

天然素材を用いた新規過冷却保存法の応用展開

本研究の一部は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の研究助成で行った成果である。

過冷却促進物質とは

これまでに報告されている過冷却促進物質

細菌, *Acinetobacter calcoaceticus* タンパク質 (関大)
Bacillus thuringiensis 多糖 (関大)



クローブ
 オイゲノール
 (関大)



ヒノキ
 ヒノキチオール ケンフェノール-7-グルコシド
 (関大)

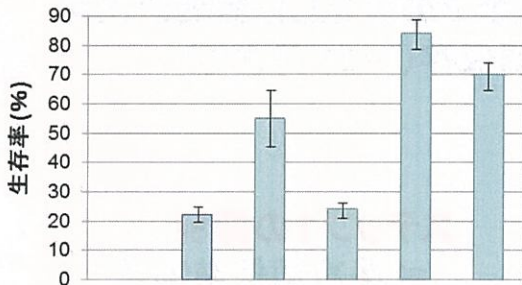


カツラ
 ケンフェノール-7-グルコシド
 (北海道大)

生産性および活性などの問題点で
 価格の面で応用が難しい

過冷却促進物質を用いた保存液

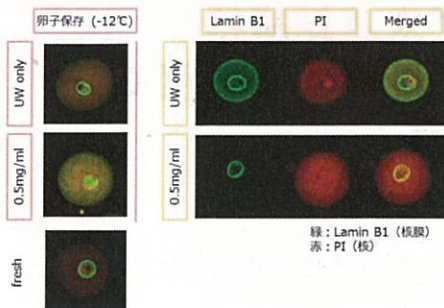
大腸ガンHCT116細胞、-80°Cで2日間(温度制御無、凍結)



成分	0	10	10	10	10
10% DMSO	0	0	10	10	10
10% PBS	0	0	90	0	0
10% 不凍多糖 (2 mg/ml)	100	0	0	90	0
10% 過冷却促進物質 (2 mg/ml)	0	100	0	0	90

コーヒー粕エキスを用いたマウス卵巣保存

共同研究先: 広島大学生物圏科学研究科 星野由美先生



漉し餡粕由来過冷却促進物質エキス

活性成分: ペプチド系物質

特許第5322602号

日本酒由来過冷却促進物質エキス

活性成分: ポリフェノール

特許第5608435号

コーヒー粕由来過冷却促進物質エキス

活性成分: ポリフェノール他

特開2015-38170

現在、他3種のエキスも研究中

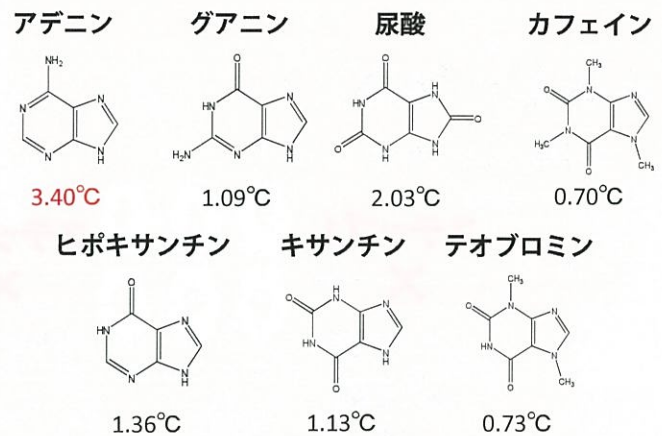
活性成分の構造を
 ヒントに!!



プリン塩基の過冷却促進活性

特許出願中

(最終濃度0.1 mg/ml)

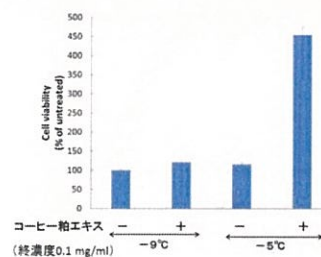


チロシントリペプチドも活性あり

特許出願中

(最終濃度0.1 mg/ml)

コーヒー粕エキスを用いた細胞未凍結保存



24時間保存後の
 増殖した細胞数の結果

(2ヶ月未凍結保存のための
 細胞活性化成分を検討中)



関西大学 生命・生物工学科 天然素材工学研究室

問合せ先 教授: 河原秀久 Tel: 06-6368-0832 E-mail: kawahara@kansai-u.ac.jp

天然素材を用いた新規過冷却保存法の応用展開

本研究の一部は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の研究助成で行った成果である。

細胞、組織、臓器保存液の現状と問題点(赤字が問題)

臓器保存 UW液(4°Cで保存) 臓器によって保存期間が限定(短期間)
原因;低温障害やエネルギー枯渇
↓
過冷却保存

3-O-メチルグルコースを肝臓に灌流し、-6°Cで4日間保存(PEG含有液) (未凍結)
T.A. Berendsen et al, *Nature Medicine*, 20, 790-793 (2014)

細胞保存 DMSO やタンパク質フリー保存液(各社販売)
凍結保存

超低温保存

温度制御して過冷却過程を経て超低温保存

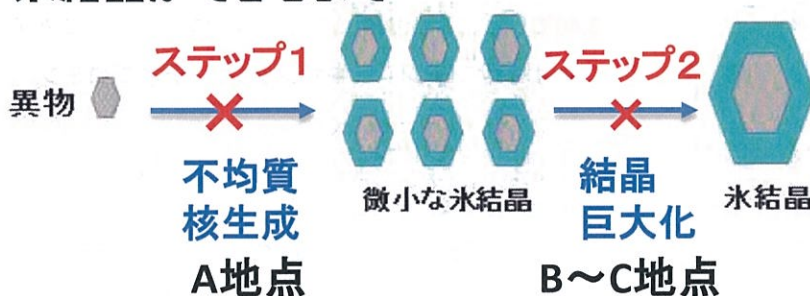
ガラス化保存

多量の溶質を添加した保存液中で凍結することによってガラス化状態の水結晶状態で保存

組織保存 保存液(4°Cで保存) 再生医療での分化した組織の保存
短期間保存(~2ヶ月まで)

氷結晶制御物質とは

氷結晶ができるまで

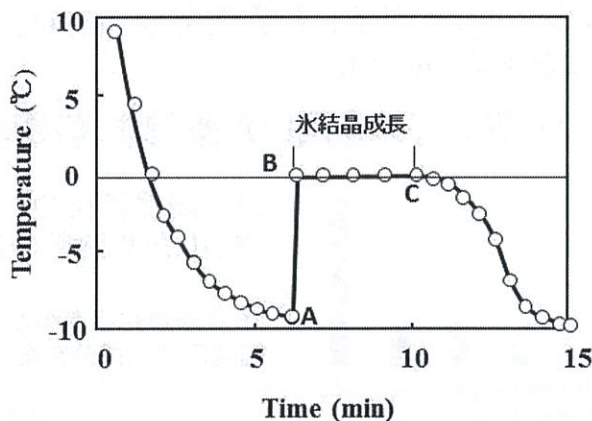


ステップ1の抑制

⇒過冷却促進物質
(抗氷核活性物)

ステップ2の抑制

⇒不凍タンパク質・多糖



ステップ1の抑制(核形成温度を低下)

溶液全体が未凍結維持
(核形成温度より高い温度で)

ステップ2の抑制

凍結した時の氷結晶による物理的
ダメージを軽減



環境負荷物質の分解・無害化、再資源化反応システムの開発

■ 教授 堀 久男 ■ 理学部 ■ 化学科



キーワード

環境負荷物質、分解・無害化、資源循環、亜臨界水、光反応



産業界や私たちの生活に必要な一方で、そのまま環境に出た場合に、いつまでたっても環境中に残留したり、場合によっては生物に蓄積する恐れがあるような物質（例えば有機フッ素化合物）を、低エネルギーコストで無害なものまで分解したり、さらには資源として再利用できるような新しい化学反応の開発に取り組んでいます。

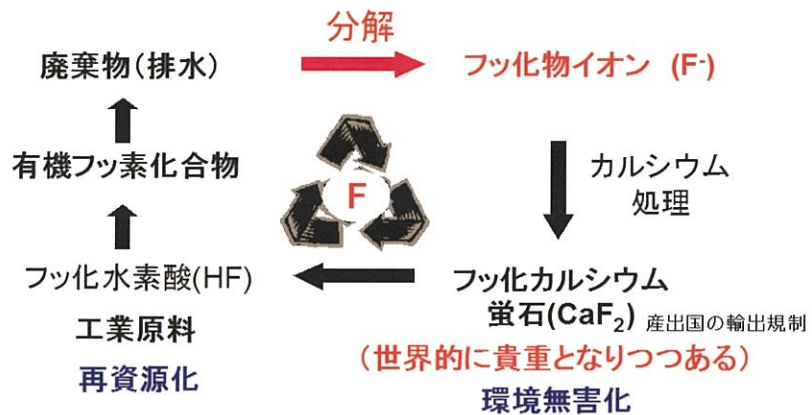


図1. フッ素資源の循環利用スキーム



炭素とフッ素から形成される有機フッ素化合物（フッ素ポリマーも含む）は耐熱性や耐薬品性等の優れた性質を持つため電子部品や自動車の製造等に欠かせないものですが、これらの廃棄物が問題なのです。とにかく安定で、従来の処理技術では分解できません。焼却は可能ですが、相当の高温が必要なだけでなく、生成するHFガスが焼却炉材を劣化させるという問題があります。このためフッ素ポリマーは埋立てしか処分方法がありません。また、全ての有機フッ素化合物の原料は蛍石（CaF₂の鉱物）ですが、その産出は特定国に偏在し、入手難の状況となっています。このような有機フッ素化合物を低エネルギーコストでフッ化物イオン（F⁻）まで分解・無害化し、さらには再資源化する反応技術を研究しています。F⁻まで分解すれば、Ca²⁺との反応で環境無害なCaF₂となり、これは上述のように原料ですので再資源化も可能となります（図1）。今までにヘテロポリ酸光触媒、ペルオキソ二硫酸（光酸化剤）、鉄粉+亜臨界水、酸素+超臨界水等の様々な分解方法を開発しました。現在はその対象をエネルギーデバイスに使用されるフッ素系イオン液体や新規フッ素ポリマーまで拡大し、さらに高効率な分解・再資源化システムを探索しています。

（ 今後の展望 ）

医学が進歩しても病気がなくならないように、環境問題を起こしそうな物質もなくなりません。我々は研究対象を新しい環境リスク懸念物質（過塩素酸イオン、有機ケイ素化合物等）まで広げています。さらには水中からレニウム等の希少金属を回収する方法の開発(写真1)といった、エネルギーや資源問題の解決に役立つ技術の開発にも取り組み始めています。これらの活動により、資源循環型の産業・社会システムの構築に少しでも貢献できればと思っています。

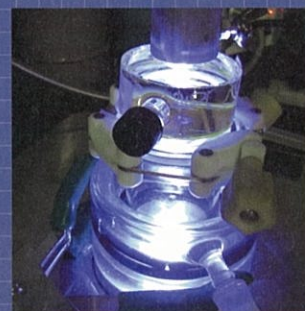


写真1. 水中から希少金属(レニウム)を回収する光反応実験の様子

MESSAGE

これまでも化学企業や電子材料関連企業と共同で研究してきました。有機フッ素化合物の分解反応についてはかなりの経験があり、国内外の規制動向もフォローしています。製造工程等で有機フッ素化合物あるいは他の環境負荷が懸念されそうな物質を扱っておられる企業の方で何か困っていることがございましたらお気軽にコンタクトしていただければと思っています。

I N F O R M A T I O N

研究概要の説明ページ

www.chem.kanagawa-u.ac.jp/~hori

学術論文は上記ホームページに掲載しています。

解説・総説：

1. 国内外におけるPFOS/PFOAの最新規制動向と対応策、技術情報協会(2008)
2. フッ素樹脂の最新動向、澤田英夫監修、シーエムシー出版(2013)
3. 有機フッ素化合物をはじめとする環境負荷物質の分解・無害化反応の開発、水環境学会誌、2013, 36 (9), 331-334 (2013)



取得特許：

1. フッ素化カルボン酸類の分解方法、特許第5071929号(2012)
2. フッ素系イオン交換樹脂膜の分解方法、特許第4941997号 (2012)
3. フッ素系有機化合物の熱水分解法、特許第4788946号 (2011)
4. フルオロカルボン酸類の分解方法、特許第4389058号 (2009)

【新技術説明会(2015.12.1)資料より抜粋】

デジタル式マイクロ流体システムのための弾性表面波を用いた液滴の微小位置検出とその応用



静岡大学創造科学技術大学院
近藤 淳

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University


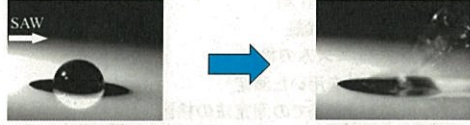
信号処理以外のSAWデバイスの応用



- SAWおよびSAWデバイスの特徴
 - IDTを用いることにより電氣的に制御可能
 - 圧電結晶表面にエネルギーを集中して伝搬
- SAW伝搬面ならびに伝搬面に接する媒質が物理的・化学的に変化すると、その影響によりSAW速度や振幅が摂動を受ける。→SAWセンサ応用
- SAW伝搬面に液滴を付加すると、液体中に縦波を放射し、SAWは減衰する。放射した縦波のエネルギーを利用すると非線形現象が生じる。その結果、例えば液滴搬送が可能となる。→SAWアクチュエータ応用

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

SAWによる非線形現象

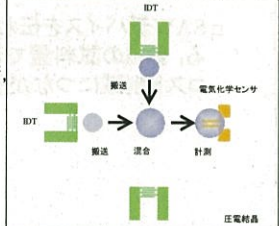

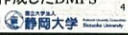
- SAWによる液滴搬送
 
- SAWによる微小液滴飛翔
 

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

(DMFS) SAWによる液滴搬送+計測

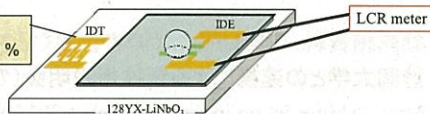
- SAW液滴搬送面にセンサを集積化すれば、「液滴搬送+計測」が実現できる。
- マイクロ流路を連続的に液体を流して計測する技術は、「マイクロ流体システム」、「 μ TAS (micro total analyzing system)」などと呼ばれている。
- SAWの場合、液滴を利用するので、「デジタル式マイクロ流体システム (Digital Micro Fluidic System)」と呼ばれる。

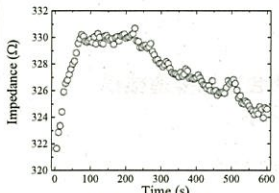




Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

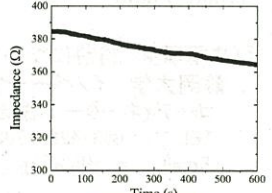
(DMFS) 37度に保ったときの凝固測定

入力電力: 1W
デューティ比: 80%







温度制御あり



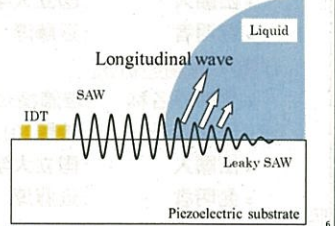


温度制御なし

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

(DMFS) 新技術の特徴・従来技術との比較

- 電極構造はシンプルである。また、搬送面全体に電極を配置する必要はない。
- 液体中への縦波放射により、均一攪拌だけでなく温度制御も可能 → ヒーターを別途必要としない。
- 使い捨て可能なDMFSも簡単に構成できる。

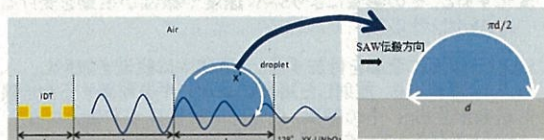




Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

エコー信号の生じる原因の検討1

- 液滴への縦波放射角(レイリー角)はSAWの伝搬速度と液体の縦波音速で決まる。しかし、レイリー角に基づいた液滴内部の音波伝搬経路ではエコー信号は確認できない。

- 下図のように液滴内を縦波が伝わると仮定し定式化。



$$t = 2 \left(\frac{l+i}{V_{SAW}} \right) + \frac{d \left(1 + \frac{1}{2}\pi \right)}{V_L}$$

V_{SAW} : SAWの位相速度
 V_L : 液体の縦波音速
 t : エコー信号が最大値となる時間

SWE

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

静岡大学

7

微小液滴を用いた音波物性測定への応用

$$t = 2 \left(\frac{l+i}{V_{SAW}} \right) + \frac{d \left(1 + \frac{1}{2}\pi \right)}{V_L}$$

- 縦波音速が既知の場合、液滴位置を検知することが可能
- 液滴サイズが既知の場合、液滴内を伝わる縦波音速を測定することが可能!
- 数 μ lの液滴より、縦波音速測定が可能であることは、液滴物性評価、化学反応やバイオ反応の測定などにも応用することが可能である。
- このような報告例はまだない!

SWE

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

静岡大学

8

微小液滴を用いた音波物性計測

- 従来法では、バルクタイプの超音波送受信装置を必要とする。このため、数 μ lの試料量での計測は困難。

- SAWデバイスを伝わるSAWを利用した方法である、数 μ lの試料量で音波物性を測定できるので、コスト削減につながる。

SWE

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

静岡大学

9

実用化に向けた課題

- DMFS
 - 電気化学センサ以外のセンサの集積化(例えば局在表面プラズモンを利用した光センサ)と多機能化
 - 実際に必要とされる用途の探索
 - 複数の液滴の位置検出ならびに制御
 - DMFSの最適設計論の確立
 - 自動液滴滴下装置(改良)
- 微小液滴を用いた計測
 - 仮定の妥当性の検証
 - 縦波発生メカニズムの検証
 - 水以外の液体を用いた測定
 - 減衰が大きい液滴での測定法の検証

SWE

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

静岡大学

10

本技術に関する知的財産権

- DMFS
 - 発明の名称 : 弾性波デバイス
 - 出願番号 : 特願2009-531109
 - 特許番号 : 特許第5283232号
 - 出願人 : 国立大学法人静岡大学
 - 発明者 : 近藤淳
- 微小液滴の計測
 - 発明の名称 : 液滴検知装置及び液滴検出方法
 - 出願番号 : 特願2015-136967
 - 出願人 : 国立大学法人静岡大学
 - 発明者 : 近藤淳, 杉浦健

SWE

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

静岡大学

11

資料:お問い合わせ先

◎詳細資料: 下記URLの(4)を参照ください

静岡大学との連携による新技術説明会(2015.12.1)

https://shingi.jst.go.jp/past_abst/abst/2015/shizuoka/tech_property.html

◎共同研究、特許について:

静岡大学 イノベーション社会連携推進機構

コーディネーター : 由比藤 文夫

TEL : 053-478-1702

Email : ip-office@cir.shizuoka.ac.jp

SWE

Surface Wave Electronics Laboratory, Shizuoka University

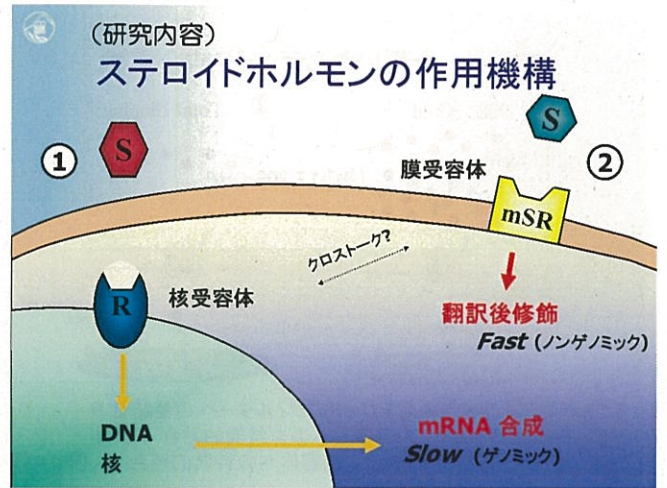
静岡大学

12

活性型・ヒト型プロゲステロン膜受容体(mPR)の大量合成技術を確立

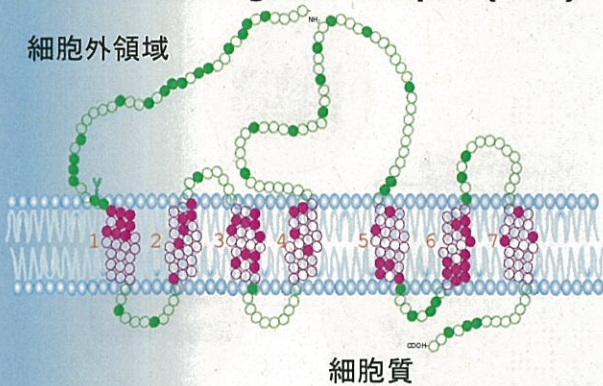
静岡大学
理学部
生物科学科
徳元 俊伸

Shizuoka University

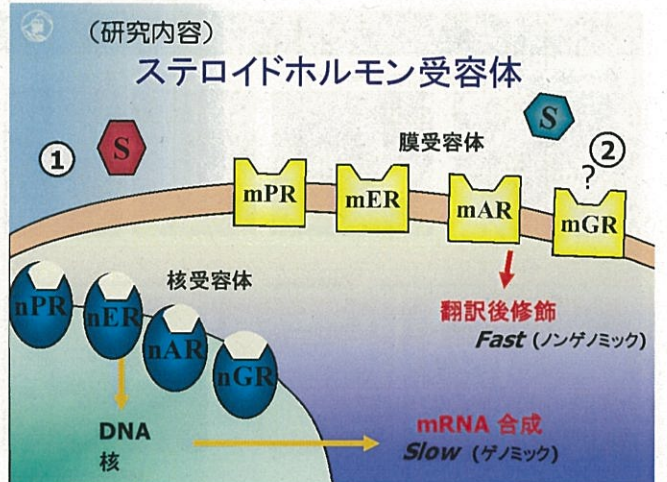


Membrane Progesterin Receptor (mPR)

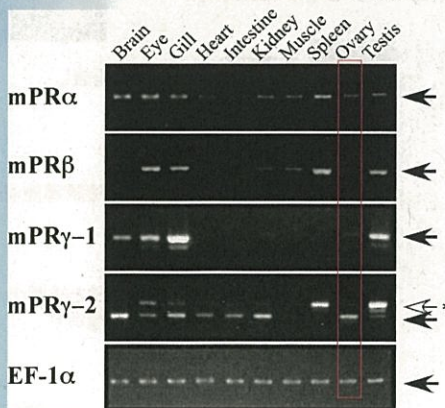
細胞外領域



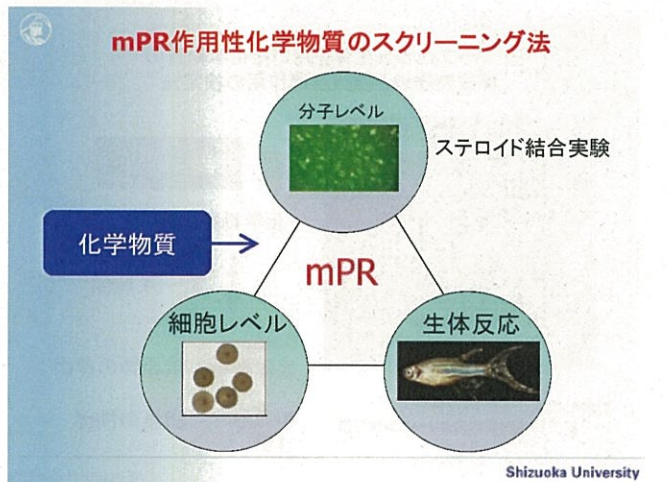
Shizuoka University



RT-PCRによるキンギョmPR分子の組織分布の解析



mPR作用性化学物質のスクリーニング法



Shizuoka University

フィルターを用いたステロイド結合実験

① NSB: +Cold ② Total Binding

Total Binding ラベル化ステロイドのフィルターへの全結合 9
 Non-specific Binding フィルターへの非特異的結合 4
 Specific Binding on receptor 受容体への特異的結合 5 (9-4=5)

遺伝子導入培養細胞を用いたステロイド結合実験:mPR α

MDA-MB-231 細胞

MDA-MB-231/goldfish mPR α

○ 17,20β-DHP
 □ DES
 ▲ E2
 ◆ And
 □ Cor

天然のホルモン17,20β-DHP、DESがmPRと結合

Shizuoka University

Radiolabeled ligand binding assay

- 1 (Sample preparation)
- 2 (Membrane settings)
- 3 (Sample apply)
- 4 (Washing)
- 5 (Membrane collection)
- 6 (Membrane kept in vial)
- 7 (Vial shaking)
- 8 (Measuring of binding activity)

Shizuoka University

mPR作用性化学物質のスクリーニング法

化学物質 → mPR

分子レベル
 細胞レベル
 生体反応

Shizuoka University

ゼブラフィッシュ生体を用いた化学物質の卵成熟誘導と排卵誘導作用の検定法

化学物質を飼育水に添加

3 ~ 4 時間

Assay
 産卵誘導 排卵卵の榨出
 卵成熟 卵巣の摘出
 排卵

特許4501002、4528973号
 内分泌攪乱性物質のスクリーニング方法

Shizuoka University

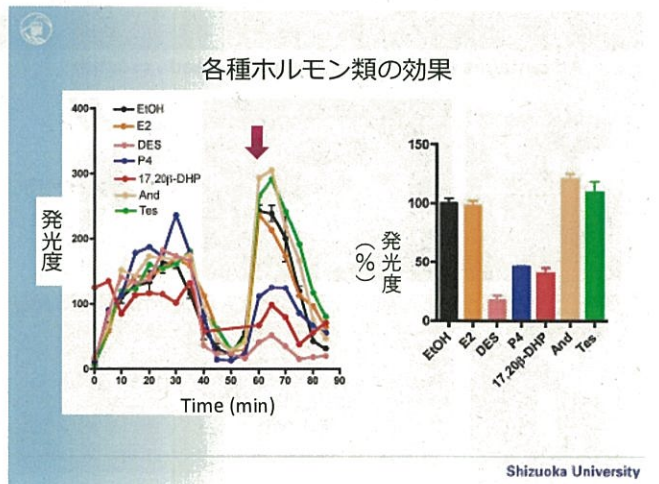
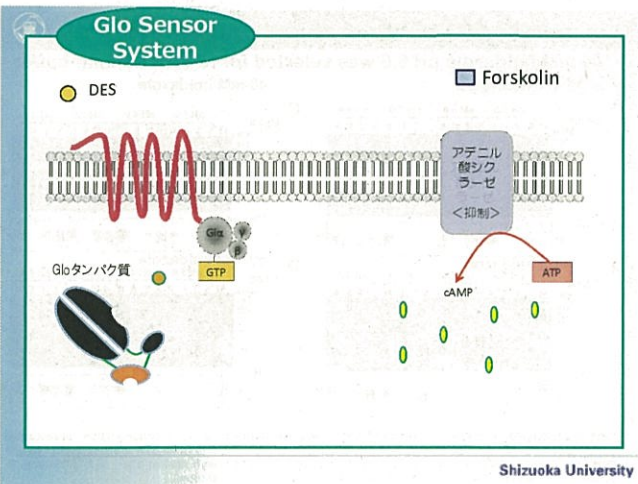
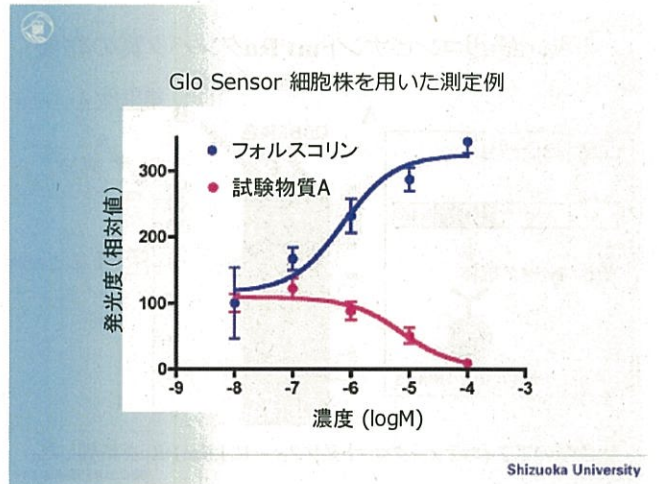
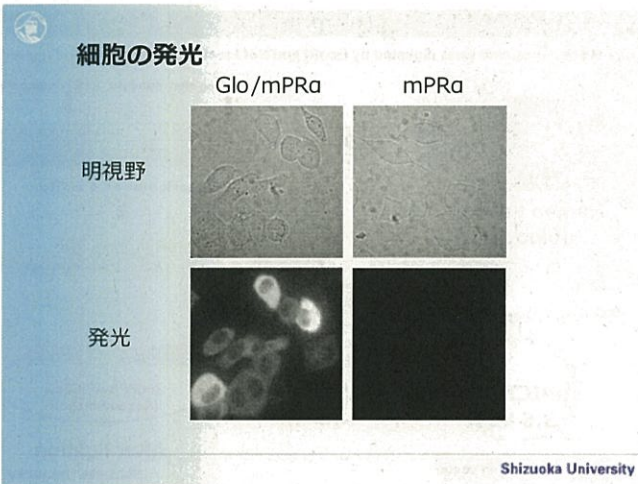
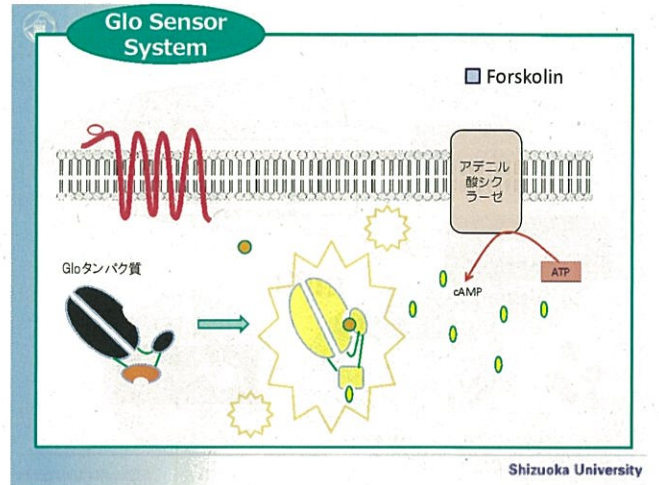
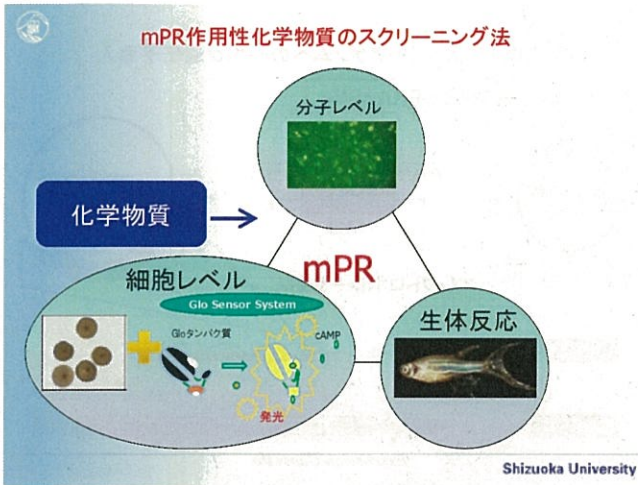
インビボアッセイの結果

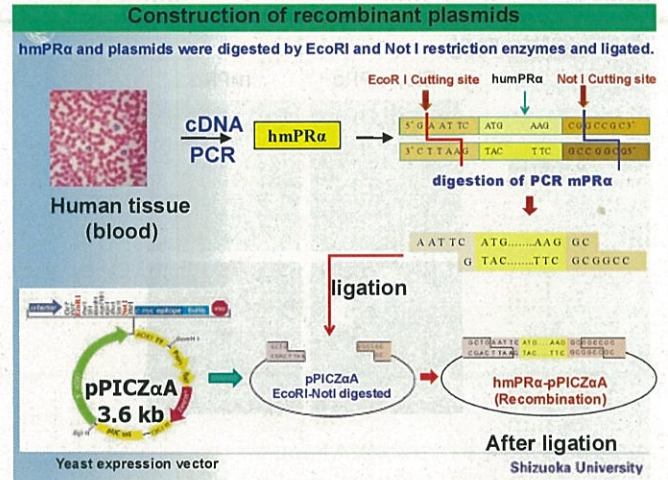
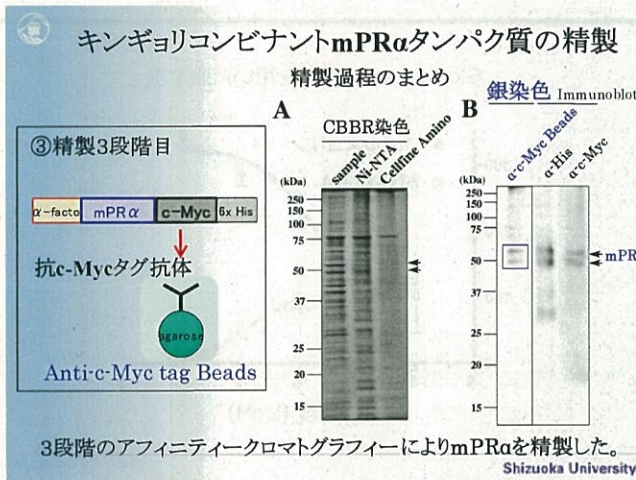
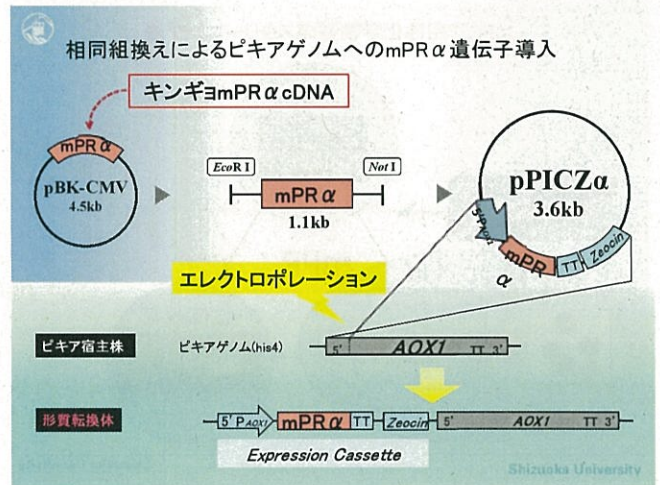
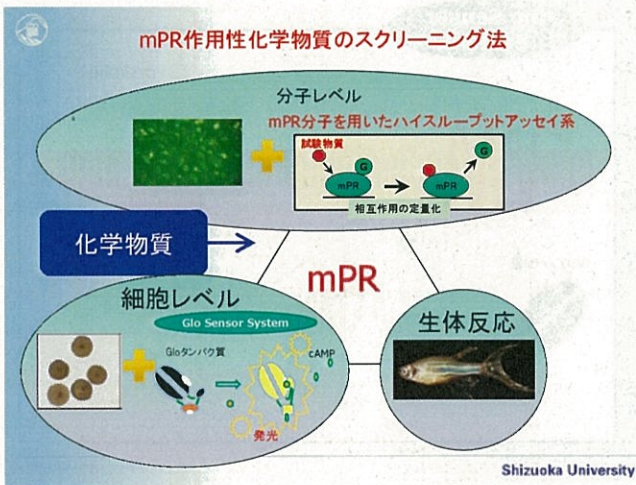
不透明な未成熟卵 → 誘導能無し

透明な卵 → 卵成熟誘導能有り

受精膜の形成 → 卵成熟と排卵の誘導能有り

Shizuoka University



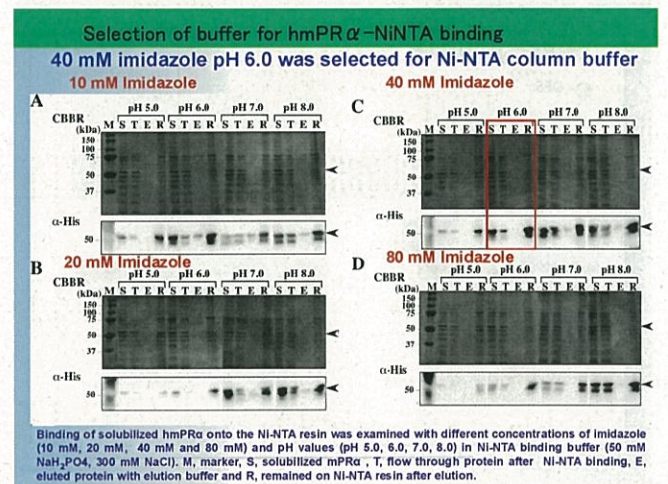


Yeast cells were broken by Ball Mill PM100

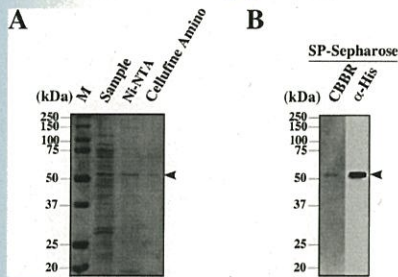
Advantages of Ball Mill compare to Beads crusher

	MS100	Ball Mill (PM100)
Sample preparation	Breaking buffer with 0.1% digitonin, 100mM PMSF and Zirconium	Breaking buffer
Breaking condition	Non freezing condition	Freezing condition
Amount of cells use at a time	150 ml culture	500ml culture cell
Breaking time	60 min	12min

Shizuoka University



Purification of hmPR α , at a glance
SDS-PAGE assay indicated that hmPR α was
successfully purified



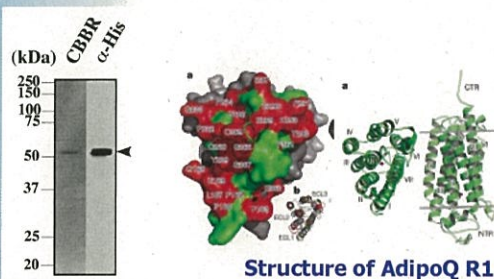
Detection of recombinant protein as hmPR α . (A) SDS-PAGE analysis of DDM solubilized (sample), column chromatography over Ni-NTA, amino cellulose (Cellufine Amino). Protein bands were detected by CBBR staining. (B) SDS-PAGE analysis of purified hmPR α , detected by CBBR staining (CBBR) or immunostained by anti-His-tag antibody (α -His)

mPR分子を用いたハイスループットアッセイ系

組換えmPRタンパク質の大量合成

Shizuoka University

精製ヒトmPRタンパク質を用いた立体構造解明



(想定される用途)

- ステロイド膜受容体 (mPR) を標的とする新規医薬品のスクリーニング
- 生殖医療分野 (排卵誘発剤、排卵抑制剤、人工授精の補助薬)
- mPRが真菌の菌糸の伸長抑制→抗菌剤
- mPRの各臓器における機能解明により用途は拡大する可能性あり
- 内分泌かく乱物質のスクリーニング

(実用化に向けた課題等)

- 従来の方法は作業が煩雑、専門技術が必要
- 培養細胞を用いた発光測定法の微量化によるコストダウン
- 発現mPRタンパク質を用いたハイスループットアッセイ法の開発 菌類、ヒトの遺伝子
- 受容体の立体構造解明によるドラッグデザインへの応用

お問い合わせ

静岡大学
 イノベーション社会連携推進機構

TEL 053-478-1702
 FAX 053-478-1711

e-mail : bioexpo-s@cjr.shizuoka.ac.jp

微生物が分泌するベシクルを用いた 選択的微生物制御の開発

静岡大学
工学領域
田代 陽介

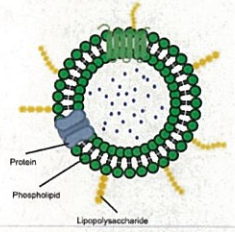
Shizuoka University

微生物が分泌するベシクル → Membrane vesicles (MVs)

- 微生物の細胞膜から形成されるリボソーム
- 直径20-200nm
- リン脂質二重層
- 内部にDNAやタンパクが濃縮
- 他の細胞に内部の物質を伝達



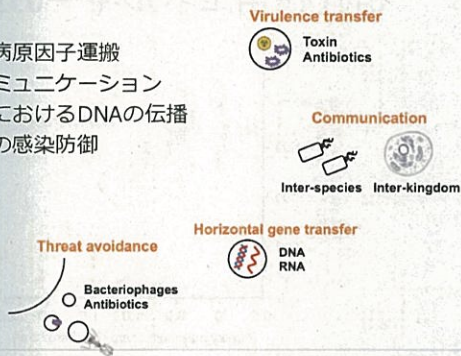
Tashiro et al. 2010 Environ Microbiol



Shizuoka University

MVsの生理学的機能

- 宿主への病原因子運搬
- 細胞間コミュニケーション
- 微生物間におけるDNAの伝播
- ファージの感染防御



Shizuoka University

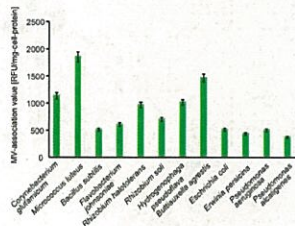
研究課題

- MVsを用いて、特定の細胞に
任意の物質を導入する技術の確立
- MV形成メカニズムの解明

Shizuoka University

緑膿菌MVsにおける 微生物細胞相互作用

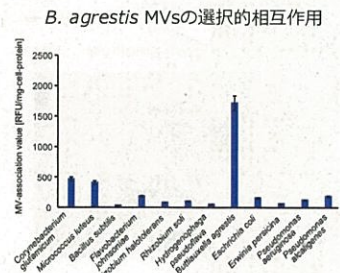
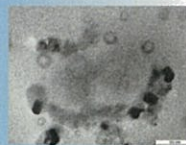
Pseudomonas aeruginosa
PAO1



Shizuoka University

MVsにより選択的相互作用を行 う微生物

Buttiauxella agrestis
JCM1090



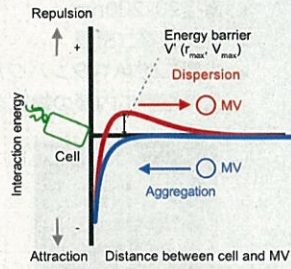
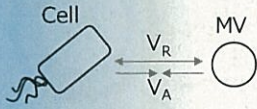
Shizuoka University

DLVO理論

Derjaguin-Landau Verwey-Overbeek (DLVO) theory

$$V_{total} = V_R + V_A$$

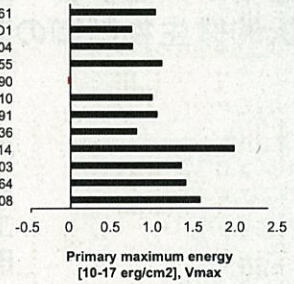
V_R : 静電的反発力
→ 表面電位が関与
 V_A : ファンデルワールスカ
→ 粒子径が関与



Shizuoka University

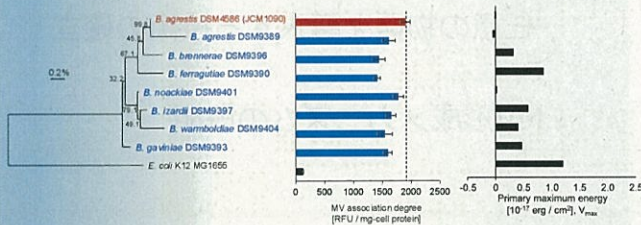
B. agrestis MVsと各微生物細胞における相互作用エネルギー

- P. alcaligenes* JCM20561
- P. aeruginosa* PAO1
- E. persicina* JCM3704
- E. coli* K12 MG1655
- B. agrestis* JCM1090
- H. pseudoflava* JCM21410
- R. soli* JCM14591
- R. halotolerans* JCM17536
- F. johnsoniae* JCM8514
- B. subtilis* JCM11003
- M. luteus* JCM1464
- C. glutamicum* JCM1308



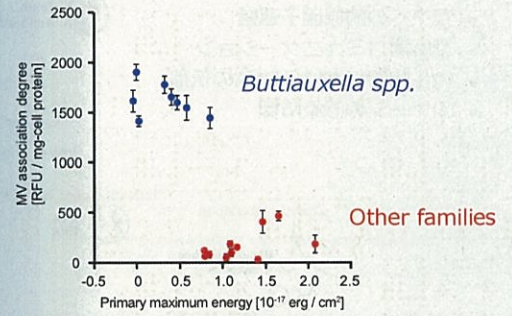
Shizuoka University

*Buttiauxella*属細菌に保存されるMVを介した選択的相互作用



Shizuoka University

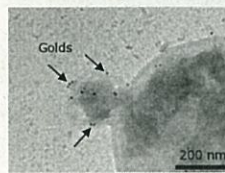
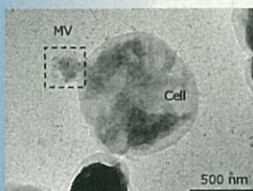
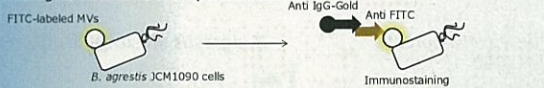
MV結合度と相互作用エネルギーの関係



Shizuoka University

MVsの細胞融合

Immunogold electron microscopic detection



ベシクルは細胞に融合して内部の物質を伝達

Shizuoka University

MVsを用いた標的微生物細胞の制御



- 標的の微生物に選択的に物質を運搬
- 標的の微生物細胞以外に影響を与えにくい
- ベシクル中にDNAや抗生物質を高濃度に封入可能

Shizuoka University

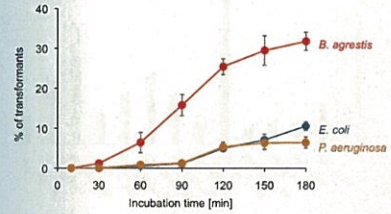
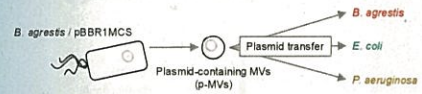
MVsを用いた微生物細胞への核酸導入



- 高濃度のDNAをMVsに封入 (1×10^6 copies/ μ L-vesicles)
- MVs中のDNAはDNase等に安定
- 形質転換・形質導入・接合に次ぐ第4の核酸導入法
- 形質転換系が確立していない細菌においてもDNAを導入

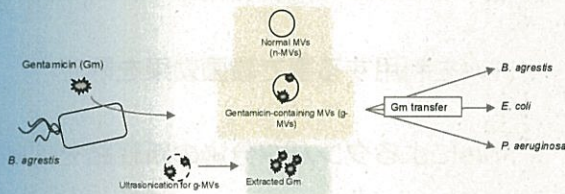
Shizuoka University

MVsによる標的微生物細胞への核酸導入



Shizuoka University

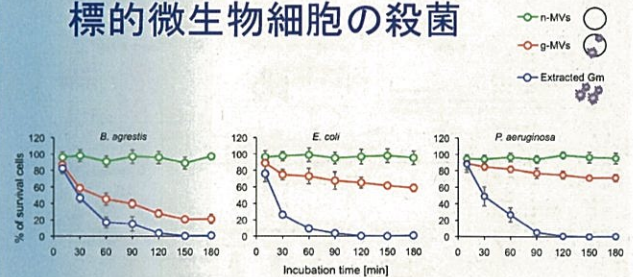
MVsを用いた微生物細胞の殺菌



ゲンタマイシンを高濃度に保持したMVs を作製

Shizuoka University

MVsを用いた標的微生物細胞の殺菌

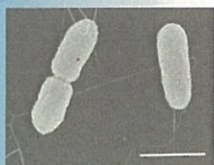


MVsを用いる事で殺菌される細菌の種類を限定

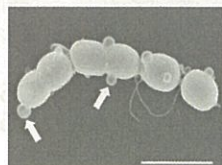
Shizuoka University

MV形成メカニズムの解明

緑膿菌野生株



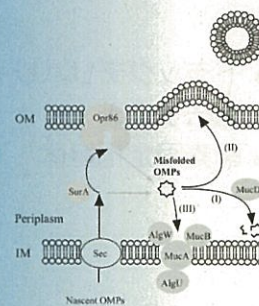
Opr86発現低下株



Tashiro et al. 2008 J Bacteriol

Shizuoka University

緑膿菌における膜タンパク輸送モデル

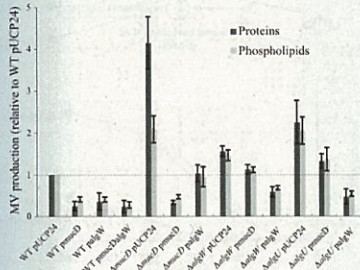


グラム陰性菌：
ペリプラズムに蓄積する膜タンパクがMVsにより細胞外に排出

Tashiro et al. 2009 J Bacteriol

Shizuoka University

ペリプラズムに局在する プロテアーゼがMV生産に関与



Tashiro et al. 2009 J Bacteriol

Shizuoka University

MVsへのタンパク封入

細胞質に局在するタンパク

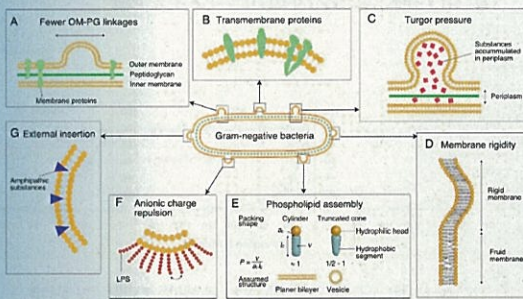
N ————— C

MVsに封入されるタンパク

N — [シグナルペプチド] — PDZドメイン — C

Shizuoka University

MVsの形成メカニズム



Toyofuku & Tashiro et al. 2015 Adv Colloid Interface Sci

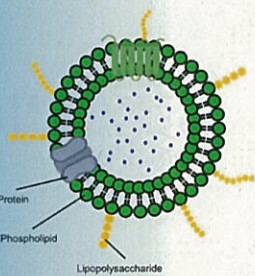
Shizuoka University

まとめ

- MVsにより標的微生物細胞へ核酸導入
- MVsを利用する事で殺菌効果を限定
- MVsによるタンパク分泌の新経路を提唱

Shizuoka University

展望



- ドラッグデリバリー
- 遺伝子導入
- 酵素固定化担体

Shizuoka University

お問い合わせ

静岡大学
イノベーション社会連携推進機構

TEL 053-478-1702
FAX 053-478-1711

e-mail : bioexpo-s@cjr.shizuoka.ac.jp

Shizuoka University

新生児の成長及び免疫機能 に対する母乳中ケモカイン の効果

静岡大学
学術院・農学専攻
准教授 茶山和敏

Shizuoka University

研究背景①

母乳：哺乳類の新生児の栄養供給源
免疫機能が未熟な新生児を母親由来の
免疫タンパク質によって保護

IgA、IgG、ラクトアルブミン、ラクトフェリン、リゾチームなど
サイトカイン類、ケモカイン類の微量免疫タンパク質

ケモカイン

・サイトカインの1種 ・現在、約50種類が発見
・免疫細胞の遊走活性を持つ

CCL25 (Thymus-Expressed Chemokine ; TECK)

・腸管免疫に深く関与
・胸腺および小腸で発現

レセプター：CCR9

Shizuoka University

マウス母乳中CCL25の発見と新生児 に対する生理学的機能性の解明

- 1、マウス母乳中にCCL25の存在を確認。
- 2、マウスにおいて、母乳中のCCL25は、新生児の成長、免疫器官や腸管免疫の発達の促進に寄与。

ヒト母乳中のCCL25の有無とその含有量の分析

- 1、ヒト母乳中にCCL25の存在を確認
- 2、その含有量は、初乳で多く、また初産婦が多い。
- 3、その含有量は個人差が大きい。

Shizuoka University

マウス母乳中のCCL25の有無と その含有量の分析およびマウス 新生児の成長および免疫機能 の発達に対する母乳中CCL25 の役割

Shizuoka University

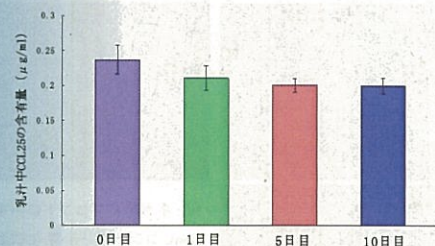
背景

- 人工乳で育てられた哺乳動物の新生児の成長や各種臓器、免疫系組織などは、母乳哺育された新生児よりもその発達が遅くなることが判明している。
- 人工乳(粉ミルク)には、分泌型IgAやケモカインなどの低分子量タンパク質がほとんど含まれていない。

目的

母乳中に含まれるCCL25の新生児の腸管発達や免疫機能への役割を解明するために、マウス母乳中のCCL25含有量を分析するとともに、人工乳にCCL25を添加してマウス新生児の人工哺育を行い、腸管や免疫器官の発達に対する影響を検討。

マウス母乳を継続的に採取して、ウエスタンブロッティング法によって、CCL25の含有量を分析



★ マウス母乳中には、乳清1ml中に0.2~0.25μgのCCL25が含まれていることを、世界に先駆けて確認。

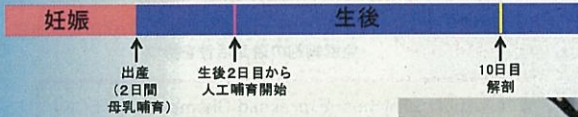
➡ その生理学的機能性を検討

実験材料及び方法

実験動物： ddY系マウス新生仔

人工哺育実験

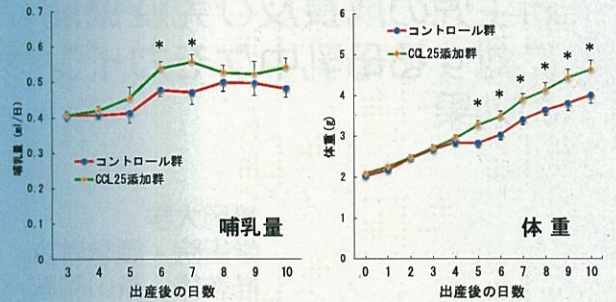
出生後2日間母乳哺育させた後、2日目から、
(1)コントロール群、(2)CCL25添加群 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
の2群に分けて、人工哺育。



- 1、投与期間中の授乳量、体重を調べ、10日目に解剖して、大腸、小腸、脾臓、胸腺の重量を計測
- 2、免疫組織化学的染色によって、小腸組織におけるCCL25とIgAの陽性部位の経時的変化を確認。
- 3、小腸のパイエル板の数と大きさを比較



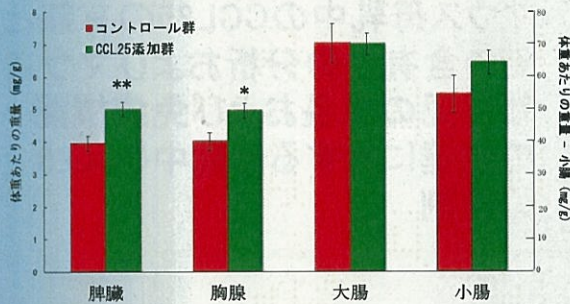
人工哺育した新生仔マウスの 哺乳量および体重の経時的比較



授乳量は、一日の総授乳量の平均値±標準誤差を表示
*: コントロール群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

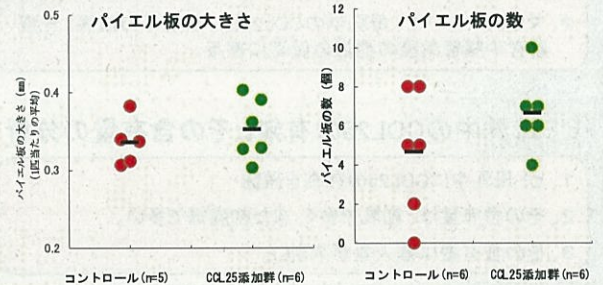
Shizuoka University

人工哺育した新生仔マウスの体重あたりの 臓器重量の比較



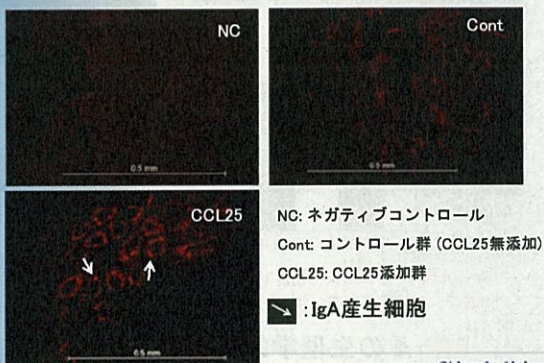
バーは標準誤差を示す。
*, ** : コントロール群の各臓器重量に対して有意差あり ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

人工哺育した新生児マウス小腸の パイエル板の数及び大きさの比較



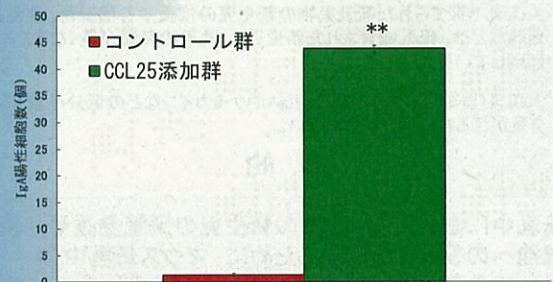
Shizuoka University

免疫組織化学的染色法による人工哺育した 新生仔マウス小腸組織のIgA産生細胞の検出



Shizuoka University

人工哺育した新生仔マウスの腸管における IgA陽性細胞数の比較



7本の小腸絨毛内に確認されたIgA陽性細胞の総数の平均値を表示。
バーは標準誤差を示す。

** : コントロール群のIgA陽性細胞数に対して有意差あり ($P < 0.01$)

Shizuoka University

結果のまとめ

- CCL25 添加群の新生児マウスの体重は、5日目以降から、コントロール群に比べて有意に増加した。
- 総哺乳量もCCL25添加群で有意に増加していた。
- CCL25 添加群では、コントロール群に対して、小腸の重量が増加傾向を示し、さらに、脾臓及び胸腺が有意に増加していた。
- CCL25 添加群のパイエル板は、個々の大きさには差が見られなかったが、その個数はコントロール群よりも多い傾向がみられた。
- IgA産生細胞数を比較した結果、IgA 産生細胞数は、CCL25 添加群では多く見られたが、コントロール群ではほとんど見られなかった。

Shizuoka University

考察

- 乳汁中の CCL25 によって、新生仔の成長および免疫器官や免疫機能の発達が促進されることが判明した。
- 乳汁中の CCL25 が腸管から吸収され、リンパ液あるいは血液を介して脾臓や胸腺にも作用して、これらの免疫器官の発達を促進していることが示唆された。
- CCL25による小腸でのパイエル板の発達促進は、CCL25による直接的な作用と乳汁中の CCL25 による小腸へのリンパ球の誘引作用の両方の要因によって促進された可能性が考えられた。
- 乳汁中の CCL25 が、生後10日目までの小腸内での IgA産生細胞の誘引に必須であることが判明した。
- これらの結果から、CCL25 は、腸管の形成、例えば、腸管そのものはもちろんのこと、栄養吸収機能にかかわる腸絨毛などの発達にも関与する可能性が考えられた。

Shizuoka University

ヒト母乳中のCCL25含有量の分析

Shizuoka University

方法

研究対象

- ①静岡済生会病院に出産のために入院している妊産婦 (初産婦:14人、経産婦:14人)
- ②正常分娩で出産した、特定の疾病を持たない妊産婦

ヒトの母乳試料の採取

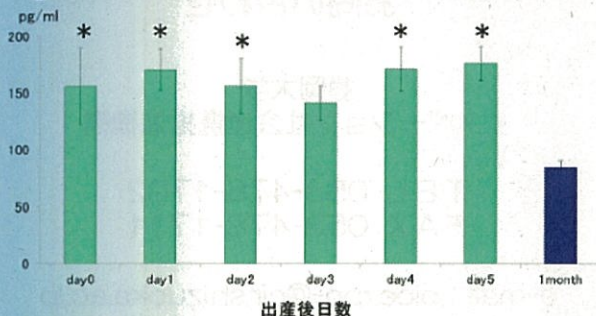
出産日を0日目として、0~5日目(初乳)と1ヶ月目の母乳(常乳)を採取し、冷凍保存

乳汁を15000rpm、4°Cで5分間遠心し、乳清のみを採取
乳清1 mL中のCCL25の含有量をELISA法によって分析

Shizuoka University

結果

①母乳中CCL25の含有量(採取日ごとの平均)

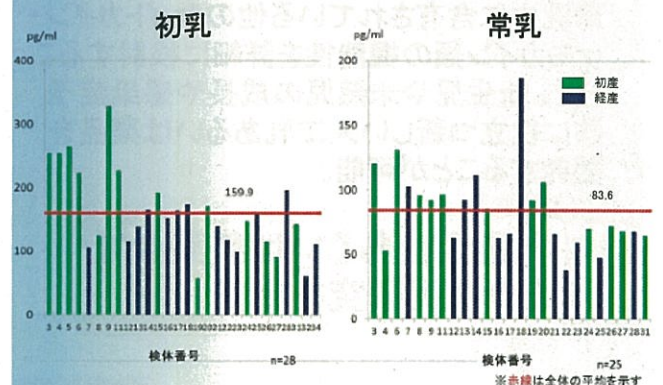


★ 出産日をday0として、出産後の日数を表す。

*1 monthと比較して有意差あり($P < 0.05$)

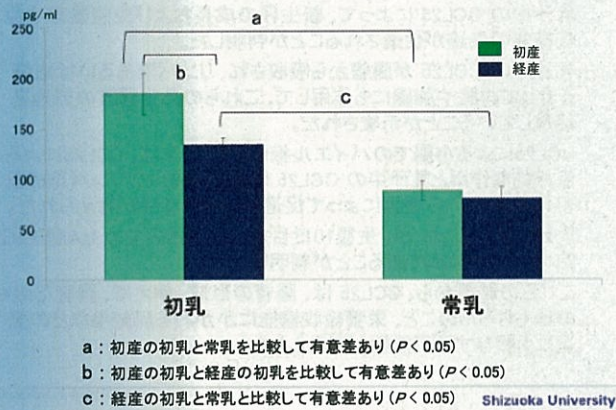
Shizuoka University

②母乳中CCL25含有量(個人差)



※赤線は全体の平均を示す

③初産・経産の初乳・常乳中CCL25含有量



結果のまとめ①

ヒト母乳中のCCL25

- 個人差が大きく、初乳と常乳ともに全平均量の約2倍、あるいは約1/2倍の含有量が測定された母親がいた。
- 初乳中のCCL25含有量は、初産婦と経産婦のどちらも常乳中の含有量と比べて有意に高かった。
- 初産婦の初乳のCCL25含有量は経産婦の初乳のCCL25含有量より有意に高かった。しかし、常乳では両者に差がなかった。
- 粉ミルクにはCCL25はまったく入っていない。

Shizuoka University

結論

- 1、母乳哺育の重要性の再認識
- 2、粉ミルクにCCL25を添加することで、新生児の成長や免疫機能の発達をより高める新たな商品の開発が可能。
- 3、未熟児用の成長・免疫機能促進剤として、CCL25を薬品として開発できる可能性あり。
- 4、CCL25添加粉ミルクを発展途上国の新生児に飲ませることで、その死亡率抑制が可能。

Shizuoka University

ウシの母乳(牛乳)中にもCCL25が存在していることを確認

→ ウシのCCL25をヒトの人工乳の添加剤として利用できるかどうかを検討

↓
 ヒトでの臨床試験によってその有効性を確認(浜松医科大学産婦人科教室との共同研究で、検討する予定)

Shizuoka University

母乳中に含有されている他のサイトカイン・ケモカイン類の機能性を詳細に検討することで、新生児や未熟児の成長や感染症予防に役立つ新しい人工乳あるいは薬品を開発することが可能。

乳業会社あるいは製薬会社との共同研究を希望

Shizuoka University

お問い合わせ

静岡大学
 イノベーション社会連携推進機構

TEL 053-478-1702
 FAX 053-478-1711

e-mail : bioexpo-@cjr.shizuoka.ac.jp

Shizuoka University