

乳清中の LPS/TLR 4 シグナル抑制分子の検索

横山 嘉子^{*1} 藤原 しのぶ^{*2} 岩崎 有希^{*3} 白石 弘美^{*4} 加納 和孝^{*5}

Research of LPS/TLR4 Signal Transduction Suppressor Molecules in Cow Whey

YOKOYAMA, Yoshiko, FUJIHARA, Shinobu, IWASAKI, Yuki,
SHIRAISHI, Hiromi and KANO, Kazutaka

要旨

【目的】本研究では牛乳清中の LPS/TLR 4 シグナル抑制分子の検索を目的とした。【方法】TLR 4/CD14/MD2-HEK293 細胞及び RAW264.7 細胞を用い、LPS/TLR 4 シグナルに対する乳清の阻害効果を調べた。【結果】乳清溶液では、LPS/TLR 4 シグナルを介した、TLR 4/CD14/MD2-HEK293 細胞での SEAP 発現、及び RAW 264.7 細胞接着の阻害が確認された。さらに、Superdex 75 10/300 GL クロマトグラフィーにより、LPS 刺激で誘導される TLR 4/CD14/MD2-HEK293 細胞の SEAP 発現、及び RAW264.7 細胞からの TRAP 陽性多核巨細胞の形成を抑制する、proteinase K 感受性の分子量約 7,000 の画分が得られた。【結論】乳清中に、従来報告のない分子量約 7,000 の LPS/TLR 4 シグナル抑制分子の存在を見出した。

キーワード

乳清、Toll 様受容体 4 (TLR 4)、抗炎症性、破骨細胞

Abstract

【Objective】The purpose of this study was to research LPS/TLR 4 signal suppressor molecules in cow whey. 【Procedure】TLR 4/CD14/MD2-HEK293 and RAW264.7 cells were used to examine the inhibitory effect of whey on LPS/TLR 4 signal transduction. 【Results】In whey lysates, inhibition of SEAP expression in TLR 4 / CD14/MD2-HEK293 cells via LPS /TLR 4 signals, as well as inhibition of RAW264.7 cell adhesion via LPS/TLR 4 signals was confirmed. Furthermore, Superdex 75 10/300 GL chromatography yields a proteinase K sensitive fraction with a molecular weight of approximately 7,000 that suppresses LPS stimulated expression of SEAP in TLR 4/CD14/MD2-HEK293 cells and also suppresses LPS stimulated formation of TRAP-positive multinuclear giant cells from RAW264.7 cells. 【Conclusion】In this study, we discovered the existence of LPS/TLR 4 signal suppressor molecule of about 7,000 in cow whey.

Key words

whey, Toll-like receptor 4 (TLR 4), anti-inflammatory, osteoclasts

I. 緒論

牛乳は、栄養学的機能に優れているだけでなく、抗炎症作用、免疫賦活作用、血圧降下作用、抗酸化作用 (Hillら, 2015, Suraiら, 2019) などの生体調整機能をもつことが報告されている。母乳では感染や炎症から新生児を保護し、腸の健全な微生物定着、免疫成熟、臓器発達に貢献する (Ballard ら, 2013)。このことから、乳における数々の機能の中でも抗炎症性成分に着目した乳成分及びその作用機作に関する多くの研究が展開されてきた。最近、乳成分の抗炎症作用は、Toll様受容体 (Toll like receptor: TLR) 情報伝達経路の抑制が関与することが報告された (Heら, 2016)。TLRは、先天性免疫系の主要なパターン

認識受容体であり、病原体関連分子パターン (PAMP) の広い範囲を認識する (Akiraら, 2004, Medzhitov, 2001)。これまでにヒトでは11種類のTLRファミリーが同定されている (Akiraら, 2004)。

ところで、歯周病は、歯と歯肉の境目 (歯肉溝) への歯周病原細菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患で、歯周病原細菌の細胞壁の構成成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) がその発症に深く関わっている (Hienzら, 2015)。破骨細胞は、その前駆細胞同士が融合した巨大な多核細胞であり、口腔内では歯周病による骨組織破壊や骨吸収を担っている。破骨細胞の分化・形成は、RANKL (receptor activation of NF- κ

*1: 聖徳大学人間栄養学部人間栄養学科・准教授／*2: 聖徳大学人間栄養学部人間栄養学科・准教授／

*3: 人間総合科学大学人間科学部健康栄養学科・助教／*4: 人間総合科学大学人間科学部健康栄養学科・教授／

*5: 元聖徳大学人間栄養学部人間栄養学科・教授

B ligand) 産生細胞と破骨細胞前駆細胞がもつ受容体RANKが結合することにより行われる。LPSは破骨細胞前駆細胞に直接作用して、破骨細胞の形成を促進する。マウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞において、RANKLで前処理した後にLPS刺激を行うと、破骨細胞が形成されることが報告されている(白井ら, 2015)。LPSはTLR 4の良く知られたリガンドの1つであり、コレプター、可溶性CD14を介してTLR4/MD2複合体と結合し下流のシグナルを活性化(Plóciennikowskaら, 2015)。歯周病では歯周病菌に由来するLPSがTLR4を介して、破骨細胞を活性化し歯根を破壊し歯の脱落を起こす。従って、歯周病は、TLR 4情報伝達系の阻害物質により、予防、軽減ができる可能性が生じる。

乳清は、チーズの生産時に酸や酵素を加えてカードとしてカゼインとそれに結合するカルシウムとリン酸を凝固させた後の液体成分である。乳の生理機能成分の内、乳特有な β -ラクトグロブリン(全乳清たんぱく質の45%)、 α -ラクトアルブミン(同20%)、ラクトフェリン、血中と同じ免疫グロブリン(同13%)などの主要なたんぱく質の他に、リゾチーム、パーオキシダーゼなど多くの酵素が乳清に移行していると考えられており、乳清画分に含まれる生理機能成分を加工・抽出し、高齢者あるいはアスリート向けの栄養食品としての利用が高まっている(桑田, 2012)。抗炎症作用をもつ乳清たんぱく質としては、これまでにトランスフェリンが報告されている(Heら, 2016)。トランスフェリン以外にも抗炎症性分子の存在を示唆する報告があるが(Chattertonら, 2013)、その同定及びそのメカニズムに関して十分な解析が行われているとは言い難い。

今回、我々は、乳清中のLPS/TLR 4系をターゲットとした抗炎症性成分の検索を行い、歯周病軽減予防に寄与することを目的とした。

II. 方法

1. 実験材料

乳清は(株)自然健康社より購入し、0.15 M NaCl及び5%グリセリンを含む10 mM HEPES緩衝液(pH 7.2)に、10 mg/ml(たんぱく質当量)になるように溶解した。E.coli 由来LPSは富士フィルム和光純薬から、TLR 4の特異的阻害剤TAK242はChemscene社より、TLR 4/CD14/MD 2 遺伝子導入ヒト胎児腎細胞(TLR 4/CD14/MD2-HEK293細胞)、Balb/cマウスマクロファージ由来RAW 264.7細胞はNovus Biologicals、Public Health Englandよりそれぞれ購入した。

2. 細胞培養

TLR 4/CD14/MD2-HEK293細胞は、非働化した10% FBS(Moregate)と1 x Antibiotic-Antimycotic(Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml 及びFungizone 0.25 μ g/ml; Gibco)

を含むDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco)を用いて、37°C、5%CO₂条件下で培養を行った。TLR 4/CD14/MD2-HEK293細胞は、全長ヒトTLR 4、ヒトMD 2、ヒトCD14遺伝子と、NF- κ B応答配列の下流に分泌型アルカリホスファターゼ(Secreted alkaline phosphatase: SEAP)を挿入した遺伝子をコトランスフェクトした細胞である。TLR 4、MD 2、CD14を安定発現させた細胞で、TLR 4シグナルの活性化により、NF- κ Bを介して発現するSEAPが培養液中に分泌される。レポーター遺伝子であるSEAPの培養液中の活性を測定することにより、LPSによるTLR 4シグナルの活性化に対する乳清の抑制効果を評価した。SEAPを用いたレポーターアッセイには、100 μ l/wellの培地が入った96-well plate(Falcon)に 1.2×10^6 個の細胞を播種し、16時間後に、乳清溶液、LPS 10ng/mlをそれぞれ添加し、24時間インキュベートした。

RAW264.7細胞の培養には、10% FBSと1 x Antibiotic-Antimycoticを含むDMEMを用いた。形態の観察用に300 μ l/wellの培地が入った48-well plate(Falcon)に 3.0×10^5 個の細胞を播種し、4時間後に、LPSを添加し、2日間インキュベートした。TRAP染色による観察には、5日間インキュベートした。

3. SEAPアッセイ

SEAPアッセイはラポアッセイ ALP(富士フィルム和光純薬)を用いた。測定操作については、製造者のプロトコールに従って行った。SEAP活性は、LPS 10ng/mlにより誘導されるSEAP活性を100%として算出した。10ng/mlのLPSは、LPSに誘導される最大活性の約50%のSEAP活性を誘導した。Superdex 75画分のSEAP阻害活性は、たんぱく質1 μ gあたりに補正した。たんぱく質濃度の測定は、DCプロテインアッセイ(BIO-RAD)を用いた。フラクション17に対してproteinase K(Thermo Scientific)を25 μ g/ml(20mM Tris-HCl, pH7.2)の濃度で37°C 30分間処理し、さらに95°Cで10分間、proteinase Kを失活した後に活性を検証した。proteinase K処理ではSEAPアッセイを考慮してSDSは加えていない。

4. Superdex 75 10/300 GL(Superdex 75)による乳清の分画

500 μ lの乳清溶液をSuperdex 75(GE Healthcare Bio-Sciences AB)にアプライして20mM Tris-HCl(pH7.2)、0.15M NaCl溶液で溶出した。流速は0.5ml/minとし、0.5mlの分画を集めた。たんぱく質は280nmでモニターした。HITACHI L-7100ポンプ、L-7405検出器、D2500 Chromato-integratorデータ処理装置を用い、すべての溶液はオートクレープで滅菌した。フラクション17の分子量は、標準物質のKav値を求め、検量線を用いて算出した(高久ら, 2008)。検量線は3回の実験の結果である。Kav=(溶出体積)-(排除体積)/(ベッド体積)-(排除体積)

5. TRAP染色と形態観察

マウス由来RAW264.7細胞では、LPS誘導性TLR 4 シグナルにより、破骨細胞に特徴的な酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) 陽性多核巨細胞へと変化することが示されている (Islamら, 2007, Odkhuiら, 2015)。従ってTRAP陽性多核巨細胞を検出することで破骨細胞の分化を検証できる。

TRAP染色Kit(コスモ・バイオ)を用い染色後、顕微鏡下で観察した。染色はキットのプロトコールに従って行った。

6. 統計

測定結果は平均±標準偏差で表示した。各群間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramerの多重比較検定を用いて検定し、 $p<0.05$ を有意差ありとした。ソフトはエクセルアドインソフトStatcel 3を使用した。

Ⅲ. 結果

1. 乳清溶液のTLR 4 シグナル抑制効果

最初に、TLR 4 /CD14/MD2-HEK293細胞を用いてSEAPレポーターアッセイを行い、乳清溶液の影響を検討した。TLR 4 /CD14/MD2-HEK293細胞の培養液に種々の濃度の乳清溶液を添加し、30分後にLPSを添加後、培養上清に分泌されたレポーターたんぱく質であるSEAP活性の測定を行った。図1に示すように、培養上清中のLPSに誘導されたSEAP活性は、乳

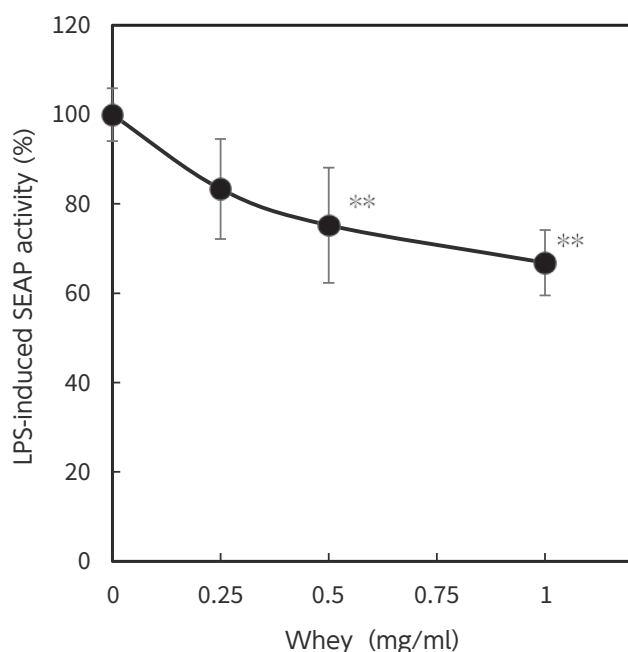


図1 TLR 4 /CD14/MD2-HEK293細胞におけるLPS誘導性SEAP活性に対する乳清溶液の効果

TLR 4 /CD14/MD2-HEK293細胞の培養液に乳清溶液を添加し、LPSで刺激した。24時間後、培養上清のSEAP活性を測定した。** $P<0.01$; コントロールとの比較

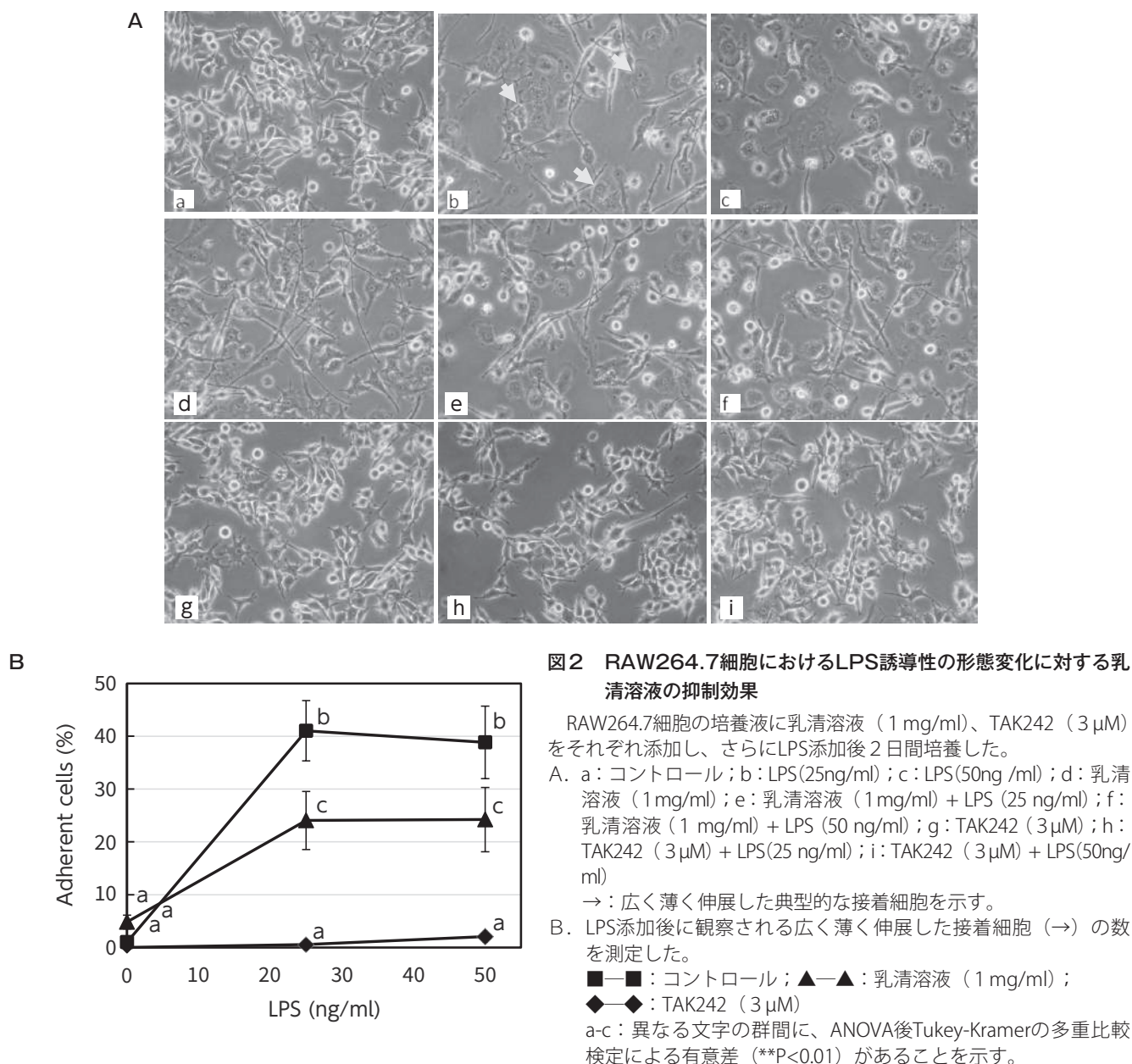
清溶液の濃度依存的に低下し、0.5mg/ml及び1 mg/mlで有意 ($P<0.01$) に抑制された。1 mg/mlの濃度の乳清の存在下ではSEAP活性はコントロールの $66.8\pm 7.3\%$ であった。

次に、RAW264.7細胞を用いてLPS刺激による破骨細胞への分化過程における乳清溶液の影響を培養後の形態変化の観察により検討した。RAW264.7細胞はマウスのマクロファージ由来のsemi-adherentタイプの細胞株であり、通常の培養条件では浮遊細胞、ゆるく接着した細胞及び接着した細胞が混在する。破骨細胞への分化の初期過程でディッシュの器壁への接着性が増し、さらに分化すると多核細胞へと変化する (Kongら, 2019)。培養2日目の細胞を図2 Aに示す。LPS 25ng/ml、50ng/ml存在下では、広く薄く伸長した細胞の出現が観察された (図2 A b,c)。コントロール群のLPS無添加において、このような細胞の割合は全細胞数の $1.6\pm 0.6\%$ と少なかったが、LPS 25ng/mlの添加で有意に増加し ($p<0.01$)、その出現頻度は $41.1\pm 5.7\%$ であった。LPS 50ng/mlの出現頻度は $38.9\pm 6.9\%$ であり、LPS 25ng/ml群との差は認められなかった (図2 B)。→で示した細胞の形態変化にみられるLPSの接着促進効果は、乳清溶液存在下では有意に抑制された ($p<0.01$)。すなわち、乳清溶液群では、LPS 25ng/ml、LPS 50ng/ml添加において、→のような形態を示す細胞の出現頻度が $24.1\pm 6.3\%$ 、 $24.2\pm 6.1\%$ であり、それぞれ同濃度のLPSを添加したコントロール群と比較すると有意に低下した。TLR 4 シグナルの特異的阻害剤、TAK242 3 μ M存在下では、LPS 25ng/ml (図2 Ah)、50ng/ml (図2 Ai) を添加しても、図2 Ab,cの→で示すような接着細胞の増加は観察されず、それぞれのコントロール群と比較すると、有意に抑制された ($p<0.01$) (図2 B)。

乳清のみを添加した場合 (図2 Ad) は、コントロールの無添加群 (図2 Aa) よりも、ゆるく接着している細胞が多く観察された。しかし、これらの多くはコントロール群のLPS無添加群 (図2 Aa) においても観察されるものであり、LPSに誘導される形態 (→) とは異なっていた。また、LPS無添加群のそれぞれの群間では有意な差は認められなかった。

2. Superdex 75カラムを用いた乳清溶液の分画

乳清溶液についてSuperdex 75ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。図3 Aに分画パターンを示す。TLR 4 /CD14/MD2-HEK293細胞を用いてLPS誘導性SEAP抑制活性 (比活性) を測定したところ、フラクション17に強いSEAP抑制活性が検出された。フラクション17は、リボヌクレアーゼより小さく、アプロチニンよりやや大きな分子量をもつ画分であり、標準物質より見かけの分子量は約7,000と推定された (図3 B)。また、フラクション24に3をピークとするSEAP抑制活性も検出された。フラクション24は排除体積に相当する。画分あたりの総活性は、フラクション2-4に最も多く分布し、次いでフラクシ



ン17、さらにフラクシオン11で検出された。今回我々はフラクシオン17に着目し、proteinase Kで処理したところ、無処理の画分に比べて活性は約35%に低下していた。95℃、10分間の加熱ではSEAP抑制活性に影響を及ぼさなかった。

3. RAW264.7細胞におけるフラクシオン17の分化抑制効果

RAW264.7細胞をLPSで分化誘導し、破骨細胞のマーカー酵素であるTRAP染色を行いTRAP陽性多核巨細胞の形成を指標として、フラクシオン17の破骨細胞分化抑制作用を評価した。コントロール群ではTRAP陽性細胞が認められなかったが、LPS群及びLPS+フラクシオン17群では、ほぼすべての細胞がTRAP陽性細胞であった。また、LPS群及びLPS+フラクシオン17群には、多核細胞と単核細胞が認められた（図4 A）。→で示すTRAP陽性多核巨細胞の割合は、LPS群で25.2±5.0%、

LPS+フラクシオン17群では12.0±4.5%で、有意（p<0.01）にフラクシオン17の抑制効果が観察された（図4 B）。フラクシオン17のみを添加したRAW264.7細胞では、コントロールとの差は認められなかった（data not shown）。図4 Aに示すようにコントロール群のRAW264.7細胞の大きさは、LPS添加により大きくなっていた。

IV. 考察

本研究では、TLR 4/CD14/MD2-HEK293細胞を用いたレポーターアッセイを行い、乳清中にLPS誘導性TLR 4シグナル抑制活性があることを確認した（図1）。さらにゲルろ過クロマトグラフィーによる分画から、分子量約7,000（図3）のLPS/TLR 4シグナル抑制分子の存在を明らかにした。加えて、LPS/TLR 4シグナル依存的な分化能を有するRAW264.7細胞

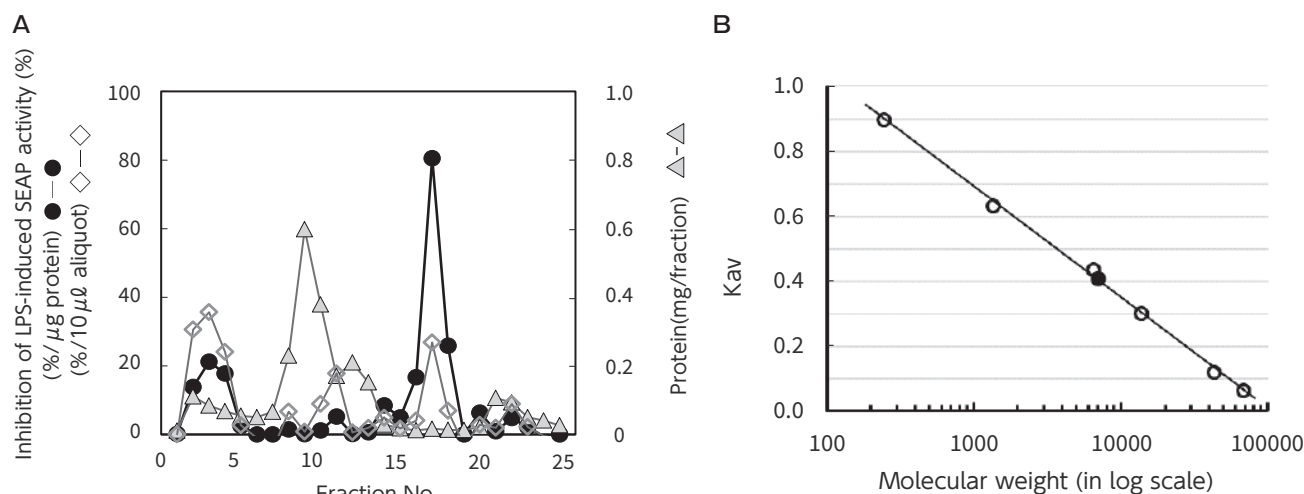


図3 Superdex 75カラムクロマトグラフィー

- A. 乳清溶液（5 mgたんぱく質/500 μ l）を20mM Tris-HCl (pH7.2)、0.15 M NaCl溶液で平衡化したSuperdex 75カラムにアプライした。同じ緩衝液で、0.5ml/minの流速で溶出し、13分後から1分毎に分画を行った。各分画について、TLR 4/CD14/MD2-HEK293細胞を用いたレポーターアッセイ及びたんぱく質定量を行った。
 ●—●：LPSに誘導されるSEAP活性に対する阻害/たんぱく質（%/μg）；◇—◇：LPSに誘導されるSEAP活性に対する阻害/画分（%/10 μ l）；▲—▲：たんぱく質量（mg/画分）
- B. 検量線
 ●：フラクション17
 ○：標準物質 分子量の大きい順から、BSA(67,000)、オボアルブミン（43,000）、リボヌクレアーゼ（13,700）、アプロチニン（6,512）、ビタミンB₁₂（1,400）、シチジン（243）

を用い、乳清、及び約7,000の分子が、破骨細胞への分化過程を抑制することを見出した（図2、4）。

図1に示すように、TLR 4/CD14/MD2-HEK 293細胞で、乳清のLPS/TLR 4シグナル抑制活性を確認した。乳清0.5-1mg/mlで約30%前後の抑制効果が認められた。Araújoら（2017）は、LPS(100ng/ml)刺激RAW264.7細胞におけるTLR 4依存的なNO産生をヤギ乳清が0.1-100 μ g/mlの濃度で抑制すること、すなわちTLR 4抑制分画が存在することを報告している。

図2では、RAW264.7細胞の接着促進作用を指標に乳清のLPS/TLR 4シグナル抑制効果を評価した。Islamら（2007）は、semi-adherentタイプのRAW264.7細胞を100ng/mlの濃度のLPSで刺激後3日間培養すると、器壁に接着した面積の広いTRAP陽性多核巨細胞が、約20%出現することを報告している。図2では、骨芽細胞への分化過程に出現する器壁に薄く広がる巨細胞の数を測定した。LPS処理で観察される広く薄く伸展した接着細胞は、TLR 4特異的阻害剤TAK242の存在下では観察されなかったことから、LPS/TLR 4シグナル依存的な形態変化であり、破骨細胞への分化過程の初期と考えられる。このような細胞の出現が乳清溶液存在下では有意に抑制されたことから、乳清は、破骨細胞前駆細胞の分化を抑制することが示唆された。

これまでに、牛乳及び母乳中にTLR 4シグナル抑制分子と

して、糖たんぱく質のラクトフェリン（分子量75,000~90,000）、ラクトアドヘリン（分子量46,000）、可溶性CD14（分子量48,000）、オリゴ糖の2'-GL、牛乳での確認はされていないが、可溶性TLR 4（分子量90,000、78,000、54,000、44,000）が報告されている（Heら, 2016）。ラクトフェリンは乳清たんぱく質で、LPSに結合して、TLR 4へのLPSの結合を阻害することが示されている（Drago-Serranoら, 2012）。ラクトアドヘリン、可溶性CD14は、乳脂肪球膜に存在するたんぱく質である（Chattertonら, 2013）。

図3に示すようにLPS/TLR 4シグナルを阻害する活性（比活性）は、排除体積に相当する高分子量の画分（フラクション2-4）と約7,000相当のフラクション17に検出された。フラクション2-4にみられるTLR 4シグナル抑制効果は、ラクトフェリンあるいは、可溶性TLR 4の作用によると推定される。フラクション17をピークとする約7,000の画分については、これまで特定されている物質の分子量と一致しない。乳清中にラクトフェリンあるいは可溶性TLR 4と考えられる分画が本研究においても認められたが、従来、報告されていない、分子量約7,000のLPS/TLR 4シグナル抑制物質がある可能性が示された。この分画をproteinase Kで処理すると活性の低下が認められることから本物質はたんぱく質（ペプチド）であると考えられる。このことは非常に興味深く、フラクション17の精製・同定が今後の課題である。また、総活性ではSEAP抑制活性がフラク

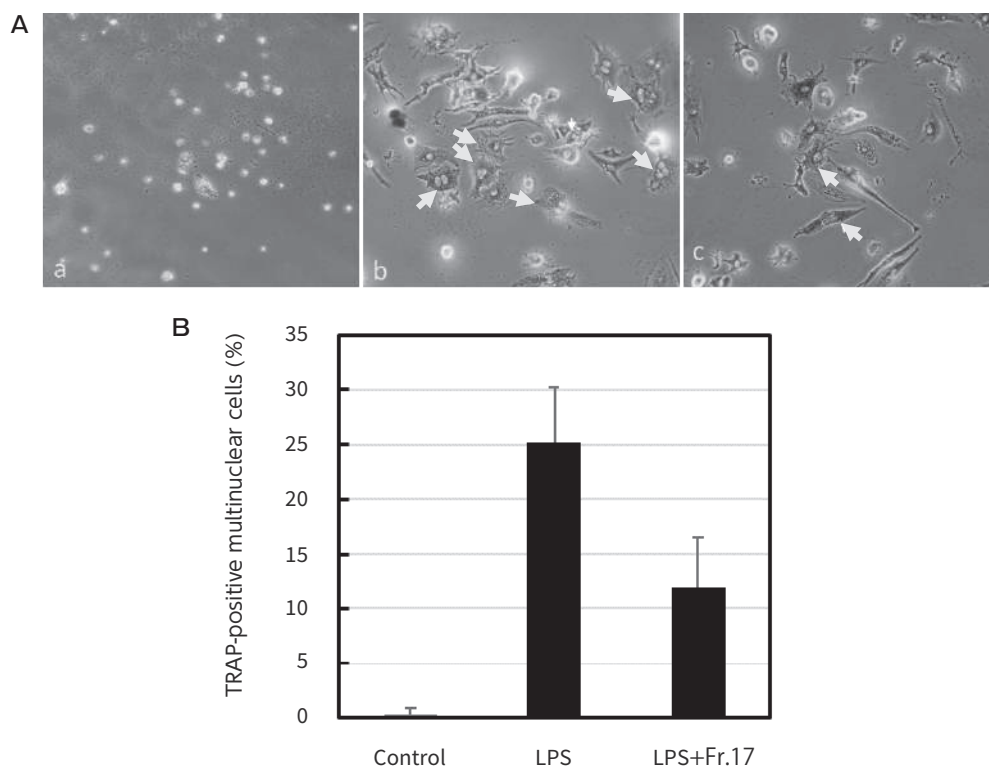


図4 RAW264.7細胞におけるLPS誘導性の分化に対するSuperdex 75分画の効果

RAW264.7細胞の培養液にフラクシオン17 (3.3μg/ml)、LPS(100ng/ml) を添加して、5日間培養後にTRAP染色を行った。

A. a: コントロール; b: LPS(100ng/ml); c: フラクシオン17 + LPS(100ng/ml)
→: TRAP陽性多核巨細胞

B. TRAP陽性多核巨細胞の数を測定した。

a-c: 異なる文字の群間に、ANOVA後Tukey-Kramerの多重比較検定による有意差 (**P<0.01) があることを示す。

ション17に次いでフラクシオン11にも検出された。分子量が約27,000に相当するこのフラクシオンについても、既知物質の報告と一致が見られないことから、物性及び生物活性について更なる解析が必要である。

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーはたんぱく質などの精製だけでなく、相対分子量の測定にも用いることができる (高久ら, 2008)。Superdex 75の最適な分離範囲は、製造会社のマニュアルでは3,000-70,000と記載されている。高久ら (2008) に従い、標準物質のKav値を分子量に対してプロットし、フラクシオン17の分子量を算出したところ、分子量67,000 (BSA)~243 (シチジン) の範囲で直線性が得られ、この範囲内でプロットから求めたフラクシオン17の分子量は約7,000に相当した (図3B)。

さらにLPS/TLR 4シグナル抑制作用が認められたフラクシオン17について、破骨細胞前駆細胞の分化能に対する影響を調べたところ、その抑制作用が有意に認められた (図4)。先に述べたように、歯周病は、歯周病細菌の細胞壁のLPSが破骨細胞前駆細胞の分化や、破骨細胞の活性化を促進している。また、歯周病細菌の死骸のLPS分子は、血中に入り込み、LPS/TLR 4シグナルを介して慢性炎症を基盤とする生活習慣病を

増悪させることが報告されている (山崎, 2016)。したがって、歯周病菌のLPSの作用を抑制することはこれらの疾病予防対策を考える上で極めて重要な課題である。

今回用いた乳清は国産のホエイパウダーであり、保存料や着色料無添加の製品である。製品紹介によると、ホエイたんぱく質として、ラクトフェリン、ラクトアルブミン、ラクトグロブリン、免疫グロブリン、血清アルブミンが含まれる。今回の分画でもフラクシオン8-11に多くたんぱく質が溶出された (図3)。これらは製造過程で生じた高分子量のたんぱく質の分解産物であるか、低分子のペプチドの凝集体の可能性はある。

本研究は1社の市販の乳清を用いた実験結果である。現在国内乳業各社から複数の乳清粉末の供給を受け、分析を行っている。乳清調整過程の詳細は明確ではなく、今回見出した7,000付近の乳清分子が普遍的に存在するかについてはさらに検証が必要である。しかしながら、乳清にたんぱく質 (ペプチド) 性の従来、報告されていない抗炎症性物質が存在する可能性を示したことが本研究の意義であると考えられる。多くの疾病を引き起こすとされる歯周病の軽減及び予防を考える時に、本物質のTLR 4の情報伝達機構の阻害様式を解明することは重要であ

る。今後の展望として、今回の実験で見出された乳清中のTLR 4 情報伝達抑制物質がラクトフェリンなどと合わせて口中に保持されるサプリメントとしての開発が期待できる。

本研究は乳清中の抗炎症性の生理活性たんぱく質についての解析であり、乳清を用いた歯周病に対する新しい栄養学的なアプローチの礎となるものである。

影響. Kagaku to Seibutsu 54 (9), 633-639.

付記

本研究は、2018年度乳の学術連合「牛乳乳製品健康科学」学術研究の助成を受けた研究成果の一部である。

参考文献

- Akira, S., and Takeda, K.(2004)Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (7), 499-511.
- Araújo, D.F.S., Guerra, G.C.B., Pintado, M.M.E., Sousa, Y.R.F., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Araújo, R.F. Jr, Gálvez, J., Queiroga, R.C.R.E., and Rodriguez-Cabezas ME.(2017)Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice. *PLoS One.* 12(9), doi: 10.1371/journal.pone.0185382.
- Ballard, O.,and Morrow, A.L.(2013)Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* 60(1), 49-74.
- Chatterton, D.E., Nguyen, D.N., Bering, S.B., and Sangild, P.T.(2013)Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(8), 1730-1747.
- Drago-Serrano, M.E., de la Garza-Amaya, M., Luna, J.S., and Campos-Rodríguez, R.(2012)Lactoferrin-lipopolysaccharide(LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immuno-pharmacol.* 12(1), 1-9.
- He, Y., Lawlor, N.T., and Newburg, D.S.(2016)Human milk components modulate Toll-Like receptor-mediated inflammation. *Adv. Nutr.* 7 (1), 102-111.
- Hienz, S.A., Paliwal, S., and Ivanovski, S.(2015)Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J. Immunol. Res.* doi: 10.1155/2015/615486.
- Hill, D.R., and Newburg, D.S.(2015)Clinical applications of bioactive milk components. *Nutr. Rev.* 73(7), 463-476.
- Islam, S., C. Dagvadorj, J., Koide, N., Naiki, Y., Mori, I., Yoshida, and T., Yokochi, T. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells.(2007)*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360(2), 346-351.
- Kong, L., Smith, W., and Hao, D.(2019)Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: phenotype and stimuli. *J. Cell. Mol. Med.* 23 (5), 3077-3087.
- Medzhitov, R.(2001)Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2), 135-145.
- Odkhuu, E., Koide, N., Tsolmongyn, B., Jambalmaniin, U., Naiki, Y., Komatsu, T., Yoshida, T., and Yokochi, T. (2015)Involvement of redox balance in in vitro osteoclast formation of RAW 264.7 macrophage cells in response to LPS. *Innate Immun.* 21(2), 194-202.
- Plóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., and Kwiatkowska, K.(2015)Co-operation of TLR 4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 72(3), 557-581.
- Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I., and Juniper, D.T.(2019) Revisiting oxidative stress and the use of organic selenium in dairy cow nutrition. *Animals(Basel).* 9(7), pii: E462. doi: 10.3390/ani9070462.
- 白井通彦、花谷智哉、森谷友貴、佐野孝太郎、有吉渉、西原達次、中島啓介 (2015) 歯周病における骨破壊メカニズム～破骨細胞を形成・活性化する因子～. *日歯周誌*57 (32), 120-125
- 桑田有 (2012) 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 (2), 95-103
- 高久誉大、胡桃坂仁志 (2008) ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによるタンパク質の精製及び分子量決定. *蛋白質科学会アーカイブ.* e003, 1, 1-10.
- 山崎 和久 (2016) 歯周病と全身疾患の関連口腔細菌による腸内細菌叢への