進する傾向にあったが有意な差ではなかった。これは、上記(1)の実験とは異なり授乳期間中に炎症の度合いを測定したためだと考えられた。上記(1)の実験のように離乳期間を設定して試験すれば有意な差が観察できた可能性を残した。しかし、食餌成分の違いのみで乳腺組織が前炎症状態に陥る傾向が観察された。

##### (4) DNA マイクロアレイによる評価

乳腺炎に関連しそうな乳腺組織中の発現遺伝子を確認した。仔マウスを強制離乳した場合と、授乳を継続した場合で、親マウスの乳腺組織の遺伝子発現を比較したところ、前者で *Map3k8*, *Thbs1*, *Dusp8* 等 MAP キナーゼ経路に関連したものが多く高発現していた。次いで、食事成分の違いを検討したところ、マルトース摂食群よりもスクロース食摂食群で、*Chka*, *Socs3*, *Cp* 等炎症反応に関わる遺伝子の高発現が認められた。

##### (5) 培養細胞による炎症の観察

前述のように、スクロースやその構成糖であるフルクトースの摂取は、肝臓に炎症をもたらすことがよく知られている。炎症を起こした肝臓からは様々な炎症性因子が放出されているので、周囲に影響を及ぼしうる。スクロース(或いはフルクトース)は乳腺炎を発症させる傾向にあるが、それは、肝臓からの影響を受けたものなのか、或いは血中のフルクトースに起因し、肝臓の炎症から独立したものなのかは不明である。そこで、乳腺上皮細胞株 HC11 を用いた *in vitro* 系で、この点を予備的に検証した。その結果、分化誘導期及び退縮期において炎症関連遺伝子の発現上昇がフルクトース培地で培養した HC11 で確認された。予備的な結果だが、乳腺組織において食事成分に由来する炎症は、肝臓での炎症とは独立して起きる可能性が示唆された。

##### (6) 抗炎症食品成分のスクリーニング

一部の食事成分が乳腺炎の危険因子となることを本研究課題では追求したが、一方で、乳腺炎を防ぐ食事成分を将来的に提案する為、ハイスループット食品機能性評価法を用いた炎症抑制食品成分のスクリーニングを試みた。35 種類の食品成分及び薬剤(主にフラボノイド系、脂肪酸、高脂血症薬、アミノ酸等)並びに 19 種類の宮崎県産農産物抽出物を HepG2 細胞に添加して、MxA 等 13 種類の細胞内マーカータンパク質の発現量について、合計約 20,270 種のデータを取得し、人工ニューラルネットワークにて解析した。その結果、抗炎症作用を有する複数種類の成分(Lipoic acid, Quercetin, Curcumin, Galangin)を推定した。更に、推定成分の抗炎症活性を NF B 認識配列を標的としたレポ

ーターアッセイにより実測したが、いずれも TNF によって誘導される NF B の活性化を阻害することを確認した。また、化合物だけでなく、農産物抽出物(ローズマリー抽出物)に極めて活性を見いだした。こうした化合物や農産物抽出物を経口投与した場合、乳腺炎の発症を予防できるのかどうかは将来の課題とした。

(7) *In silico* スクリーニング結果の *in vitro* 及び *in vivo* による検証

抗炎症活性を有する食品成分や農産物抽出物のスクリーニング過程で成人白血病(ATL)ウイルスの増殖を抑制する成分や、ナチュラルキラー細胞(NK)賦活活性を有する成分が見いだされた。上述(6)の抗炎症成分を直ちに *in vivo* 実験で確認することは本研究課題実施期間中には出来なかったので、検証が容易な他の生体調節機能について、*in vitro* 系、及び *in vivo* 系で確認実験を行った。その結果、ブルーベリー葉抽出物中のプロアントシアニジンに成人白血病ウイルス感染細胞の増殖抑制効果が確認され、そのメカニズムも明らかにした。また、拘束ストレスによって NK 活性が低下したマウスに、クリプトキサンチンを含む金柑たまま果皮抽出物を経口投与すると、NK 活性の低下が抑制されることを明らかにした。ハイスループット食品機能性評価法によって推定された食品成分等は、経口投与によっても効果を発揮する例が得られたので、上述(6)の通り、乳腺炎の発症に対しローズマリー抽出物の抗炎症効果を次の課題として取り組みたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

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、DOI:10.1080/09168451.2015.1025033

Kiyoko Nagahama, Nozomu Eto, 他 5 名 2 番目、Oligomeric proanthocyanidins from rabbiteye blueberry leaves inhibits the proliferation of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated cell lines via apoptosis and cell cycle arrest, *Journal of Functional Foods*, 査読有、Vol. 6, No. 1, 2014, pp. 356-366、DOI:10.1016/j.jff.2013.11.002

[学会発表](計 9件)

Kiyoko Nagahama, Nozomu Eto, 他 6 名 2 番目、Antiproliferative effect of rabbiteye blueberry leaf on human T-cell lymphotropic virus type 1-infected cells, *The 27th Annual and*

*international Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology*, 2014 年 11 月 14 日、Kitakyushu International Conference Center(Kitakyushu)

永瀨清子、江藤望、他 5 名 2 番目、ラビットアイブルーベリー葉の HTLV-1 感染細胞増殖抑制効果、第 8 回レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会、2014 年 8 月 22 日、シーガイアコンベンションセンターサミットホール(宮崎市)

永瀨清子、江藤望、他 4 名 2 番目、食品の体調節機能の効率的な評価法の開発、第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2013 年 9 月 26 日、雲仙新湯ホテル(雲仙市)

Nozomu Eto、他 3 名 1 番目、PAK1 Activation Associated with a Synergistic Anti-Hepatitis C Virus Effect by the Combination of Interferon and Ribavirin, *The 25th Annual and international Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology*, 2012 年 11 月 30 日、Nagoya Congress Center (Nagoya)

[図書](計 1件)

江藤望、永瀨清子、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(食品機能成分の効率的なスクリーニング手法)、2015、pp.81-87

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

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

河原 聡 (KAWAHARA, Satoshi)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：30284821

(3)連携研究者

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

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