

博士論文

腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果と
その作用機序に関する研究

2015年（平成27年）

小野知二

目次

略語表	P 3
序章	P 5
第1章 腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果 ～ヒト臨床試験～	P 19
序	P 20
試験方法	P 22
結果	P 27
考察	P 31
第2章 腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果の作用機序に関する検討	P 40
第1節 ラクトフェリンの体内動態	P 40
序	P 41
実験材料と方法	P 42
結果 ラクトフェリンを経口投与したラットの体内動態について	P 44
考察	P 47
第2節 脂肪細胞に対するラクトフェリンの作用	P 56
序	P 57
実験材料と方法	P 59
結果 1. ラクトフェリンの脂肪合成抑制作用について	P 64
2. ラクトフェリンの脂肪分解促進作用について	P 66
考察	P 70
総合討論および将来展望	P 91
参考文献	P 97
要旨	P 109
謝辞	P 112

略語表

LF : lactoferrin (ラクトフェリン)

eLF : enteric lactoferrin (腸溶性ラクトフェリン)

iLF : immunoreactive lactoferrin

TNF α : tumor necrosis factor α

PAI1 : plasminogen activator inhibitor-1

LPS : lipopolysaccharide

BMI : body mass index

CT : computed tomography

HDL : high density lipoprotein

LDL : low density lipoprotein

TL : total lipid

NEFA : non-esterified fatty acids

AST : aspartate aminotransferase

ALT : alanine aminotransferase

LDH : lactate dehydrogenase

ALP : alkaline phosphatase

γ -GTP : γ -glutamyl transpeptidase

BUN : blood urea nitrogen

CPK : creatine phosphokinase

CRP : C reactive protein

HbA1c : hemoglobin A1c

ANOVA : analysis of variance

ANCOVA : analysis of covariance

LRP1 : low density lipoprotein receptor-related protein 1

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein

HPRT1 : hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

BSA : bovine serum albumin

TF : transferrin

PBS : phosphate buffered saline

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

HSL : hormone-sensitive lipase (ホルモン感受性リパーゼ)

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

MAPK : mitogen-activated protein kinase

RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

序章

1. メタボリックシンドロームについて

メタボリックシンドローム (metabolic syndrome; 代謝症候群) とは、内臓脂肪型肥満 (内臓肥満・腹部肥満) に高血糖・高血圧・脂質異常のうち2つ以上を合併した状態をいう¹⁾。内臓脂肪が過剰に蓄積すると、糖尿病や高血圧症、脂質異常症といった生活習慣病を併発しやすくなると共に、動脈硬化症が急速に進行する。近年、摂取カロリーの増加、運動不足、ストレスの増加などの生活習慣の変調を背景に、メタボリックシンドロームの患者が急増し、大きな社会問題となっている。メタボリックシンドロームは元々米国を中心とした先進諸国での問題であったが、高カロリーなスナック菓子、ジュース類の輸出や、車社会の普及に伴い、その輪は日本のみならず、発展途上国にも広がりを見せ、もはや世界規模での問題となっている。そのような社会的背景の下、2008年4月より、「特定健康診査・特定保健指導」(通称:メタボ診断)が日本で施行され、メタボリックシンドロームは広く国民に認知されるようになった。メタボリックシンドロームの診断基準では、必須項目となる内臓脂肪蓄積(内臓脂肪面積100平方cm以上)のマーカーとして、ウエスト周囲径が男性で85cm、女性で90cm以上を「要注意」とし、その中で①血清脂質異常(トリグリセリド値150mg/dL以上、またはHDLコレステロール値40mg/dL未満)②血圧高値(最高血圧130mmHg以上、または最低血圧85mmHg以上)③高血糖(空腹時血糖値110mg/dL)、の3項目のうち2つ以上を有する場合をメタボリックシンドロームと規定している。

前述のように、内臓脂肪の蓄積はメタボリックシンドロームの根幹をなす原因と考えられている。従来、脂肪組織は単なるエネルギーの貯蔵組織と考えられていた。しかしながら、近年脂肪組織は、アディポネクチンなどの善玉アディポカイン(Adipokine:脂肪細胞が分泌するホルモン)や、TNF α 、PAI1などの悪玉アディポカインなど、多彩なアディポカインを産生する巨大な内分泌臓器であることがわかってきている。内臓脂肪の過剰な蓄積はアディポカインの分泌バランスに異常をきたすことから、内臓脂肪を適切にコントロールすることがメタボリックシンドロームの予防に非常に重要である。

2. ラクトフェリンについて

ラクトフェリン（以下 LF）は 1939 年に Sorensen らによって牛乳中から発見され、哺乳類の乳中に主に存在する分子量約 8 万の糖タンパク質である²⁾。ヒトでは母乳中に 2～4 mg/ml 程度含まれており、初乳ではさらに高濃度（6～8 mg/ml）含まれることが知られている（表 0-1）³⁾。乳以外でも、唾液、涙液、胆汁、膵液、尿などの分泌液中にも LF は含まれており、特に涙液中では 0.7～2.2 mg/ml と比較的高濃度含まれている（表 0-2）³⁾。トランスフェリンファミリーに属し、分子中に鉄を 2 原子含有しているため薄ピンク色を呈しており、赤いタンパク質（図 0-1）とも呼ばれている。LF の立体構造は Baker らによって解明されたが⁴⁾、その構造は N ロープと C ロープから構成されており、それぞれに鉄を 1 原子ずつ配位することができる（図 0-2）。LF は多機能性タンパク質として知られており、鉄分補給、抗菌作用、LPS 不活性化作用、抗ウイルス作用、免疫賦活作用、抗酸化作用、抗炎症作用、がん予防作用など⁵⁻¹²⁾、様々な機能を持つことが報告されている。商業的に流通している LF は牛乳からチーズを製造する際の副産物である乳清から、陽イオン交換樹脂を用いて製造される¹³⁾。この製造プロセスは 1980 年代半ばに確立され、当初は乳幼児向けの粉ミルクに配合され、腸内環境改善の目的で使用された。現在では粉ミルクのほかにヨーグルト、スキムミルク、サプリメントとして LF を配合した製品が様々な目的で販売されている。LF は乳中に存在し乳幼児が摂取することから安全性が非常に高いと考えられており、日本では食品添加物として、米国では GRAS（generally recognized as safe）に認定されている。

LF の機能研究が始まった当初は、感染防御の機能に注目が集まり、様々な微生物に対する静菌作用、抗菌作用が報告された。静菌作用については、微生物の増殖に必要な鉄をキレートするため作用が発揮されるものであり、抗菌作用についてはグラム陰性菌の外膜に存在する LPS との相互作用により菌体が崩壊することで作用が発揮されることが報告されている¹⁴⁾。特に抗菌作用については、胃の消化酵素であるペプシンによって切り出されたペ

プチドであるラクトフェリンが活性本体であることが報告されている¹⁴⁾。ラクトフェリンはN末端側に存在する15残基のアミノ酸から成り、鉄のキレート能は持たず、抗菌活性はLFの数十倍とも言われている。臨床研究では、大腸菌などの腸内病原菌¹⁵⁾、ピロリ菌¹⁶⁾、歯周病菌¹⁷⁾など、様々な病原菌の感染を抑制する作用が報告されている。

また、近年では感染防御以外にも様々な機能が報告されている。例えばPaesanoらは、鉄欠乏性貧血女性に対するbLFの有効性を、鉄剤(FeSO₄)と比較しており、bLF(100mg/twice/day)は血中の鉄、ヘモグロビン、フェリチン、赤血球などのパラメーターを改善するほか、炎症マーカーであるIL-6の濃度を下げることを確認した。逆に鉄剤(520 mg/day)は、LFほどの効果が認められないほか、IL-6についてはむしろ濃度が上昇しており、吐き気、便秘、腹痛などの副作用もあることから、決してベストな治療法ではないことを報告している¹⁸⁾。鉄欠乏症、貧血は特に妊婦に多く、発展途上国では56%、先進国でも14%程度が鉄欠乏性貧血であり、死産、早産、低体重児出産、新生児の死亡率等のリスクを上げるとも言われておりその予防は重要である。現在Lactoferrin in Anaemia of Pregnancy Collaborative Study Groupという研究グループがイタリア、オーストラリア、イギリスで形成されており、鉄欠乏性貧血妊婦を対象とした臨床研究を800名規模で実施する計画があり、結果次第では、国内で1000万人、全世界では20億人ともいわれる貧血患者のファーストチョイスになるかもしれない。

乳児に対するLFの応用では、壊死性腸炎や遅発性敗血症等に関する報告がある。壊死性腸炎未熟な腸管が分娩前後の低酸素状態、腸内細菌、ミルクの投与などにより障害を受け炎症、壊死や穿孔をおこす状態で、低出生体重の新生児に多くみられる。また遅発性敗血症は、体の発達が未熟で、白血球機能を含む感染防御機能が十分でないときに細菌が血液中で増殖した状態であり、同じく低出生体重の新生児に多くみられる。Manzoniらは、出生時体重1500g以下の472名の乳児をLF100mg群、LF100mg+乳酸菌(Lactobacillus GG 60億個)群、プラセボ群の3群に分けて臨床試験をした。その

結果、遅発性の敗血症の発症率は LF 群で 5.9%、LF+乳酸菌群で 4.6%、プラセボ群で 17.3%であり、LF、LF+乳酸菌群で有意に発症率を抑制した。また壊死性腸炎の発症率でも前述の 3 群でそれぞれ 1.9%、0%、6.0%であり、有意に発症率を抑制した¹⁹⁾。本報告後も引続き試験は推進中であり、800 名まで症例登録を増やし、重度の壊死性腸炎や死亡率を抑制できるか検討している。LF の作用機序については、腸内菌叢への影響や抗炎症作用などが考えられるが、特にビフィズス菌の増殖促進作用が重要なのではないかと考えられている。日本では年々早産、低体重児出産の傾向が強まっていることから、今後国内でも重要な課題になるかもしれない。

3. 腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果について

我々の研究グループでは、歯周病予防効果のある食品素材をスクリーニングする過程で、LF に歯周病原因菌由来 LPS に対する強い不活性化作用があることを見出したのが研究の発端であった (図 0-3, 0-4)²⁰⁾。一方、当時は歯周病が全身の健康にも影響を与えるという疫学調査が報告され始めた時期でもあり、歯周病原因菌由来 LPS がその仲介因子の一つとして考えられていた²¹⁻²³⁾。そこで、全身の健康に関するパラメーターについても留意して検討を進めていたところ、偶然にも LF がマウスの内臓脂肪を低減するという現象を発見した (図 0-5)²⁴⁾。内臓脂肪低減効果の発見を契機に、脂肪細胞に対する LF の作用を検討した結果、LF が脂肪の合成を抑制するという新しい知見を見出し、動物実験の結果を裏付けるデータを取得した²⁵⁾。しかしながら胃の消化酵素であるペプシンで分解した LF はその活性が消失することも明らかとなった。そこで、LF 腸溶錠 (胃で崩壊せずに小腸で崩壊する錠剤、すなわちペプシンによる分解を回避できる製剤 (図 0-6) に着目し、ライオン株において社内臨床試験を実施したところ、8 週間の摂取により、初期値と比較して有意な体重減少効果を見出し、とりわけ内臓脂肪面積の減少が顕著であることを確認した (図 0-7)。

4. 本論文の目的

本論文では、LFの内臓脂肪低減効果の科学的な立証と、その作用機序の明確化を目的としている。

社会的な問題となっているメタボリックシンドロームを予防するためには、内臓脂肪のコントロールが重要であり、そのためには食事と運動のバランスを保つなど、適切な生活習慣を続けることが有効な手段であると考えられているが、現代社会の中ではなかなか適切な生活習慣を続けることが困難なケースもある。そこで近年、一つの手段として機能性食品による内臓脂肪のコントロールが注目を浴びており、様々な食品成分による体重、体脂肪のケアが提案されている。しかしながら、中には明確なエビデンスがないものも存在しており、科学的なエビデンスに基づく機能性食品の開発が求められている。

前述のようにライオン(株)では社内試験により LFの内臓脂肪低減効果を確認した。本試験では社内のボランティアを被験者としたオープン試験であり、プラセボ効果を排除できていない。一方で LFの内臓脂肪低減効果はこれまで報告された事例がなく、本作用を科学的に立証できれば LFの全く新しい機能を発掘したことになり、更にはメタボリックシンドローム予防の新たな手段を提案することもでき、意義は大きい。そこで第一章では、社外にて二重盲検群間比較試験により LFの内臓脂肪低減効果を科学的に立証した結果について報告する²⁶⁾。また、機能性食品を開発する上でその作用機序を明確にすることは、エビデンスレベルを向上する上で、また安全性の面からも重要である。そこで第二章では、LFの内臓脂肪低減効果の作用機序として、LFの体内動態解析による作用部位の推定と、LFの脂肪細胞に対する作用についても併せて報告する^{25,27)}。

表0-1 乳中のLF濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

母乳	初乳	6,000 ~ 8,000
	常乳	2,000 ~ 4,000
牛乳	初乳	~ 1,000
	常乳	20 ~ 350

FOOD RESEARCH, 54-59 (2005)より引用

表0-2 ヒト分泌液中のLF濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

唾液	5 ~ 10
涙液	700 ~ 2,200
胆汁	10 ~ 40
腭液	500
尿	1
血液	0.1 ~ 2.5

FOOD RESEARCH, 54-59 (2005)より引用



図0-1 ラクトフェリン粉末および水溶液



図0-2 ヒトラクトフェリンの立体構造
E. Baker教授より提供

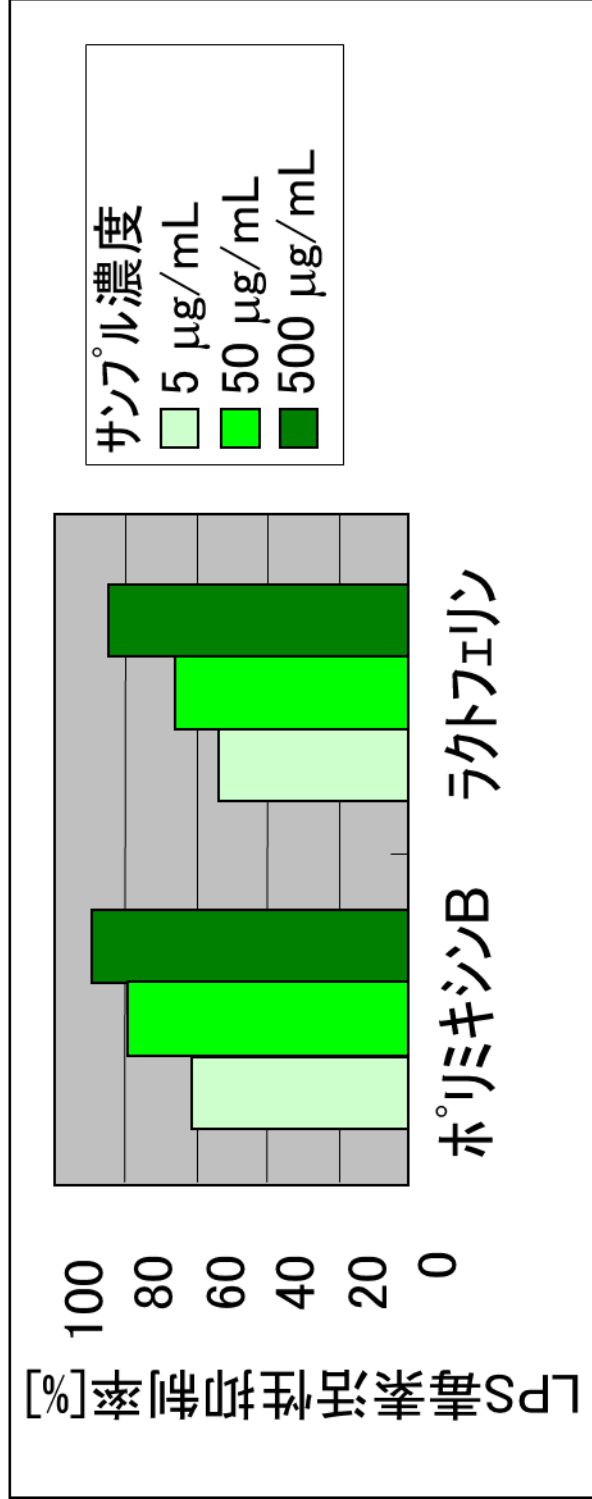


図0-3 ラクトフェリンの歯周病原菌由来LPS不活性化作用（リムルステスト）
 歯周病原菌である*Porphyromonas gingivalis*より熱フェノール法によりLPSを抽出。
 1 µg/mLのLPSと試験サンプルを混合し37°C、30分間インキュベート後、
 カプトガニの血球成分の凝固活性（リムルステスト）によりLPS毒素活性を測定。
 ポジティブコントロールとしてLPS阻害薬であるポリミキシンBの活性を測定した。

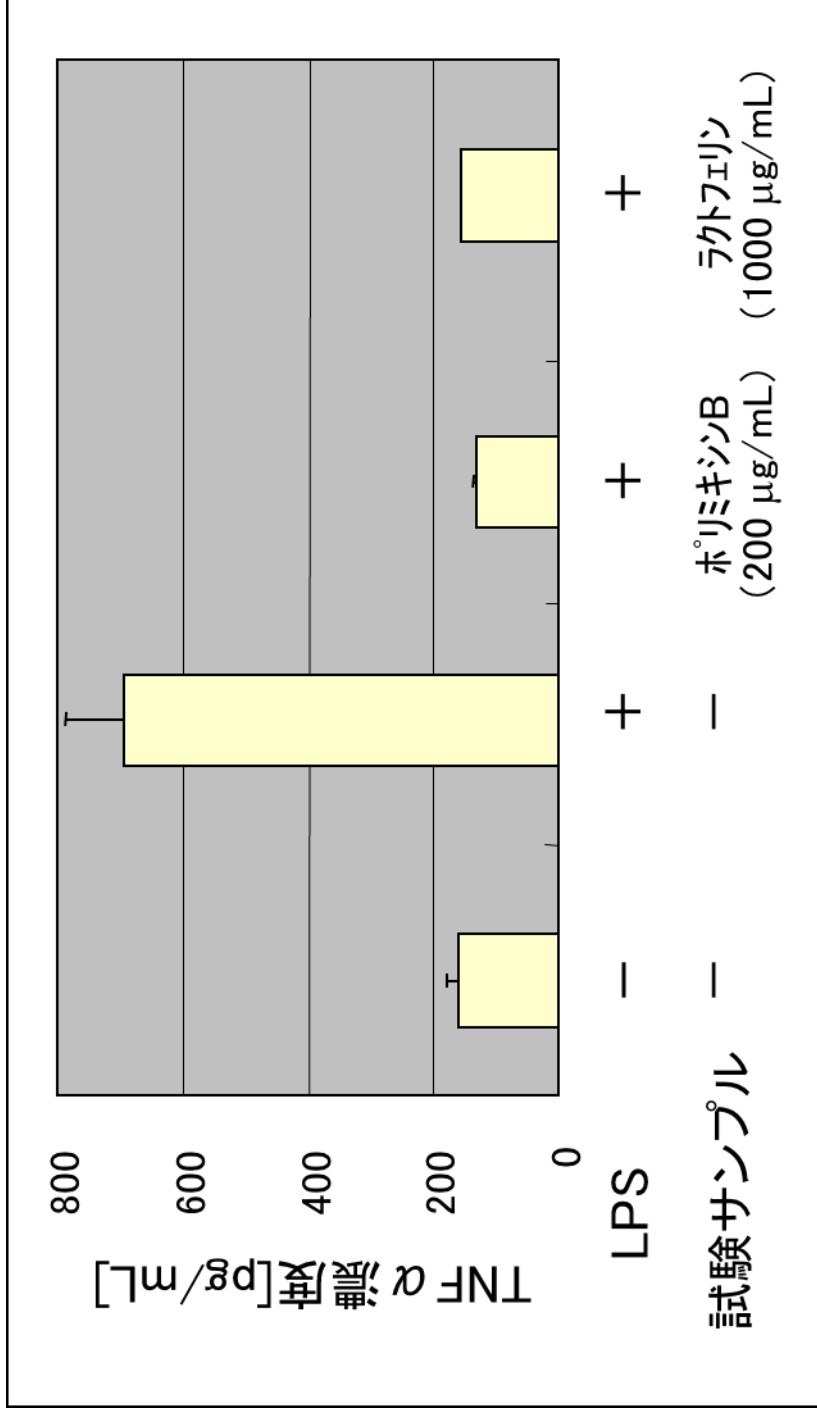


図0-4 ラクトフェリンの歯周病原菌由来LPS不活性化作用 (TNF α 産生抑制)
 歯周病原菌である*Porphyromonas gingivalis* より熱フェノール法によりLPSを抽出。ヒト単球細胞 (THP-1) を30 ng/mL のphorbol myristate acetate で48時間刺激してマクロファージ様細胞に誘導。その後、LPSと試験サンプルを添加して6時間培養後、培養上清を回収し、TNF α 濃度を測定した。

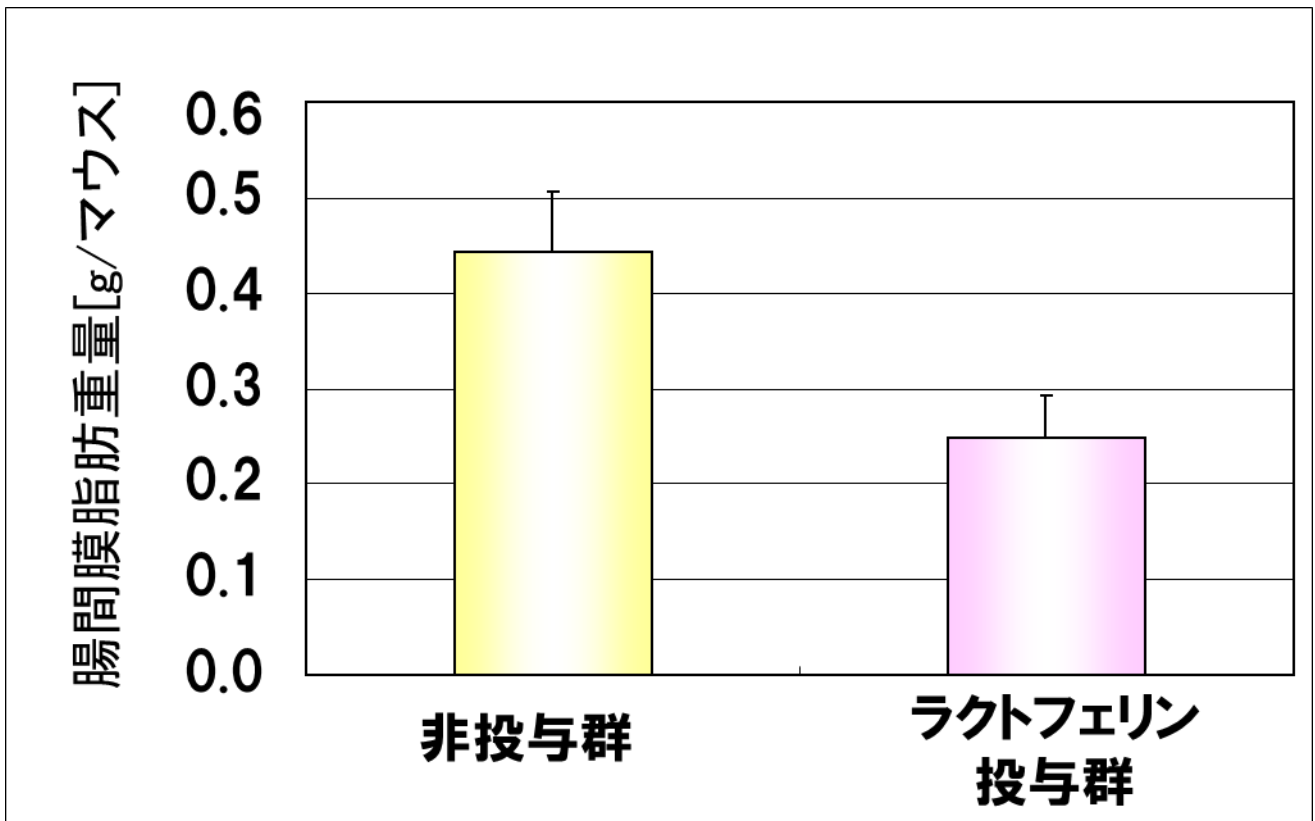


図0-5 ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果

ICRマウス（雄性、7週齢、各群n=8）にラクトフェリンを100 mg/day経口投与し4週間飼育後、腸間膜脂肪重量を測定した

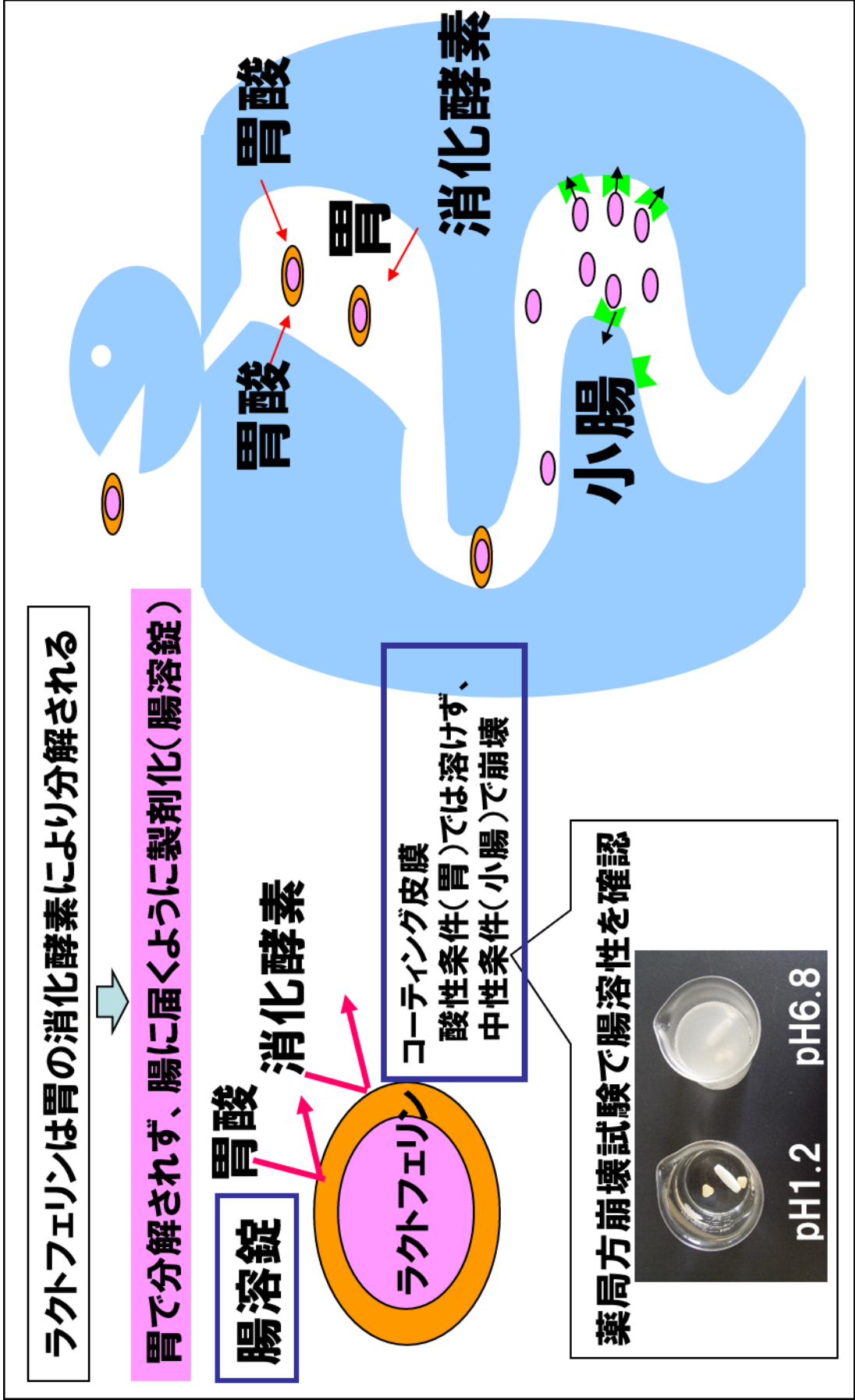
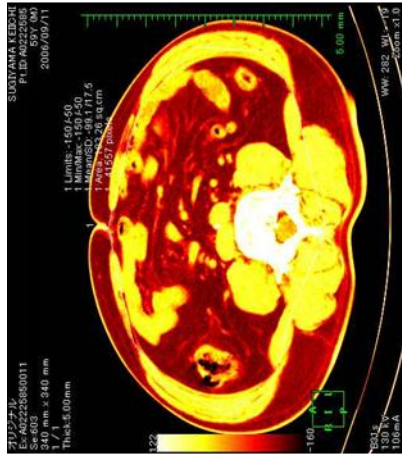
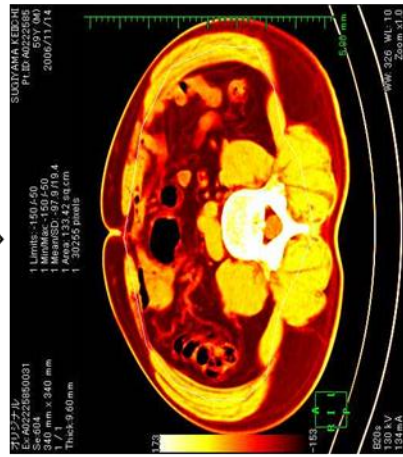


図0-6 ラクトフェリン腸溶錠



摂取前内臓脂肪面積

183.3 cm²



8週間後内臓脂肪面積

133.4 cm²(Δ 49.9 cm²)

著効例のCT断層撮影結果

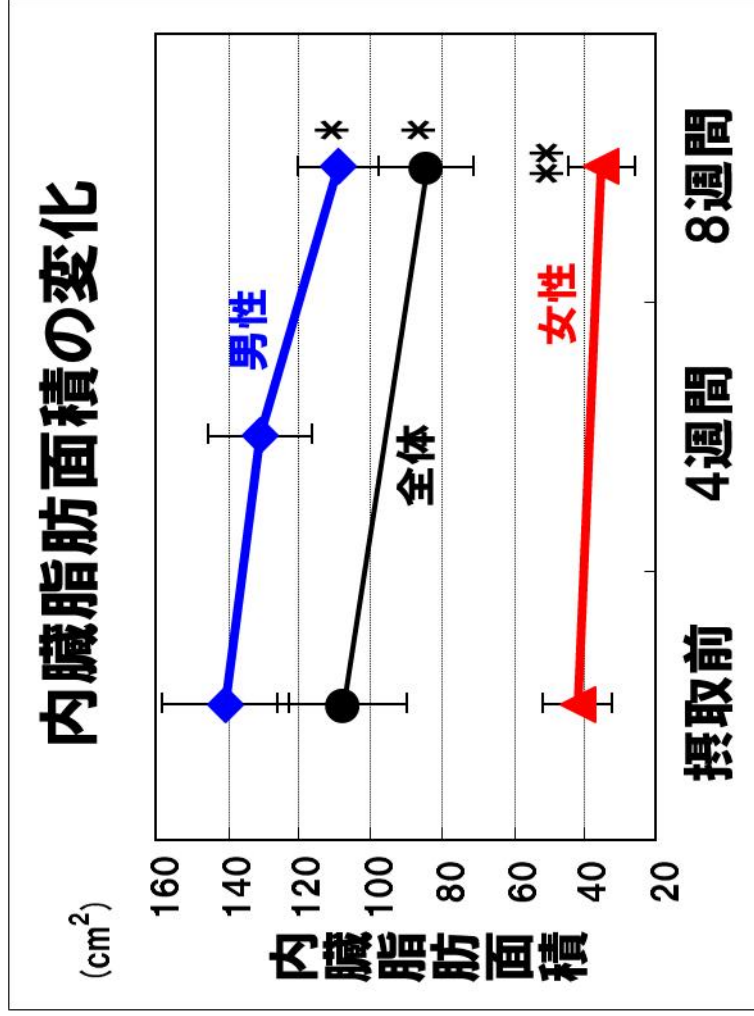


図0-7 ラクトフェリン腸溶錠の社内臨床試験
12名の社内ボランティア（男性8名、女性4名）にラクトフェリン腸溶錠（ラクトフェリンとして300 mg/日）を、8週間摂取させ、CTにより摂取前後の内臓脂肪面積を計測。

* : p < 0.05, ** : p < 0.01, paired t-test, 摂取前後の比較

第1章

腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果

～ヒト臨床試験～

序

LFは多機能性タンパク質として知られており、これまでに多くの研究者が、ヒト試験を実施し、感染防御作用¹⁵⁻¹⁷⁾や免疫賦活作用²⁸⁾に関する報告を行っている。その一方で、これまで内臓脂肪や体重の減少に関する報告はなく、例えば、神津らは、大腸ポリープがある患者に、LFの錠剤を、1日に3g、1年間投与を続けた結果、ポリープの縮小傾向を確認したが、体重の減少などは報告されていない¹²⁾。この原因として、LFの内臓脂肪低減効果を発揮させるためには、全長のLFを小腸に届ける必要があることが考えられた。序章で述べた動物実験では100 mg/500 µLのLFを強制経口投与している。この条件においては5 mg程度の全長LFが小腸に到達していることを確認している²⁴⁾。また、第2章で述べる細胞実験において、LFが脂肪細胞における脂肪の合成を抑制するという新知見を見出し、動物実験の結果を裏付けるデータを取得した²⁵⁾。しかしながら、胃の消化酵素であるペプシンで分解したLFではその活性が消失することも明らかとなった。こうしたことから、LFを経口摂取して内臓脂肪低減効果を発揮させるためには、LFが胃で分解されずに腸まで届くことが必要であることが示唆された。

そこでLFの腸溶加工技術について検討した。その結果、錠剤のマスキングや艶出しを目的としたコーティング剤や結合剤として利用され、食品添加物としても認められ広く使用されている天然高分子シェラックに着目し、日本薬局方の崩壊試験をクリアできる（医薬品と同等の結果が得られる）LFを含有する腸溶錠を開発することに成功した。本製剤では、pH依存型の皮膜を成型し、胃では崩壊せず、小腸に到達してから皮膜が溶解し、LFが溶出される設計になっている（図0-6）。

本製剤を用いて、序章で述べたように、肥満傾向の被験者（男女12名）を対象とした社内オープン試験にて、LF腸溶錠を1日3錠（LFとして300 mg）、2ヶ月間継続摂取することにより内臓脂肪低減効果を見出した。しかしながら、本試験の課題として社内のオープ

ン試験であったことから、プラセボ効果を排除できていないことが挙げられた。そこで、本章では LF の内臓脂肪低減効果を科学的に立証するため、内臓脂肪型肥満が疑われる社外の被験者を対象に、プラセボを対照として、LF の内臓脂肪低減効果を二重盲検群間比較試験にて検討したので、以下にその結果を述べる²⁶⁾。

試験方法

本試験は、ヘルシンキ宣言及び「疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省告示)」に基づく倫理的原則を厳守し、医療法人森山医会森山リハビリテーション病院内治験審査委員会において審査を受け、承認された後に平成20年1月から5月にかけて医療法人森山医会森山リハビリテーション病院にて実施された。

試験食品

今回使用した被験食品はLF腸溶錠であり、1粒中にLFを約100mg含有する粒状食品であり、シェラックを主成分とする腸溶解性コーティングを施したものである。LFはDMV International社(Veghel, The Netherlands)からタンパク質純度約98%のものを購入して使用した。その他の構成成分は、乳糖、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ショ糖脂肪酸エステル、二酸化珪素、ソルビトール、L-アルギニン、デキストリン、ヒハツ抽出物である。対照食品はLF腸溶錠のうちLFの代りに乳糖を配合したプラセボ製剤である。一般に、タンパク質、乳糖のカロリーは共に約4kcal/g程度であり差はない。被験食品、対象食品共に、ジッパー付アルミパウチ袋1袋中に21粒を封入した。被験食品及び対照食品ともに、1日に1回、1回3粒を夕食摂取後から就寝前までに適量の水または白湯とともに、噛まずに摂取させた。1日摂取量としては、試験食品は972mg(324mg×3粒)、被験食品のLFとしての摂取量は1日300mgになる。摂取期間は8週間とした。

被験者

医療法人森山医会森山リハビリテーション病院内の治験審査委員会にて承認された同意文書を手渡して試験目的、試験方法などについて十分な説明を行い、本人から直接同意書に

て同意が得られ、かつ下記の選択基準及び除外基準に合致した被験者を選択した。

選択基準としては、

- ①健常な 20 歳以上の成人
- ②BMI 25 kg/m² 以上
- ③内臓脂肪面積が被験者平均値として 100 cm² 以上
- ④スクリーニング来院時、下記条件のいずれかに該当する者が望ましい
 - (i. 血清脂質：150 mg/dL 以上、あるいは HDL コレステロール：40 mg/dL 未満、
 - ii. 血糖 110 mg/dL 以上、iii. 収縮期血圧：130 mmHg 以上、
 - あるいは拡張期血圧：85 mmHg 以上)
- ⑤定められた時期に、日誌を自分で記述できる者
- ⑥本人の自由意思で試験の参加に同意し、同意書を提出した者
とした。

除外基準としては、

- ①現在、基礎疾患を有し、通院加療もしくは服薬している者
- ②体脂肪量、血清脂質値に影響を及ぼす特定保健用食品、サプリメントおよび当該臨床値に影響を与える可能性を有する食成分を含有した健康食品を常用している者
- ③試験食品に含まれる食材に対するアレルギー症状を以前に起こしたことのある者
- ④事前の臨床検査にて試験参加に問題があると判断された者
- ⑤授乳婦、妊娠中あるいは妊娠の可能性を有する女性ならびに試験期間中に妊娠を希望する女性
- ⑥その他、試験責任医師が不相当と判断した者
とした。

事前検査

同意を取得した被験者に対し、事前検査として身長、体重、BMI、腹囲、臀部囲、血圧、脈拍数、CT 検査による臍部横断面の脂肪面積（全体脂肪面積、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積を算出）を測定した。また血液検査として、総コレステロール(cholesterol oxidase method²⁹⁾)、HDL コレステロール(selective inhibition method³⁰⁾)、LDL コレステロール(enzymatic method³¹⁾)、中性脂肪(enzymatic method after eliminating endogenous free glycerol³²⁾)、TL(Sulfo-Phospho-Vanillin method³³⁾)、NEFA (enzymatic method³⁴⁾)、総蛋白(biuret method³⁵⁾)、アルブミン(BCG method³⁶⁾)、AST(standard methods established by the JSCC³⁷⁾)、ALT(standard methods established by the JSCC³⁷⁾)、LDH(standard methods established by the JSCC³⁷⁾)、ALP(standard methods established by the JSCC³⁷⁾)、 γ -GTP (standard methods established by the JSCC³⁷⁾)、総ビリルビン(enzymatic method³⁸⁾)、直接ビリルビン(enzymatic method³⁸⁾)、クレアチニン(enzymatic method³⁹⁾)、BUN(enzymatic method⁴⁰⁾)、尿酸(uricase-peroxidase method⁴¹⁾)、CPK(standard methods established by the JSCC³⁷⁾)、CRP(immunonephelometry⁴²⁾)、血糖(glucoseoxidase-peroxidase method⁴³⁾)、HbA1c(latex particle agglutination method⁴⁴⁾)、インスリン(EIA method⁴⁵⁾) を測定した。non-HDL コレステロールは総コレステロールと HDL コレステロールの値から算出した。albumin/globulin 比は総蛋白とアルブミンの値から算出した。この事前検査で対象者として適格と判断された被験者は、30 名であった。

試験デザイン

事前検査（スクリーニング）で選定された被験者を LF 群とプラセボ群の 2 群に分け、二重盲検群間比較法にて LF の内臓脂肪などに対する影響の比較検討を行った。群分けは、試験に直接関与しない医師をコントローラーに指名し、年齢、性別、内臓脂肪面積に偏りがないように二群に分けた。

主要評価項目は、臍部横断面 CT 検査による内臓脂肪面積とし、副次的評価項目は、皮下脂肪面積、全体脂肪面積（内臓脂肪面積と皮下脂肪面積の合計）、BMI、腹囲、臀部囲、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、non-HDL コレステロール、中性脂肪、NEFA 及び TL とした。また、安全性については、自覚症状、試験食品摂取前後の血圧、脈拍数及び血液生化学検査値を評価した。CT は HITACHI (Pronto-Xi/Si) を使用し、撮影条件は管電圧 120 kVp、100 mAs、CT 画像は解析ソフト (FatPointer Ver. 2 : 日立メディコ) を使用して臍部横断面内臓脂肪面積及び皮下脂肪面積を求めた⁴⁶⁾。腹囲、臀部囲は、立位、呼気時の周囲径で測定した。

なお、有効性評価項目に影響を及ぼす可能性があるとして、来院日検査前日の夕食は、毎回同一の食事（規定食）を摂取させると共に、食事による影響を推し量るために、来院前 3 日間の全食事を記録させ、摂取カロリーなどを計算した⁴⁷⁾。また、被験者は試験食品の摂取記録、万歩計（東京磁石工業製、累計歩数計 SPALDING）による毎日の歩数を記録した。来院時には、体調変化や、副作用について問診にて確認し、日々の摂食量、運動量を一定のレベルに保つように指導した。

統計解析

1) 被験者背景

人口統計学的変数及び基準値について、摂取群別の統計量（平均値、標準偏差値）を算出し、名義尺度はカイ二乗検定、順序尺度は t 検定にて評価した。有意水準は両側検定 5%未満とし、10%未満を傾向差とした。

2) 主要評価項目、副次評価項目および安全性評価項目

内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、全体脂肪面積、BMI、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、non-HDL コレステロール、中性脂肪、NEFA、TL などについては、repeated measures ANOVA による解析後、post hoc analysis として群内間における 2 群の比較は t test、多重検定は Dunnett test、プラセボ群と LF 群間の比較は ANCOVA にて行った。有意水準は両側検定 5%未満とし、10%未満を有意傾向とした。解析ソフトは JMP version 5.0.1a (SAS Institute Inc.) を用いた。

結果

被験者構成

事前検査によって選抜された本試験参加予定被験者数は、30名であった。これら登録者のうち、転職に伴う同意撤回1名（プラセボ群）、親族死去に伴う同意撤回1名（LF群）の合計2名は、無作為化割付の実施前に除外した。また、転勤、仕事が多忙なため試験開始8週間後において来院が出来なくなった2名（LF群1名、プラセボ群1名）は解析対象から除外した。この結果、解析対象者数はLF群が13名、プラセボ群が13名であった（図1-1）。

解析対象者26名の群別の被験者背景を表1-1に示した。記載のいずれの項目についても両群間に統計学的な有意差は認められなかった。試験食品の摂取は、LF群が98.0%、プラセボ群が96.7%であり、統計学的な有意差は認められなかった。運動量に関しては、4週目、8週目で集計したが、両群間の歩数の間には統計学的な有意差は認められず、一定のレベルの運動量であったことを確認した。また、表1-2にはエネルギー、タンパク質、炭水化物、脂質の摂取量を示したが、いずれの項目も両群間で統計学的な有意差は認められず、食生活に関しても一定のレベルで推移していることを確認した。

身体計測、血圧、脈拍測定結果

LF群、プラセボ群の試験前、4週間後、8週間後における身体計測、血圧、脈拍測定結果を表1-3に示す。

体重は、試験前値との差において、LF群の4週間後、8週間後は -1.3 ± 1.2 、 -1.5 ± 1.4 kg、プラセボ群は -0.3 ± 1.1 、 1.0 ± 4.0 kgであった。LF群は試験前値との比較で4週間後、8週間後において統計学的に有意な減少が観察された（Dunnett test; $P < 0.05$, 0.01 ）が、プラセボ群はいずれの週においても有意な変動は認められなかった。またLF群はプラセボ群と比

較して 4 週後、8 週後において統計学的に有意に減少した (ANCOVA; $P=0.037, 0.013$)。

BMI は、試験前値との差において、LF 群の 4 週後、8 週後は -0.5 ± 0.5 、 -0.6 ± 0.6 kg/m^2 、プラセボ群は -0.2 ± 0.4 、 0.3 ± 1.2 kg/m^2 であった。LF 群は試験前値との比較で 4 週後、8 週後に有意な減少が観察された (Dunnett test; $P < 0.05, 0.01$) が、プラセボ群はいずれの週においても有意な変動は認められなかった。また LF 群はプラセボ群と比較して 8 週後において有意に減少した (ANCOVA; $P = 0.041$)。

腹囲は、試験前値との差において、LF 群の 4 週後、8 週後は -2.2 ± 2.1 、 -4.4 ± 4.0 cm 、プラセボ群は 0.0 ± 6.8 、 -0.9 ± 3.3 cm であった。LF 群は試験前値との比較で 8 週後に有意な減少が観察された (Dunnett test; $P < 0.01$) が、プラセボ群はいずれの週においても変動は認められなかった。また LF 群はプラセボ群と比較して 8 週後に減少傾向が観察された。(ANCOVA; $P = 0.073$)。

臀部囲は、試験前値との差において、LF 群の 4 週後、8 週後は -1.6 ± 2.1 、 -2.6 ± 2.9 cm 、プラセボ群は -1.9 ± 4.5 、 -0.2 ± 1.8 cm であった。LF 群は試験前値との比較で 8 週後に有意な減少が観察された (Dunnett test; $P < 0.05$) が、プラセボ群はいずれの週においても変動は認められなかった。また LF 群はプラセボ群と比較して 8 週後に有意な減少が観察された (ANCOVA; $P = 0.032$)。

収縮期血圧、拡張期血圧、試験前との比較において有意差は認められず、また両群間の比較でも有意な変動は認められなかった。脈拍については、ANOVA にて time に有意差が認められたが、LF 群、プラセボ群共に試験前との比較において有意差は認められず、また両群間の比較でも有意な変動は認められなかった。

CTによる腹部脂肪面積測定結果

LF群、プラセボ群の試験前、8週後において、CTにより腹部の内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、全体脂肪面積を計測した結果を表1-4に示す。

内臓脂肪面積は、試験前値と8週後の差において、LF群は $-14.6 \pm 11.2 \text{ cm}^2$ であり有意な減少が認められ (paired t-test; $P < 0.01$)、プラセボ群は $-1.8 \pm 11.7 \text{ cm}^2$ であり有意差は認められなかった。またLF群はプラセボ群との比較において、8週後で有意な減少が認められた (ANCOVA; $P < 0.01$)

皮下脂肪面積は、試験前と8週後の差において、LF群が $-13.4 \pm 27.4 \text{ m}^2$ 、プラセボ群が $-9.9 \pm 33.6 \text{ cm}^2$ であり有意差は認められず、両群間の比較においても有意差は認められなかった。

全体脂肪面積は、試験前と8週後の差において、LF群が $-28.0 \pm 28.6 \text{ cm}^2$ であり有意な減少が認められ (paired t-test; $P < 0.01$)、プラセボ群が $-11.7 \pm 36.6 \text{ cm}^2$ であり有意差は認められなかった。また、両群間の比較においては有意差は認められなかった。

血中脂質

血中脂質として、試験前、4週後、8週後に、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、総脂質、NEFA、Non-HDL コレステロールを測定したが、摂取前との比較、両群間との比較において有意差は認められなかった (表1-5)。

安全性検査

血液生化学検査の結果を表 1-6 に示す。試験食品との因果関係が疑われる異常な変動を示した例は、認められなかった。また、試験期間中に試験食品との因果関係が否定しきれなかった有害事象、副作用は、認められなかった。なお、対象となった被験者は、平均 BMI が LF 群 30.0 kg/m²、プラセボ群 27.7 kg/m² と太っていたこと、年齢も 50 歳を超えている被験者がいたこと、血管が細かった例があったこと、採血部位を確保しづらかった例があったことなどがあり、採血が困難であった。そのためやむを得ず血糖値は全例、血清血糖に切り替えて測定した成績である。glutamic pyruvate transaminase と glucosylated hemoglobin A1c については ANOVA の結果、time で有意差が認められた。そこで試験前と 8 週後で統計解析を行ったところ、glutamic pyruvate transaminase ではプラセボ群において有意な低下が認められたが (paired t-test; $P < 0.05$)、LF 群では認められなかった。また、heoglobin A1c ではプラセボ群、LF 群共に、試験前と比較して 8 週後で有意な低下が認められた (paired t-test; $P < 0.05$)。heoglobin A1c は一般に冬に高く、夏に低くなるといわれている。今回の試験は 1 月～5 月にかけて実施しているため、季節的な影響によるものと考えられる。

考察

本研究では、社内試験で認められた LF 腸溶錠の内臓脂肪低減効果をより科学的に立証するため、内臓脂肪型肥満が疑われる社外の被験者を対象に、プラセボを対照として、LF の内臓脂肪低減効果を二重盲検群間比較試験にて検討した。その結果、LF 腸溶錠 (LF として 300 mg) を 8 週間摂取することで、プラセボ群と比較して有意な内臓脂肪低減効果が認められた。体重、BMI、臀部囲はプラセボ群と比較して有意な減少を認め、腹囲は減少傾向が認められた。一方、皮下脂肪に関しては、プラセボ群と比較して有意な低減効果は認められなかったことから、LF の作用は内臓脂肪に特異的であることも明らかとなった。また血液生化学検査など安全性評価項目において副作用は認められなかった。

我々の食生活において、LF の主要な摂取源は、牛乳から作られる乳製品である。ウシの初乳、常乳中の LF 濃度は、それぞれ 1000、20-350 mg/L 程度と報告されているが³⁾、牛乳の殺菌工程において LF は熱失活するため、活性を保った LF を乳製品から摂取するのは困難である。生乳を 1L 程度、あるいは加熱をしないナチュラルチーズを 100 g 程度摂取することで、今回の LF 摂取量である 300 mg に到達するが⁴⁸⁾、それでも大半の LF は胃で分解される。従って、日常生活の中で、一日に 300 mg の LF を未分解の状態で小腸まで到達させるためには、今回のように腸溶錠という形で摂取することが望ましい。

ヒトにおいて、LF 摂取と肥満や内臓脂肪との関係に関して研究されている事例はほとんど報告されていないが、近年血中のヒト LF 濃度が BMI や血糖、血中脂質と逆相関し、インスリン感受性と正に相関するという興味深い疫学研究が報告された^{49, 50)}。本報告ではこの原因について、ヒト LF 濃度が維持されることにより、血流に入った LPS が減少し、脂質異常を予防しているのではないかと考察している。血中の LPS 濃度上昇は肥満とインスリン抵抗性を誘導することが報告されており⁵¹⁾、LF は LPS に結合して不活性化することも報告されている⁵²⁾。本報告を基に今回の試験について考察すると、今回の試験ではウシ

LF を経口摂取しているので、血中のウシ LF 濃度が上昇して LPS が不活性化している、あるいは小腸内において腸内細菌の LPS を不活性化することで体内への LPS の流入を軽減している可能性が考えられる。しかしながら、第 2 章で述べる LF の体内動態を考慮すると、LF の血中への移行量は微量なので、前者の可能性は低いものと推察される。

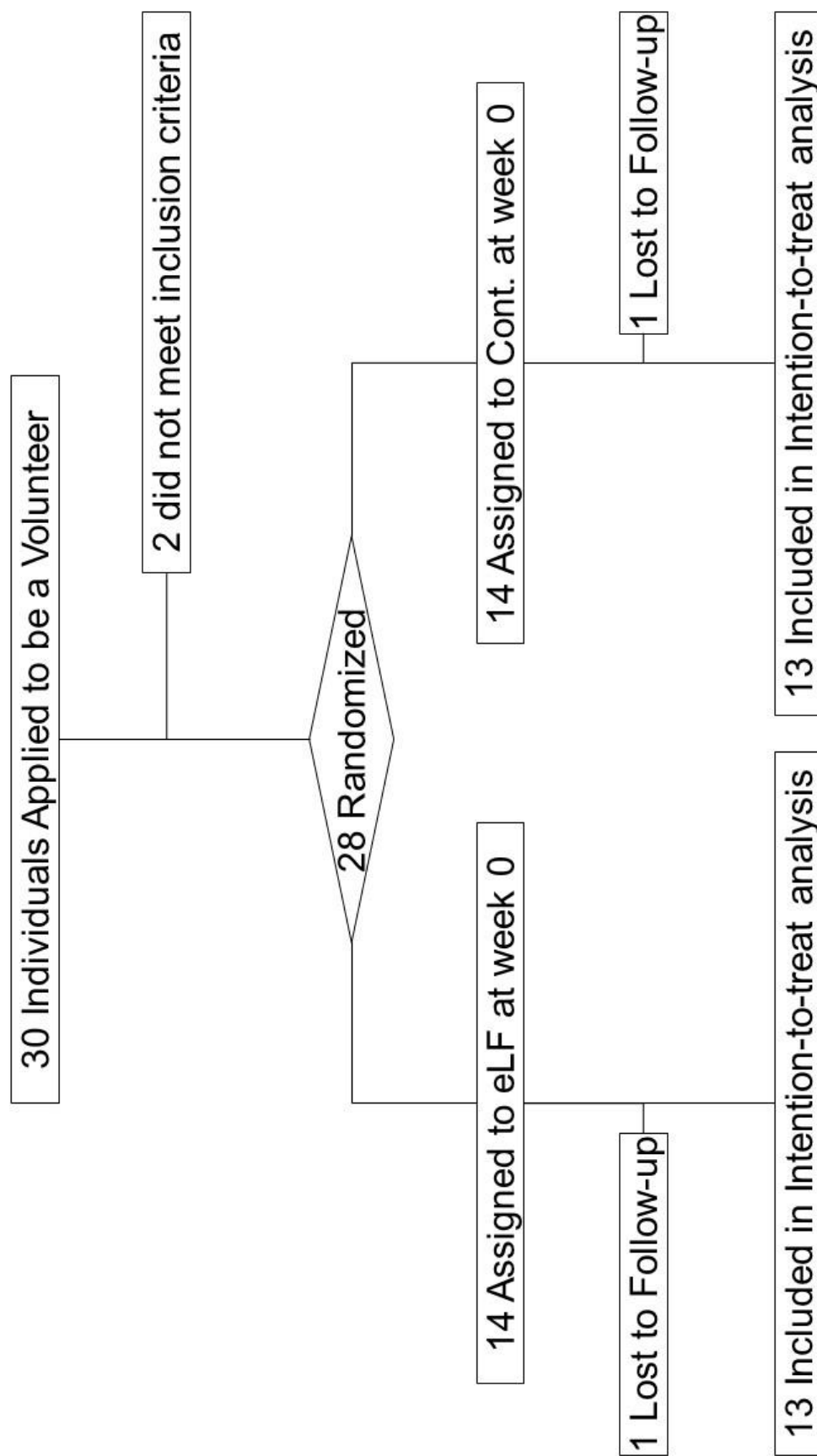


図1-1 症例登録・解析対象者固定のフローチャート

表1-1 被験者背景

Parameter	Group				P value
	eLF		Cont		
	Mean	SD	Mean	SD	
Sex	Men 5		Men 6		0.50 ^a
	Women 8		Women 7		
	Total 13		Total 13		
Age	42.8	10.1	46.8	9.2	0.30 ^b
Height (cm)	161.1	8.4	161.0	11.3	0.99 ^b
Weight (Kg)	77.7	12.3	72.9	17.0	0.41 ^b
BMI (kg/m ²)	30.0	4.8	27.7	2.9	0.15 ^b
Waist circumference (cm)	99.6	10.1	93.2	12.8	0.17 ^b
Hip circumference (cm)	105.7	7.4	101.9	10.1	0.28 ^b
Visceral fat area (cm ²)	118.1	32.2	116.6	49.1	0.93 ^b
Subcutaneous fat area (cm ²)	284.6	126.4	241.7	107.7	0.36 ^b
Total fat area (cm ²)	402.7	128.5	358.3	133.7	0.40 ^b
Systolic blood pressure (mmHg)	128.2	11.3	132.0	8.7	0.35 ^b
Diastolic blood pressure (mmHg)	79.5	11.9	78.6	14.1	0.87 ^b
Pulse rate (beats/min)	77.6	11.8	80.3	11.6	0.56 ^b
Serum total cholesterol (mg/dL)	221.7	33.5	217.7	21.3	0.72 ^b
Serum HDL cholesterol (mg/dL)	59.4	14.2	58.4	17.0	0.87 ^b
Serum LDL cholesterol (mg/dL)	142.5	24.8	132.2	19.8	0.26 ^b
Serum triglyceridel (mg/dL)	128.6	75.9	170.6	131.2	0.33 ^b
Serum total lipid (mg/dL)	697.1	129.8	734.4	162.1	0.52 ^b
Serum free fatty acid (mEq/L)	0.76	0.36	0.61	0.21	0.21 ^b
Serum non-HDL cholesterol (mg/dL)	162.3	26.5	159.3	22.6	0.76 ^b

^asquare test between group

^bt test between group

表1-2 食事摂取量

Parameter	group	Week 0		Week 4		Week 8		P value of repeated measures ANOVA		
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	time	group	time × group
Energy intake (kcal/d)	Control	2044	407	1845	424	1859	364	0.84	0.70	0.07
	eLF	1913	487	2050	605	1990	596			
Protein intake (g/d)	Control	82.8	17.6	71.1	15.5	75.3	13.6	0.66	0.15	0.46
	eLF	70.5	24.6	78.3	19.9	76.6	25.7			
Fat intake (g/d)	Control	72.6	11.7	60.8	19.2	60.2	16.1	0.61	0.86	0.13
	eLF	62.2	16.4	70.2	14.1	66.3	25.0			
Carbohydrate intake (g/d)	Control	255.0	63.2	240.7	59.8	243.6	52.2	0.57	0.84	0.21
	eLF	251.1	77.0	252.6	86.3	257.4	81.1			

表1-3 身体計測、血圧、脈拍測定結果

Parameter	Week 0		Week 4		Week 4 ^a		Week 8		Δvalue at week8 ^b		P value of repeated measures ANOVA					
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	time	group	time × group	Week 4	Week 8	
Weight	Control	72.9	17.0	72.5	17.5	0.3	1.1	73.9	20.1	-1.0	4.0	0.0047	0.55	0.045	0.037	0.013
(kg)	eLF	77.7	12.3	76.4	12.0 ^c	1.3	1.2	76.2	11.7 ^{***c}	1.5	1.4					
BMI	Control	27.7	2.9	27.6	3.0	0.2	0.4	28.0	3.7	-0.3	1.2	0.0040	0.23	0.053	0.12	0.041
(kg/m ²)	eLF	30.0	4.8	29.5	4.6 ^c	0.5	0.5	29.41	4.37 ^{***c}	0.6	0.6					
Waist circumference	Control	93.2	12.9	93.2	13.4	0.0	6.8	92.3	12.0	0.9	3.3	0.0049	0.30	0.083	0.45	0.073
(cm)	eLF	99.6	10.1	97.4	9.1	2.2	2.1	95.2	8.9 ^{***c}	4.4	4.0					
Hip circumference	Control	101.9	10.1	100.0	8.9	1.9	4.5	101.7	10.0	0.2	1.8	0.0036	0.35	0.053	0.54	0.032
(cm)	eLF	105.7	7.4	104.1	7.7	1.6	2.1	103.1	6.5 ^{*c}	2.6	2.9					
Systolic blood pressure	Control	132.0	8.7	132.7	9.6	-0.7	10.4	126.8	11.9	5.2	9.4	0.07	0.18	0.62		
(mmHg)	eLF	128.2	11.3	125.8	9.8	2.5	8.1	124.9	6.8	3.3	8.5					
Diastolic blood pressure	Control	78.6	14.1	83.6	9.7	-5.0	15.3	78.8	11.0	-0.2	12.6	0.30	0.92	0.62		
(mmHg)	eLF	79.5	11.9	80.8	9.6	-1.3	7.8	79.7	9.4	-0.2	10.0					
Pulse rate	Control	80.3	11.6	81.8	9.6	-1.5	10.1	79.1	10.2	1.2	12.9	0.033	0.29	0.47		
(beats/min)	eLF	77.6	11.8	79.8	8.4	-2.2	8.9	72.8	10.0	4.8	9.1					

^a The value is the change from Week 0 to Week 4

^b The value is the change from Week 0 to Week 8.

^c Significantly different by Dunnett test between baseline (Week 0) and treatment period (Week 4, 8): *p<0.05, **p<0.01

表1-4 CTによる腹部内臓脂肪、皮下脂肪、全体脂肪面積の計測結果

Parameter	Week 0		Week 8		Δvalue at week8 ^a		P value of repeated measures ANOVA			P value of ANCOVA
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	time	group	time × group	
	Visceral fat area (cm ²)	116.6	49.1	114.8	46.7	1.8	11.7	0.0013	0.76	0.0087
Subcutaneous fat area (cm ²)	118.1	32.2	103.4	32.9 ^{**b}	14.6	11.2	0.064	0.36	0.77	0.96
Total fat area (cm ²)	241.7	107.7	231.7	113.0	9.9	33.6	0.0051	0.47	0.22	0.34
	284.6	126.4	271.3	114.0	13.4	27.4				
	358.3	133.7	346.6	132.1	11.7	36.6				
	402.7	128.5	374.7	111.7 ^{**b}	28.0	28.6				

^a The value is the change from Week 0 to Week 8

^b Significantly different from baseline (Week 0) by paired t test. ** : p<0.01.

表1-5 血中脂質測定結果

Parameter	Week 0						Week 4		Week 8		P value of repeated measures ANOVA		
	Mean		SD		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	time	group	time × group
Total cholesterol (mg/dL)	217.7	21.3	219.8	20	229.1	25.4	218.8	29.8	218.9	23.4	0.59	0.79	0.35
HDL cholesterol (mg/dL)	58.4	17	58.9	17	60.3	18.6	59.4	14.2	62.4	15.9	0.10	0.75	0.78
LDL cholesterol (mg/dL)	132.2	19.8	135.2	15.2	142.3	21.8	142.5	24.8	139.5	25.6	0.43	0.69	0.34
Triglyceride (mg/dL)	170.6	131.2	176.9	116.2	168.9	72.8	128.6	75.9	118.2	53.6	0.38	0.19	0.94
Total lipid (mg/dL)	734.4	162.1	749.5	136.3	756.2	84.6	697.1	129.8	681	80.6	0.62	0.23	0.74
Free fatty acid (mg/dL)	0.61	0.21	0.61	0.22	0.61	0.26	0.76	0.36	0.71	0.19	0.35	0.33	0.37
Serum non-HDL Cholesterol (mg/dL)	159.3	22.7	160.9	21.3	168.8	16.6	162.3	26.5	156.7	23.9	0.61	0.55	0.32

表1-6 血液生化学検査結果

Parameter	group	Week 0		Week 8		<i>P</i> value of repeated measures ANOVA		
		Mean	SD	Mean	SD	time	group	time ×group
Total protein (mg/dL)	Control	7.4	0.4	7.4	0.4	0.45	0.83	0.66
	eLF	7.3	0.4	7.4	0.5			
Albumin (mg/dL)	Control	4.5	0.2	4.5	0.2	0.17	0.78	0.34
	eLF	4.5	0.3	4.6	0.3			
Albumin/globulin ratio	Control	1.59	0.09	1.59	0.14	0.26	0.39	0.41
	eLF	1.63	0.21	1.66	0.22			
Glutamic oxaloacetic transaminase (IU/L)	Control	29	14	28	11	0.22	0.084	0.79
	eLF	23	7	21	5			
Glutamic pyruvate transaminase (IU/L)	Control	37	21	34	19	0.036	0.44	0.64
	eLF	32	29	27	19			
Lactate dehydrogenase (IU/L)	Control	214	29	211	29	0.21	0.21	0.76
	eLF	201	34	196	22			
Alkaline phosphatase (IU/L)	Control	233	51	240	59	0.076	0.34	0.87
	eLF	214	42	222	39			
γ-glutamyl transferase (IU/L)	Control	47	31	46	32	0.31	0.46	0.47
	eLF	65	74	58	58			
Total bilirubin (mg/dL)	Control	0.55	0.21	0.59	0.24	0.19	0.87	0.84
	eLF	0.68	0.18	0.74	0.25			
Direct bilirubin (mg/dL)	Control	0.16	0.07	0.15	0.08	0.79	0.072	0.79
	eLF	0.2	0.06	0.2	0.07			
Creatinine (mg/dL)	Control	0.7	0.19	0.71	0.19	0.53	0.66	0.44
	eLF	0.68	0.16	0.67	0.17			
Blood urea nitrogen (mg/dL)	Control	13.1	3.2	14	3.8	0.16	0.3	0.64
	eLF	12.1	2.9	12.6	2.4			
Uric acid (mg/dL)	Control	5.8	2.1	6.1	2	0.59	0.36	0.063
	eLF	5.4	1.2	5.3	1.1			
Creatine kinase (IU/L)	Control	120	41	124	60	0.79	0.12	0.82
	eLF	97	43	97	25			
C-reactive protein (mg/dL)	Control	0.17	0.12	0.47	1.19	0.54	0.51	0.23
	eLF	0.25	0.26	0.15	0.15			
Blood glucose (mg/dL)	Control	64	16	64	9	0.74	0.6	0.78
	eLF	68	22	66	13			
Glycosylated hemoglobin A1c (%)	Control	5.6	0.6	5.3	0.5	<0.0001	0.79	0.59
	eLF	5.7	1.2	5.4	1			
Insulin (μU/ml)	Control	9.7	6.8	10.7	5.8	0.35	0.75	0.12
	eLF	13.9	22.6	9.9	13.7			

Values are mean ± Standard deviation

The initial values were not significantly different between groups.

第2章

腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果の 作用機序に関する検討

第1節

ラクトフェリンの体内動態

序

第1章では腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果に関するヒト試験の結果を述べたが、その作用機序に関しては不明であった。そこで第2章では腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果の作用機序に関する検討について述べる。

機能性食品の作用機序を考察するに当たり、その体内動態を検討することは不可欠である。LF の体内動態についてはいくつか報告がある。Fischer らは、マウスに経口投与した LF の体内動態について報告しており⁵³⁾、投与 10 分後には血液中に全長 LF が検出され、その後急速に濃度が低下すること、また体内の各組織については、肝臓、胆嚢、腎臓、脾臓、脳について検討し、いずれの組織においても LF が検出されるが、中でも肝臓において最も高い濃度で検出されることを、ELISA 法により明らかにしている。また LF の吸収経路については Takeuchi らが報告しており⁵⁴⁾、小腸に到達した LF は、門脈からではなくリンパ系を介して吸収された後、血流に乗ることを報告している。リンパ経路に乗った LF は、まず代表的な内臓脂肪である腸間膜脂肪を通過した後に、鎖骨下静脈にて血流に合流し、全身へと運ばれる。しかしながら、LF の内臓脂肪への到達を検討した研究はこれまで報告されていなかった。ヒト試験の結果では、内臓脂肪に特異的に低減効果が認められており、LF が内臓脂肪に直接的に作用している可能性も考えられた。

そこで本節では、ラットに LF を経口投与後、代表的な内臓脂肪組織である腸間膜脂肪組織の他、小腸内容物、血液、肝臓についても解析したのでその結果について述べる。なお、小腸内容物については、今回の投与方法で全長 LF が小腸まで到達していることを確認するため採取した。また、血液については全身への移行量の推定、肝臓については脂質代謝の代表的な臓器であることと先行研究で最も LF が到達していた臓器であったことから選定した。

実験材料と方法

供試動物

SD ラット（雄性、8 週齢）を、日本エスエルシーより購入し、温度 23 度、12 時間の明暗サイクル（AM7:00 に点灯、PM7:00 に消灯）で飼育し、固形餌（CE2, 日本クレア）と水道水を自由摂取させた。1 週間の馴化期間の後、以下の実験を行った。なお本実験はライオン株式会社動物実験委員会にて承認された上で実施した。

LF の投与と解剖

LF は DMV International 社（Veghel, The Netherlands）からタンパク質純度約 98% のものを購入して使用した。前日の晩からラットを断食し、翌朝、各ラットに対して 1000 mg の LF（25 % (w/v) 水溶液を 4 mL）をゾンデを用いて強制経口投与し、投与 15、30、60 分後（各時間 n=8）にペントバルビタール麻酔下で解剖を行った。腹部大静脈から採血して血清を調製した。腹部大動脈切断による安楽死後、肝臓、腸間膜脂肪を採取し、液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。さらに小腸を採取し、胃の近位部位と遠位部位の 2 部位に分割後、それぞれの内容物を 4 mL の 1 % protease inhibitor cocktail（P8340, Sigma-Aldrich）及び 1 mM メシル酸カモスタット（035-17763、和光純薬工業）含有生理食塩水で溶出した後、超音波破碎を 1 分行い、前述の生理食塩水で 10 倍希釈して小腸中の消化酵素を希釈した後に、-80°C で保存した。

各検体中の LF 量の定量

腸間膜脂肪、肝臓は、カッターにて細断後 1 % protease inhibitor cocktail を添加した生理食塩水を 10 倍量添加し、ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン）で破碎した。本溶液を 4°C、10000 rpm で 5 分間遠心して回収した上清を、組織抽出液とした。各サンプル

中の LF 濃度の定量を ELISA または SDS-PAGE により行った。ELISA は、Bethyl Laboratories, Inc.より Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Kit (E10126)、ELISA Starter Accessory Package (E101) を購入してプロトコルに従って行った。SDS-PAGE は NuPAGE 4-12 % Bis-Tris gel (NP0342BOX、Invitrogen) を購入し、MES ランニングバッファーを用いて行った。ゲル画像中の全長 LF の定量は LabWorks version 4.6.00.0 Image Acquisition and Analysis Software (Ultra-Violet Products Limited) を用いて行った。

統計解析

小腸内容物、腸間膜脂肪中の LF の測定値は平均値と標準誤差で示した。データは one-way ANOVA を行った後、control に対する Dunnett test を行った。有意水準は両側検定 5%未満とし、10%未満を有意傾向とした。解析ソフトは JMP version 5.0.1a (SAS Institute Inc.) を用いた。

結果 経口投与したラクトフェリンの体内動態について

投与方法の予備検討

実験動物に腸溶錠を投与することが物理的な大きさの問題で困難であったことから、予備検討として、粉末状の腸溶性が期待できる LF 製剤である、豆乳コート LF、鉄 LF、リポソーム LF の小腸への到達量を評価した。豆乳コート LF は NRL ファーマ社が開発したものであり、ラットの胃に投与した場合、通常の LF よりも 10 倍胸部リンパ液中に LF が移行するとの報告がある⁵⁵⁾。鉄 LF は雪印社から販売されており、1 分子の LF に 70 原子の鉄が結合した製剤である。消化酵素の影響を受けにくく、腸まで届きやすくなるとの記載が同社のパンフレットにある。リポソーム LF はサンスター社から販売されており、卵黄フォスファチジルコリンとフィトステロールから構成したマルチラメラリポソームの状態の LF である。生体での利用率が高められ、通常の LF より高い抗炎症作用を有するとの報告がある⁵⁶⁾。そこでこれらの素材を C57BL/6 マウスに混餌投与し (LF として 100 mg)、投与 1 時間後に小腸内容物を、胃の近位部位と遠位部位の半分に分けてそれぞれ回収し、ELISA 法にて小腸への到達量を解析した (図 2-1、未発表データ)。その結果、豆乳コート LF は通常の LF と比較して小腸全体で約 1.6 倍程度の増加傾向が認められたが、鉄 LF、リポソーム LF は通常 LF と同程度の到達量であった。また豆乳コート LF においてもその到達量は 749 μ g 程度であり、投与した LF の 1%にも満たない量であった。さらに SDS-PAGE にて存在形態を確認したところ、全長 LF はほとんど検出されず、分解物と思われるバンドが検出されるのみであった。なお分解物と思われるバンドについては豆乳コート LF のほうがバンド強度は高く、ELISA での定量結果と一致した結果であった。

次に C57BL/6 マウスに混餌投与またはゾンデ投与時の、小腸内における LF 量を経時的に解析した (図 2-2、未発表データ)。なお混餌投与では 100 mg の LF を 900 mg の粉餌 (CE2, 日本クレア) に混ぜて投与したが、マウスが摂取するのに 0.5~1 時間程度要し、

胃の内容物なくなるまで4～6時間程度要したため、1, 2, 3, 4, 6時間に設定した。一方ゾンデ投与では数秒程度で投与が完了し、胃を通過するのに1～2時間程度要したので、投与15, 30, 60, 120分後に解析を実施した。その結果、混餌投与後1時間で小腸内LFは最大の検出(約1.8 mg; 投与量の1.8%)を示し、3時間までLFを検出できた。また、ゾンデ投与では、投与後15分で小腸内LFは最大の検出(約23 mg; 投与量の23%)を示し、経時的に1時間までLFを検出できた。本結果から、ゾンデ投与は混餌投与と比して、効率よくLFを小腸に届けることができることが判明した。また、両投与法で、数時間以内にELISA法でも検出できなくなることが明らかとなった。次に、SDS-PAGEにて存在形態を解析した(図2-3)。その結果、混餌投与群では、LF全長のバンドは認められなかった。一方、ゾンデ投与では、全長のLFが残存していること、また投与15分後から、1時間後までトリプシン分解物と同様のバンドパターンを示すことが明らかとなった。

以上の結果から、検討した投与方法の中ではゾンデ投与が最もLFを小腸に到達させることが明らかとなったので、本検討としてはゾンデ投与を採用することとした。なお、第2節の細胞実験ではラットの細胞を用いていることから、実験動物としてラットを用いることとした。

本検討1：小腸内容物中のLFのSDS-PAGEによる解析結果

図2-4に1000 mgのLFをラットにゾンデ投与後、各時間において小腸内容物を回収し、各群n=8のサンプルをプールし、SDS-PAGEにてLFを解析した結果を示す。全長LFのバンド(約80 kDa)は投与15～60分後に、胃の近位部位及び遠位部位から検出された。またLFの分解物と思われるバンド(約50 kDa近辺に2本、約40 kDa近辺に1本)も検出されており、トリプシンで分解された際に生じるフラグメントに類似していた。全長LFのバンドをデンストメーターにて定量した結果、LFの最大到達量は投与15分後に138 mgであり、120分後にはバンドは消失した。

本検討 2 : 各検体の ELISA による解析結果

図 2-5 に ELISA にて免疫的に活性の有る LF (iLF) を解析した結果を示す。Control 群 (LF 非投与) の、小腸内容物、血清、腸間膜脂肪抽出液、肝臓抽出液の全てのサンプルは検出限界以下であった。胃の近位部位の小腸内容物中では、iLF の最大検出量は投与 15 分後に 168 mg であり、遠位部位では投与 60 分後に 120 mg であった。腸間膜脂肪組織では、投与 15 分後に全てのラットにおいて iLF が検出され、最大検出濃度は投与 15 分後に 14.4 $\mu\text{g/g-fat}$ であり、コントロールと比較して有意な上昇が認められた (Dunnett test, $P < 0.05$)。その後 60 分までに iLF は速やかに減少した。

考察

予備検討の結果では同用量の LF を 1 時間程度かけて混餌投与した場合と、強制経口投与した場合では、後者のほうが圧倒的に小腸への全長 LF の到達量が多かったことから、本手法を選択した。混餌投与では、胃での滞留時間が長く、その間にペプシンでの分解が進むため小腸への到達量が低いものと考えられた。一方ゾンデ投与では、比較的高用量の水溶液を胃に流し込むため、一部は速やかに胃を通過して小腸に到達したため到達量が高かったものと推察する。

今回の実験では微量の LF を検出する必要があったため、ELISA キットを購入して検討を行った。プロトコルによると、本キットで用いられている抗体は、ヤギにウシ LF を投与して得られたポリクローナル抗体である。ウシ LF に特異的に反応し、イムノグロブリンなどの他のウシ血清タンパク質とは反応せず、ヒトの乳とも反応せず、他の種の乳との反応性は確認されていないとの記載がある。また予備検討の結果、トリプシンで分解した LF (N-lobe と C-lobe に分解したもの、図 2-10(B)) とは反応するが、ペプシンで分解した LF (分子量が 20 kDa 以下に分解したもの、図 2-10(A)) とは反応しないことを確認している。従って、本キットではある程度分解した LF も検出するが、20kDa 以下のフラグメントは検出されないことが推察された。

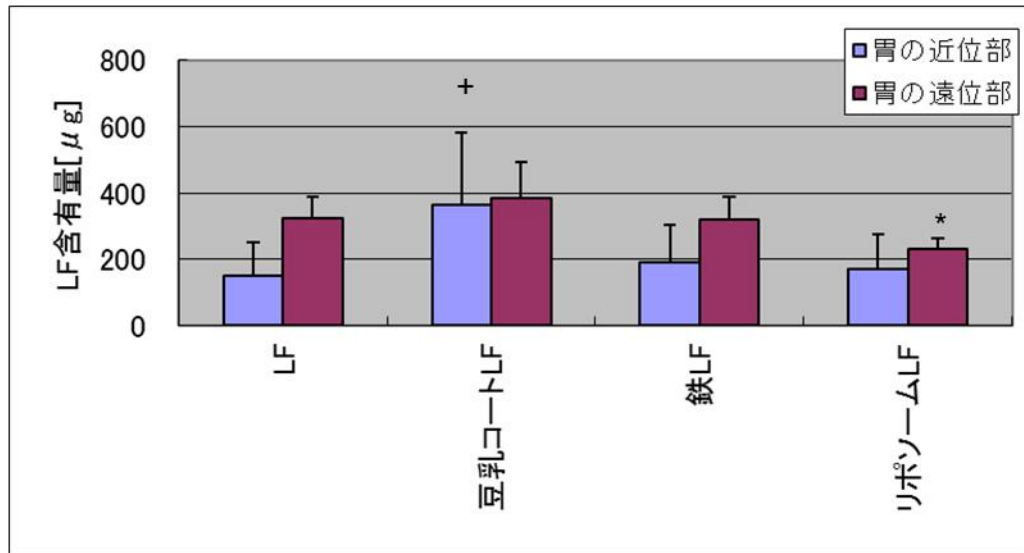
SDS-PAGE の結果から強制経口投与した LF のうち約 14 %程度 (140 mg) が全長の形で 15 分後に小腸に到達していることが確認された。また ELISA 法で検出された腸間膜脂肪組織中の iLF の濃度は 14.3 $\mu\text{g/g}$ 程度であり、血液及び肝臓では検出限界以下であった。LF の体内動態については Fischer らがウサギを免疫動物としたウシ LF 抗体を独自に調製し、詳細に検討を行っている⁵³⁾。LF を経口投与後、ウエスタンブロッティング法により全長の LF が血液中を検出されることを確認し、投与 10 分後には 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の LF が血液中に存在することを ELISA 法で確認している。また彼らは、肝臓、腎臓、胆嚢、脾臓、

脳組織についても LF を定量し、全ての臓器で LF が検出されるが、中でも肝臓が最も高濃度 (0.1 µg/g) で検出されることも確認している。我々の実験で用いた ELISA では、彼らの実験で用いた ELISA より検出感度が低いため (肝臓:0.78 µg/g、血清:0.156 µg/mL)、肝臓、血液では検出限界以下であったが、それでも腸間膜脂肪において LF が検出され、その到達量は少なく見積もっても肝臓の 20 倍以上の到達量であった。

LF が主に腸間膜脂肪に集積した原因として、腸間膜脂肪に LF のレセプターである LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) が高発現していることが考えられる⁵⁷⁾。前述のとおり LF は小腸から吸収後、リンパ経路に乗り、腸間膜脂肪を通過するが、その際に LRP1 によってトラップされることが想定される。LRP1 はもともと肝臓に高発現し、カイロミクロソームの受容体として機能していると考えられていたが、近年腸間膜脂肪においても高発現し食後の脂質の取り込みにも関与していることが報告された⁵⁸⁾。実際 Fisher らの報告においては、腸間膜脂肪組織を検討してはいないものの、その他の臓器の中では LRP1 を高発現している肝臓組織が最も高い検出量であった。Moguilevsky らは、静脈投与した LF は、その 90%以上がわずか5分間のうちに肝臓に集積することが報告している⁵⁹⁾。これは血流に乗った LF が肝臓を通過する際、LRP1 にトラップされるためと思われる。我々も LF をマウスに静脈投与後、LF は大半が肝臓で検出され、腸間膜脂肪では検出限界以下であることを確認している (図 2-6、未発表データ)。すなわち LF は、LRP1 を高発現している組織を通過する際に、その組織に集積することが考えられ、経口投与の場合は腸間膜脂肪、静脈投与の場合は肝臓なのではないかと考えられた。

以上の結果から、ラットに LF を経口投与後、LF は代表的な内臓脂肪組織である腸間膜脂肪に主に集積することが明らかとなった (図 2-7)。第 1 章のヒト試験において LF の体脂肪低減作用が内臓脂肪組織において強く認められ、皮下脂肪では認められなかったのは、この体内動態の結果を反映している可能性が考えられた。

(A)



(B)

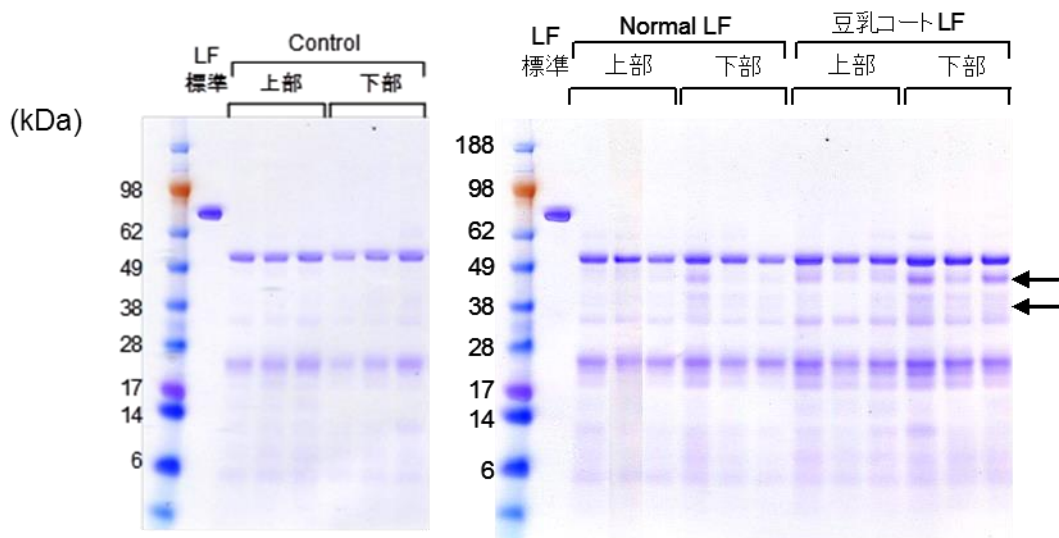


図2-1 C57BL/6Jマウスに100 mgの各種LFを投与し、1時間後に小腸内容物中のLFを定量した結果

(A) ELISAにて定量した結果

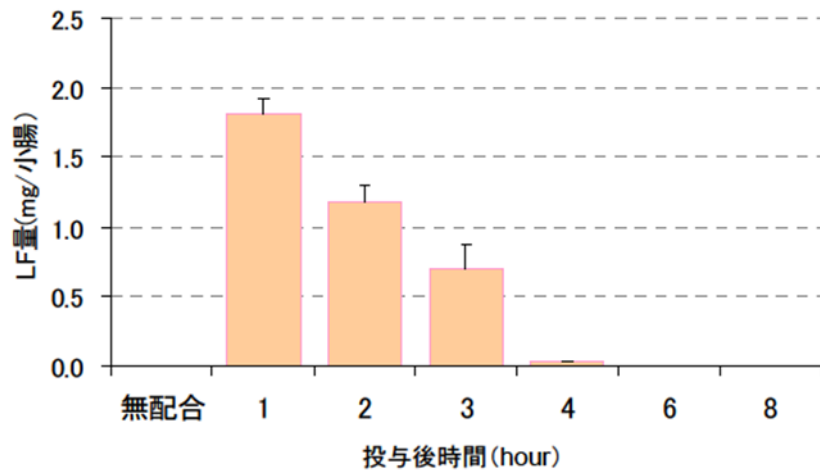
数値は平均値±標準偏差で示した、n=4-5.

統計解析はLFに対するt testを実施

*:P<0.05、+:P<0.1

(B) Control(無配合)、LF、豆乳コートLFをSDS-PAGEにて測定した結果

(A) 混餌投与



(B) ゾンデ投与

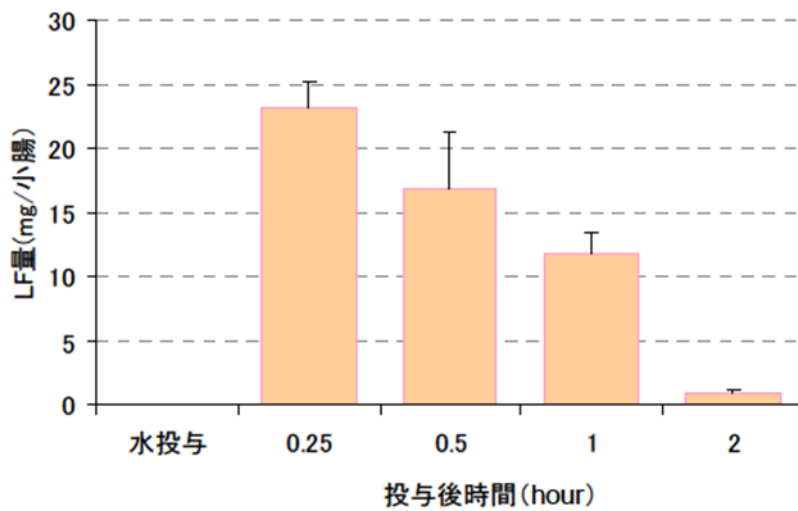


図2-2 C57BL/6Jマウスに100 mgのLFを投与後、小腸内容物中のLFをELISAにて定量した結果 (A)混餌投与、(B)ゾンデ投与
数値は平均値±標準偏差で示した、n=5.

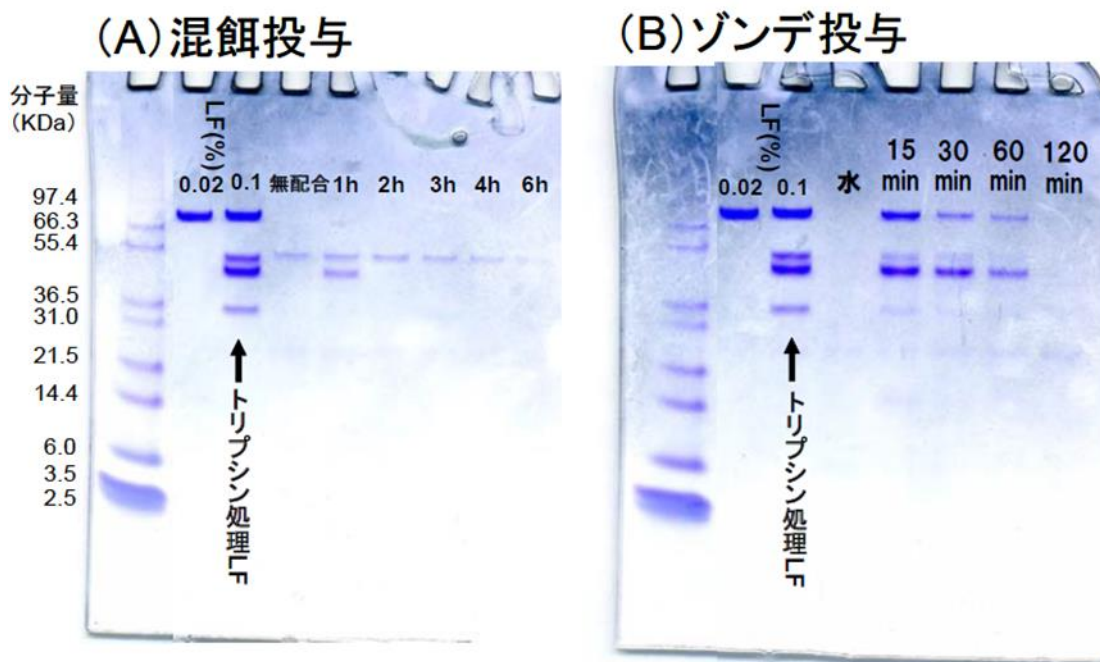


図2-3 C57BL/6Jマウスに100 mgのLFを投与後、小腸内容物中のLFをSDS-PAGEにて定量した結果 (A)混餌投与、(B)ゾンデ投与

各時間帯の試料は、各群の小腸内溶液を等量ずつ混合したものを用いた。また、各時間帯における個体毎の存在形態の解析により、個体によってバンドパターンがほぼ異なることを確認済みである。トリプシン処理LFは第2章第2節の実験方法で調製した。

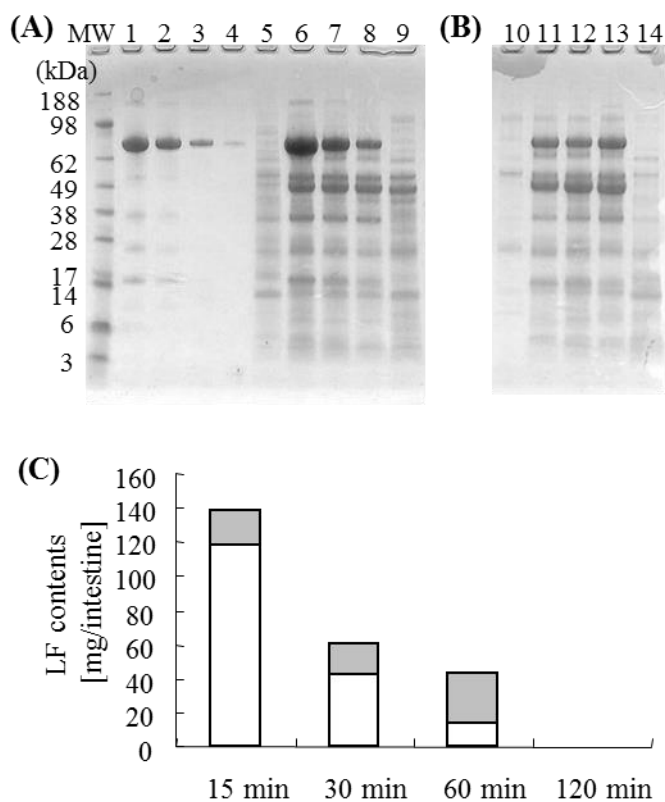


図2-4 SDラットに1000 mgのLFを強制経口投与後の小腸内容物中のLF定量結果 (A) (B) SDS-PAGEのゲル画像。N=8のサンプルをプールして泳動した。

MW: molecular weight marker

レーン1-4: LF standard 1, 0.5, 0.1, 0.02 mg/ml

レーン5-9: 胃の近位部分の小腸内容物

レーン5: 水投与 15 min後

レーン6-9: LF投与15 min, 30 min, 60 min, 120 min後

レーン10-14: 胃の遠位部分の小腸内容物

レーン10: 水投与15 min後

レーン11-14: LF投与15 min, 30 min, 60 min, 120 min後

(C): デンシトメーターによる全長LF定量結果、

□ 胃の近位部分の小腸内容物中のLF量

■ 胃の遠位部分の小腸内容物中のLF量

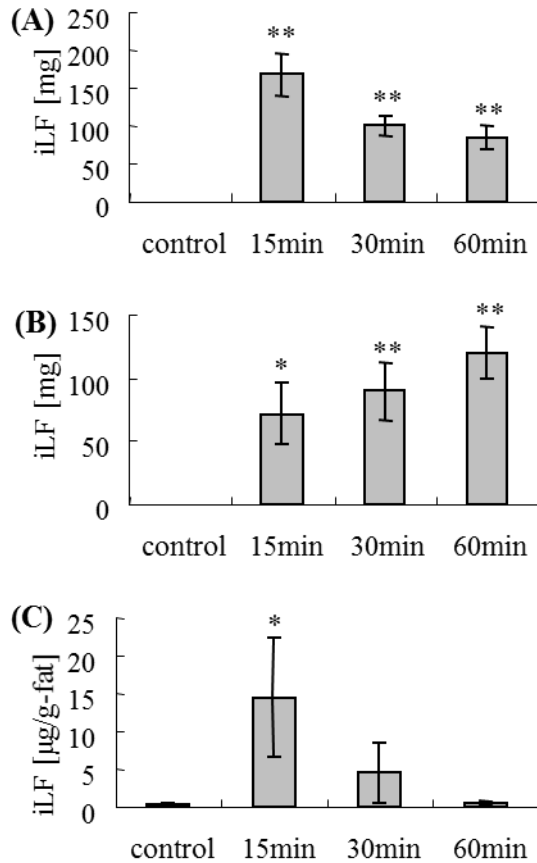


図2-5 SDラットに1000 mgのLFを強制経口投与後、ELISAにて免疫的に活性の有るラクトフェリン (iLF) を定量した結果

(A) 胃の近位部分の小腸内溶液定量結果

(B) 胃の遠位部分の小腸内溶液定量結果

(C) 腸間膜脂肪定量結果

Controlラットは蒸留水を投与15 min 後のデータ
 数値は平均値±標準誤差で示した、n=8.

統計解析はcontrolに対するDunnett testを実施

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

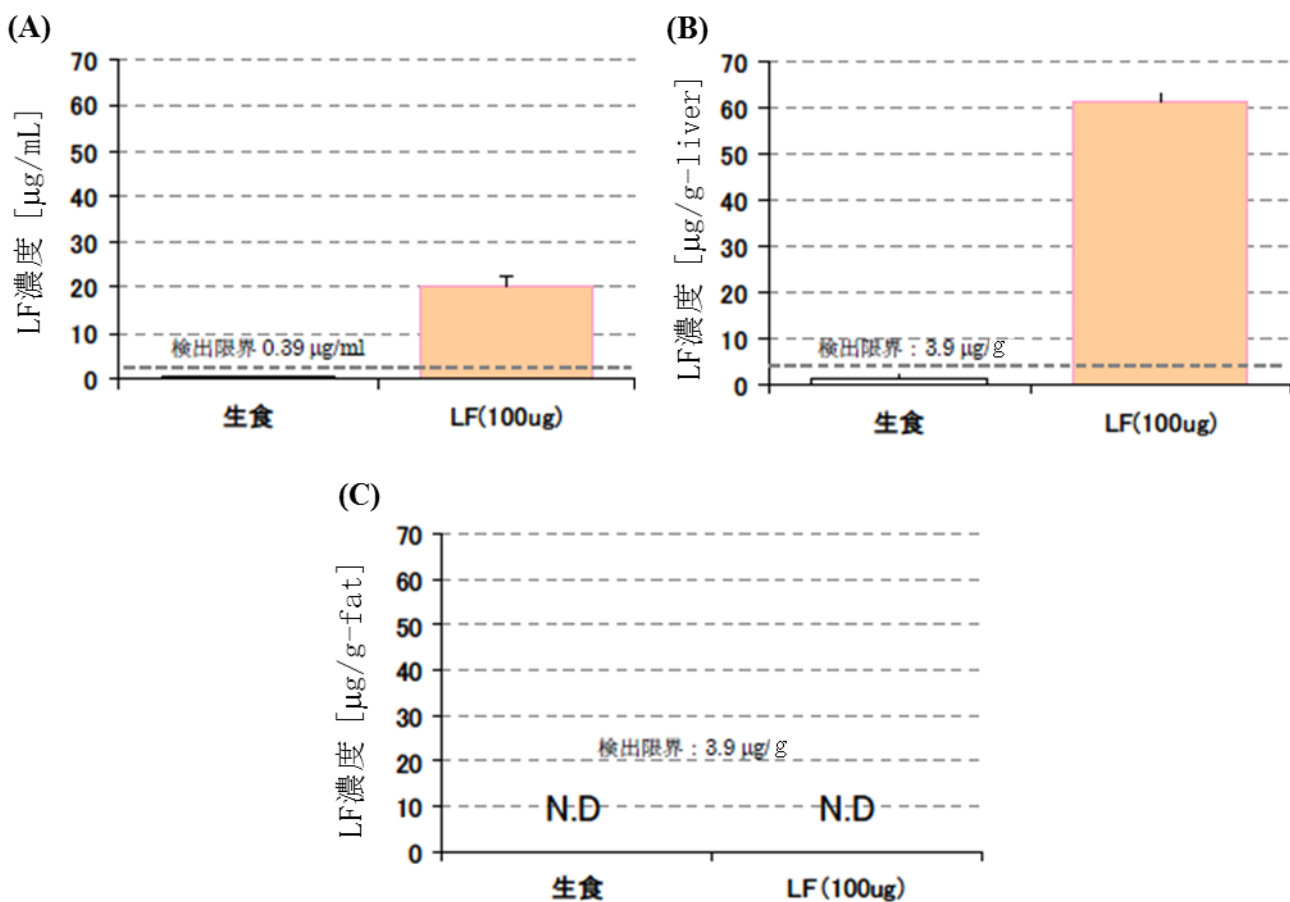


図2-6 C57BL/6Jマウスの微静脈に100 μgのLfを投与30分後、ELISAにて免疫的に活性の有るラクトフェリン(iLF)を定量した結果

- (A) 血清定量結果
- (B) 肝臓定量結果
- (C) 腸間膜脂肪定量結果

数値は平均値±標準誤差で示した。生食投与群n = 5、LF 投与群n=4

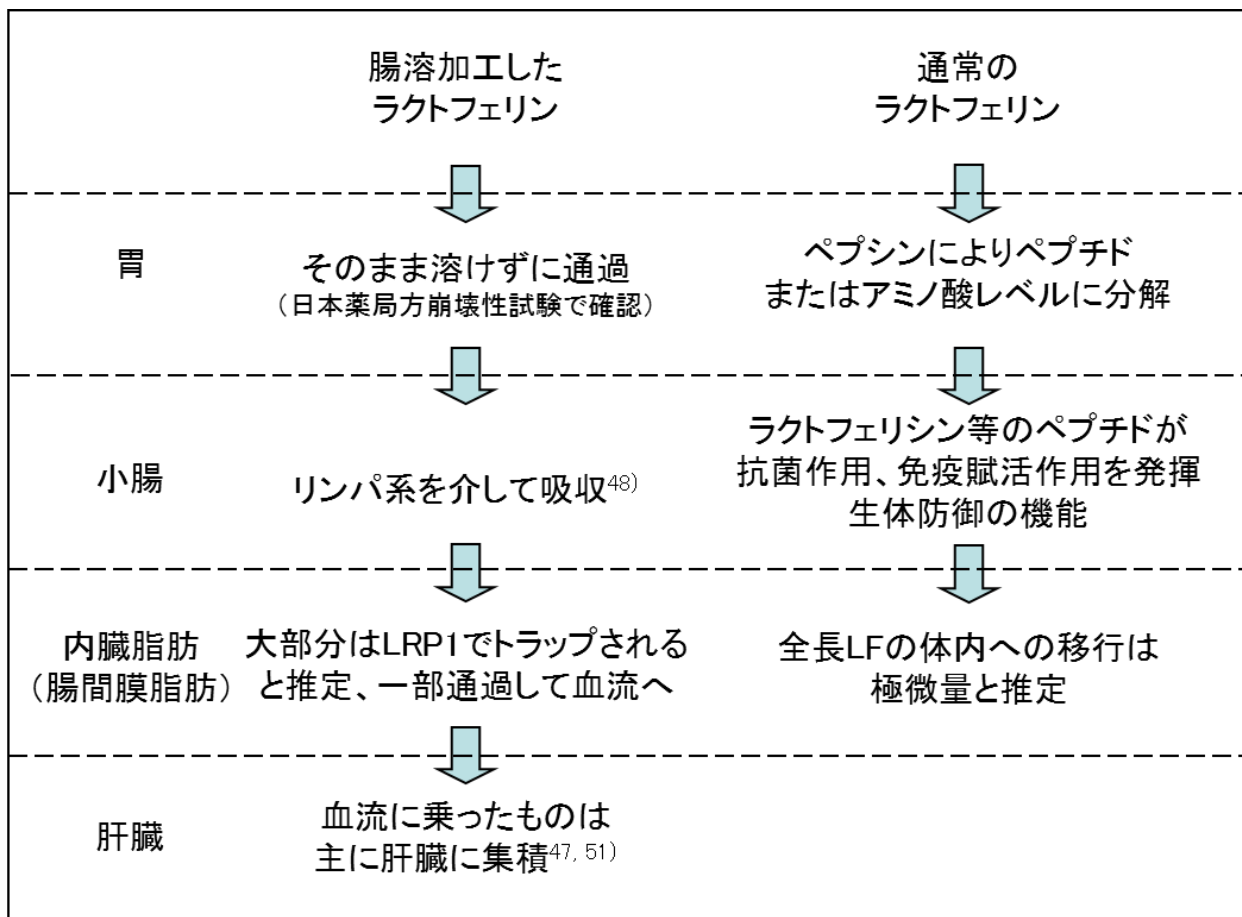


図2-7 ラクトフェリンの体内動態

第2章

腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果の 作用機序に関する検討

第2節

脂肪細胞に対するラクトフェリンの作用

序

第1節では経口投与後の LF の体内動態の結果を示し、LF が内臓脂肪に到達していることから、脂肪細胞に何らかの作用を示す可能性が考えられた。脂肪組織は主に脂肪細胞から構成されており、脂肪細胞の中には脂肪が油滴として貯蓄されている。エネルギーが必要になった場合には、脂肪が分解されて脂肪酸とグリセリンになり、血流に乗って筋肉や肝臓へと供給されて、 β 酸化や TCA 回路により代謝されエネルギーとなる。またカロリーを過剰に摂取した場合には、細胞内で脂肪を合成し、過剰なエネルギーを脂肪という形で蓄える。脂肪組織の重量は、脂肪の合成と分解のバランスによって決定される。したがって、LF によって内臓脂肪の重量が減少したということは、LF が脂肪の合成あるいは分解に何らかの作用を示した可能性が考えられた。そこで第2節では、脂肪細胞の脂肪合成と脂肪分解に対する LF の作用について述べる。

一般に、脂肪細胞を用いた実験は 3T3-L1 という株化された前駆脂肪細胞が汎用されている。本細胞はマウスの胎児から分離された細胞だが詳細な由来は不明である。また 3T3-L1 の成熟脂肪細胞への分化誘導にはデキサメタゾンなどの合成化合物が必要である。一方、近年清水らはラット腸間膜脂肪組織に含まれる間質血管細胞 (stromal-vascular cell) から前駆脂肪細胞を単離し、天然の脂質などを分化因子として成熟脂肪細胞へと誘導する技術を報告し⁶⁰⁾、脂肪細胞分化培地がプライマリーセル社から販売された。本培養システムでは、成熟脂肪細胞への分化誘導率は 80 %以上と、3T3-L1 細胞より高い分化誘導率を示し、また、脂肪細胞の主要な分化誘導因子 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) のアゴニストとして知られるチアゾリジン系薬剤への応答性も、3T3-L1 とは異なることが報告された⁶¹⁾。第1章で述べたヒト試験では、LF の脂肪低減作用は特に内臓脂肪において強かったことから、脂肪細胞の由来は重要である可能性が考えられた。従って、今回の評価においては、清水らが報告した方法に準拠し、腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞の初代培

養系を用いて実験することとした。

また検討にあたり、インタクトな **LF** だけでなく、ペプシンで分解した **LF** も評価することとした。**LF** の代表的な作用である抗菌作用や免疫賦活作用に関しては、胃で分解されて生じた分子量約 **2 kDa** のラクトフェリシンという断片に、**LF** 以上の強力な作用があることが報告されている^{52, 62)}。従って脂肪細胞への作用に関しても、ペプシンで分解されたものにも活性が存在する可能性が考えられた。そこで脂肪細胞への作用の活性本体を見極めるため、ペプシンで分解した **LF** の作用についても併せて述べる。

実験材料と方法

供試動物

SD ラット（雄性、8 週齢）を、日本エスエルシーより購入し、温度 23 度、12 時間の明暗サイクル（AM7:00 に点灯、PM7:00 に消灯）で飼育し、固形餌（CE2, 日本クレア）と水道水を自由摂取させた。1 週間の馴化期間の後、腸間膜脂肪組織の採取を行った。なお本実験はライオン株式会社動物実験委員会にて承認された上で実施した。

LF 分解物の調製

LF は DMV International 社（Veghel, The Netherlands）から純度約 98% のものを購入して使用した。

LF のペプシン分解物の調製は富田らの文献⁶²⁾を基に実験を行った。5%LF 水溶液を調製し、塩酸を使用して pH を 2.5 に調整後、ペプシン（162-20752、和光純薬）を終濃度 450 units/mL となるよう添加し、添加前、3 min、10 min、0.5 hr、1.5 hr、4 hr、7 hr、1 day 後にサンプリングした。細胞実験に用いるサンプルは 1 day 反応させたものを使用した。反応終了後、80°C 15 min 加熱して酵素を失活させ、氷冷後、NaOH で pH を 7.0 に調整し、3000 rpm、30 min 遠心分離した上清を回収して凍結乾燥を行い、LF のペプシン分解物を得た。

LF のトリプシン分解物の調製は、5%LF 水溶液を調製し、NaOH を使用して pH を 7.0 に調整した。トリプシン（trypsin DPCC treated typeXI From bovine Pancreas T1005-250MG、Sigma-Aldrich）を終濃度 1500 units/mL となるよう添加し、添加前、3 min、10 min、0.5 hr、1.5 hr、4 hr、1 day、3 day 後サンプリングした。細胞実験に用いるサンプルは、反応時間を 1 day に設定し、反応終了後、凍結乾燥を行って、LF のトリプシン分解物を得た。

SDS-PAGE による LF の分解パターンの確認は、NuPAGE 4-12 % Bis-Tris gel (NP0342BOX、Invitrogen) を購入し、MES ランニングバッファーを用いて行った。

ラット腸間膜脂肪由来の前駆脂肪細胞の調製および培養方法⁶⁰⁾

SD ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈切断による安楽死後、腸間膜脂肪組織を摘出した。摘出組織を氷冷した生理食塩水に浸し血液や毛を洗浄し、1%抗生物質を含む PBS 中でさらに組織の洗浄・リンパの除去を行った。眼科鉗にて組織の切断を行い、1 mg/mL のコラゲナーゼ (Collagenase S-1、新田ゼラチン) を添加した PBS 溶液で 37°C、40 分間、数分おきに攪拌しながら組織を分散した。100 μm のポアサイズのセルストレーナーで濾過後、DMEM を添加して、800 rpm、10 分間遠心分離を行った。上層の油層をアスピレーターで除去後、再度懸濁し 70 μm のポアサイズセルストレーナーで濾過した。800 rpm で 15 分遠心し、ペレットを確認し上清を除去した。沈殿を再度 DMEM で懸濁し、800 rpm で 15 分遠心し上清を除去した。得られた沈殿物を内臓脂肪分化用培地 (VACMR、プライマリーセル株式会社) にて静かに懸濁し、細胞数を計測後、 $1.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ となるように細胞懸濁液をコラーゲン (CellmatrixType I-C、新田ゼラチン) でコートした 24well プレートに播種した。2 日毎に培地を交換し 6 日~7 日程度培養することで、成熟脂肪細胞へと分化誘導を行った。

脂肪合成抑制作用の検討

LF の脂肪合成抑制作用を検討する際には培養開始時から、30, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ の LF、ペプシン分解 LF、トリプシン分解 LF、1000 $\mu\text{g/mL}$ のトランスフェリン (T1408, Sigma-Aldrich)、1000 $\mu\text{g/mL}$ の bovine serum albumin (A4503-50G, Sigma-Aldrich) を添加し、7 日間培養した。細胞の増殖と脂肪滴の観察は位相差顕微鏡 (IM-2、オリンパス) を用いて行った。また細胞増殖の評価はアラマーブルーアッセイ (DAL1100、Invitrogen) にて行っ

た。脂肪滴は、細胞を10%ホルマリン溶液で固定後、オイルレッド O (154-02072、和光純薬) にて染色して顕微鏡で観察した。さらにイソプロパノールを用いて色素の抽出を行い、溶出した色素を 550 nm の吸光度で測定して定量した。

DNA マイクロアレイ解析は、GeneChip®を用いて行った。脂肪細胞の培養は前述の方法に従い調製したが、DNA マイクロアレイ解析用のサンプルを調製する際には、25 cm² フラスコ (住友ベークライト) を使用し、培養開始から 300 µg/mL の LF を添加し 4 時間、1 日、3 日、5 日後に PBS で細胞を洗浄後、セルスクレーパーにて細胞を回収した。コントロールは LF 無添加とし、同じ時間に細胞を回収した。Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) を用いて cDNA へと逆転写し、IVT Labeling Kit (Affymetrix) を用いて biotin ラベルした cRNA を合成した。cRNA は GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリダイズし、アレイデータは GeneChip® 3000 Scanner、GeneChip® Operating Software、Expression Console (Affymetrix) にて解析を行った。

RT-PCR による遺伝子発現の解析に用いた脂肪細胞は、前述の培養方法に従ったが、細胞の回収時間を培養開始から 1, 3, 5 時間目、1, 2, 3, 5, 7 日目とした。Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ReverTra Ace® kit (Toyobo) を用いて逆転写を行った。定量的リアルタイム RT-PCR は MyiQ™ Single color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) を用いて行い、C/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ、PPARγの遺伝子発現量を SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo) にて解析し、遺伝子の発現量は HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) に対する相対発現量の値を算出して解析した。なお、C/EBPα (QT00395010)、C/EBPβ (QT00366478)、C/EBPδ (QT00368599)、PPARγ (QT00186172)、HPRT1 (QT00365722) の PCR プライマーは QuantiTect Primer Assay (Qiagen) から購入した。

脂肪分解促進作用の検討

LF の脂肪分解促進作用を検討する際には、6 日間培養して成熟脂肪細胞へと分化誘導後、100, 300, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LF、ペプシン分解 LF、10 μM の L-イソプロテレノール (195263, MP Biomedical Japan)、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の bovine serum albumin (A4503-50G, Sigma-Aldrich) を添加し、24 時間または 48 時間培養した。脂肪分解活性は、培養上清中のグリセロール濃度を F-キットグリセロール (148270, Roche) にて測定した。

DNA マイクロアレイ解析は、3D-Gene™を用いて行った。脂肪細胞の培養は前述の方法に従ったが、DNA マイクロアレイ解析用のサンプルを調製する際には、25 cm^2 フラスコ (住友ベークライト) を使用し、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LF を添加してから 24 時間後に PBS で細胞を洗浄後、セルスクレーパーにて細胞を回収した。コントロールは LF 無添加とした。Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、抽出した RNA の品質は 2100 Bioanalyzer (Agilent) で確認し、18s:28s ribosomal RNA ratio が 2 以上のものを使用した。0.5 μg の total RNA を Amino Allyl Message Amp™ II aRNA Amplification Kit (Applied Biosystems) を用いて増幅し、Cy3 または Cy5 でラベル化を行った。それぞれのサンプルを 3D-Gene™ Rat Oligo chip 12K (東レ) に 37°C、16 時間ハイブリダイズ後、洗浄、乾燥した。Cy3 と Cy5 のシグナルは Scan Array Express (PerkinElmer) を用いて検出し、画像解析は GenePix Pro (Molecular Devices Inc) を用い、ノーマライゼーションしたデータに対して行った。Gene ontology 解析は Affymetrix NetAffix Gene Ontology analysis を用い、パスウェイ解析は Ingenuity® Pathway Analysis systems (Ingenuity Systems) を用いて行った。

RT-PCR による遺伝子発現の解析に用いた脂肪細胞は、前述の培養方法に従い調製したが、細胞の回収時間を 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LF を添加してから 24 時間とした。Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ReverTra Ace® kit (Toyobo) を用いて逆転写を行った。定量的リアルタイム RT-PCR は MyiQ™ Single color Real-Time PCR

Detection System (Bio-Rad Laboratories) にて行い、perilipin、PPAR γ の遺伝子発現量を SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo) を用いて解析し、遺伝子の発現量は Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 に対する相対発現量の値を算出して解析した。なお、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (QT00365722) の PCR プライマーは QuantiTect Primer Assay (Qiagen) から購入し、perilipin、PPAR γ 、PPAR γ 2 のプライマー配列は表 2-1 に示した。

細胞内 cAMP 濃度測定に用いた脂肪細胞は、前述の培養方法に従い調製したが、細胞の回収時間を 1000 μ g/mL の LF を添加してから 1, 24 時間とした。cyclic AMP Complete kit (Assay Designs) 添付のプロトコルに従って、細胞内の cAMP を抽出し、cAMP 濃度を測定した。

統計解析

脂肪合成抑制作用に関するデータは平均値と標準誤差で示し、脂肪分解促進作用に関するデータは平均値と標準偏差で示した。統計解析は one-way ANOVA または two-way ANOVA を実施後、t-test または Dunnett test を行った。有意水準は両側検定 5%未満とし、10%未満を有意傾向とした。解析ソフトは JMP version 5.0.1a または version 9.0.2 (SAS Institute Inc.) を用いた。

表2-1 PCRプライマー

Gene	Forward primer	Reverse primer
perilipin	GAGGGGCTGATCTGGCTTTG	GCATCTTTTGCCGTCCTGAA
PPAR γ	TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG	TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG
PPAR γ 2	GATCCTCCTGTTGACCCAGA	AGCTGATTCCGAAGTTGGTG

結果 1. LF の脂肪合成抑制作用について

LF の脂肪合成抑制作用

ラット腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞を単離し、300 µg/ml の LF の存在下または非存在下で培養した。図 2-8 には位相差顕微鏡で観察した結果を示す。LF 非存在下では培養開始後、前駆脂肪細胞は増殖を続け、4 日後にコンフルエントに到達し、その後脂肪滴を合成した。一方 LF を添加した細胞は、無添加と同様に増殖を続けてコンフルエントに到達した。アラマーブルーアッセイにおいても同様の結果であった (図 2-9)。一方、コンフルエントに到達後、LF は明らかに脂肪滴の合成を抑制していた。

LF の消化酵素による分解挙動と脂肪合成抑制作用への影響

ペプシンまたはトリプシンでの LF の分解挙動を、反応開始 3 分後～24 時間後まで SDS-PAGE にて確認した (図 2-10)。ペプシンによる分解では、LF は 3 分後には全長のバンドが消失し、その後分解が進み 24 時間後には 20kDa 以下のペプチドが大半を占めた。一方トリプシンによる分解では、ペプシンによる分解と比較して緩やかに反応が進み、限定的な分解であった。反応 24 時間後のサンプルを脂肪細胞の実験に供した。

図 2-11 には、LF またはその消化酵素による分解物の脂肪合成抑制作用を示した。LF、トリプシンで分解した LF は濃度依存的な脂肪合成抑制作用が認められた。一方、ペプシンで分解した LF は、脂肪の分解促進作用は認められなかった。なお、可溶性タンパク質の代表として BSA、トランスフェリンファミリーのタンパク質としてトランスフェリンについても評価したが、脂肪合成抑制作用は認められず、本作用は LF に特徴的なものであることが示された。

LF の脂肪合成抑制作用の作用機序

表 2-2 には培養 5 日目の細胞から RNA を回収し、DNA マイクロアレイ解析を行った結果を示す。グルコーストランスポーター、解糖系、TCA サイクル、脂肪酸合成、中性脂肪合成、脂肪酸トランスポーター、acyl-CoA 合成酵素など、脂肪合成に関連する 100 の遺伝子を選抜し、発現変動を解析した。その結果これらの遺伝子のうち 63 %もの遺伝子発現が LF 添加により減少しており、これらの遺伝子発現抑制作用が、脂肪合成抑制作用に繋がっていることが示唆された。次に前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に重要な転写因子について、遺伝子発現の変動を解析した (表 2-3)。その結果、初期の分化制御因子である C/EBP β は 5 日後に、C/EBP δ は 4 時間と 5 日後に遺伝子発現の減少が認められた。また、主要な分化制御因子である C/EBP α は 3 日後と 5 日後に、PPAR γ は 4 時間、3 日後、5 日後に遺伝子発現の減少が認められた。分化制御因子に関しては、RT-PCR による確認を行ったが、C/EBP δ は 3 時間後と 5 時間後、C/EBP α と PPAR γ は 3 日後、5 日後、7 日後に有意な遺伝子発現の減少が認められ、DNA マイクロアレイの解析結果が正しいことを確認した (図 2-12)。以上の結果から、LF の脂肪合成抑制作用は、脂肪細胞の分化が抑制された結果であることが強く示唆された。

結果 2. LF の脂肪分解促進作用について

LF の脂肪分解促進作用

LF の脂肪分解促進作用を検討するに際しても、ラット腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞の初代培養系を用いて検討を行ったが、合成抑制作用の検討時とは異なり、今回は成熟脂肪細胞へと分化誘導を行った後に、100, 300, 1000 $\mu\text{g/ml}$ の LF またはペプシン分解した LF を添加した。ポジティブコントロールとしては、 β 受容体のアゴニストであり、脂肪分解促進作用が知られている L-イソプロテレノールを、ネガティブコントロールとしては代表的な可溶性タンパク質である BSA を使用した。脂肪は分解されると、1分子のグリセロールと、3分子の遊離脂肪酸になり、これらをアッセイすることで脂肪の分解活性が測定される。ただし、今回の培養に使用している培地中には遊離脂肪酸が含まれていることから、グリセロールを測定することとした (図 2-13)。コントロールのグリセロール濃度は時間と共に上昇していることから、本評価系において何も添加しなくてもある程度の脂肪の分解促進作用が認められた。L-イソプロテレノールを添加した培養上清では、コントロールと比較して 3 倍程度のグリセロール濃度の上昇が認められたことから、評価系の妥当性が検証された。一方、LF に関しては、濃度、時間依存的にグリセロール濃度の上昇が認められたことから、LF も脂肪細胞に対する脂肪の分解促進活性を有することが明らかとなった。ペプシンで分解した LF に関しては、グリセロール濃度の上昇が認められなかったことから、脂肪の分解促進活性が消失することがわかり、脂肪の合成抑制作用と同様の結果となった (図 2-14)。なお、ネガティブコントロールである BSA についてもグリセロールの濃度上昇は認められなかった。

LF の脂肪分解促進作用の作用機序

LF の脂肪分解促進作用の作用機序仮説の構築に向けて、LF 添加 24 時間後の細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。今回の DNA マイクロアレイ解析では、東レから販売されている 3D-Gene™ を用いることとした。取扱説明書によると、このチップは約 12000 種の遺伝子を搭載したもので、検出部に柱状の凸凹構造をもち、その柱の上端面にプローブ DNA が固定化されている。これによりスポット形状が安定化し、均一な検出画像が得られる。また、その凸凹構造を利用したビーズ攪拌を行うことにより、プローブとターゲットの反応性を向上させているとのことである⁶³⁾。遺伝子発現の増減の閾値を 1.5 倍に設定して解析した結果、LF 添加によって遺伝子発現量が増加したものが 1032 因子、減少したものが 1037 因子存在した。

そこでまず、Affymetrix NetAffix™ Gene Ontology analysis system を用いて Gene Ontology 解析を実施した。“lipid catabolic process”の Gene Ontology を有する変動因子の DNA マイクロアレイ解析結果を表 2-4 に示した。ラットで“lipid catabolic process”の Gene Ontology を有する遺伝子は 70 遺伝子存在し、そのうち 48 遺伝子が 3D-Gene™ に搭載されていた。その中で LF の添加により発現が増加した遺伝子が 3 因子、減少した遺伝子が 4 因子存在した。これら 7 遺伝子のうち、LF による脂肪分解促進作用に関与する可能性がある遺伝子として、ペリリピンに着目した。ペリリピンは脂肪滴の表面に存在し、通常の状態ではリパーゼによる脂肪の分解から防護する役割を持つが⁶⁴⁾、LF 添加によって signal log ratio が-1.2 に減少していた。ペリリピンの転写制御因子は PPAR γ であることが報告されていることから^{65,66)}、本遺伝子の発現量についても調べた結果、signal log ratio が-0.58 に減少しており、ペリリピン遺伝子の発現量の減少は、PPAR γ 遺伝子の発現量減少に起因している可能性が示唆された。これらの遺伝子発現量の低下については、定量的 RT-PCR により、DNA マイクロアレイ解析の結果が正しいことを確認している（図 2-15）。

次に、脂肪分解酵素であるリパーゼ類の遺伝子発現量について検討した（表 2-4）。“lipid catabolic process”の Gene Ontology を有する遺伝子の中でリパーゼは 25 種類存在し、さらに monoglyceride lipase を加えた 26 種類について調査したが、その中で発現量の増加が認められたのは cytosolic phospholipase A2 と phospholipase C-beta-1 の 2 種類のみであった。脂肪細胞の中で重要な役割を担っているリパーゼは、adipocyte triglyceride lipase (ATGL)、hormone-sensitive lipase (HSL)、monoglyceride lipase (MGL)であることが報告されているが⁶⁷⁾、ATGL は本アレイ上には搭載されておらず、また HSL は検出されなかった。一方で、MGL は LF 添加によって遺伝子発現量が減少していた。これらの結果から、LF の脂肪分解促進作用に関しては、少なくともリパーゼ類の遺伝子発現上昇作用を介した結果ではないことが示唆された。

さらに我々は、Ingenuity® Pathway Analysis software を用いてパスウェイ解析を行った。解析対象は LF 添加で 1.5 倍以上の発現変動を示した 2069 遺伝子とし、有意に変動したパスウェイ ($P < 0.05$) として 77 パスウェイが選抜された。これらのパスウェイの中で、我々は cAMP signaling pathway に着目した ($P = 0.0025$)。成熟脂肪細胞内において cAMP 濃度が上昇すると、PKA が活性化され、ペリリピンと HSL がリン酸化される⁶⁸⁾。リン酸化されたペリリピンは abhydrolase domain containing 5 から脱離し、ATGL が活性化され、活性型に変化した ATGL と HSL によって脂肪が分解されることが報告されている⁶⁹⁾。cAMP signaling pathway に属する遺伝子は、3D Gene™上に 142 遺伝子存在し、そのうち 25 遺伝子が 1.5 倍以上の変動を示していた（表 2-5）。例えば、ATP を cAMP に変換する酵素⁷⁰⁾である Adenylate cyclase type 5 の signal log ratio が 0.63 に増加し、adenylate cyclases の負の制御因子である calcineurin subunit B isoform 1 と adenosine A1 receptor の signal log ratio がそれぞれ-0.76, -0.84 に減少していた。これらの結果は、LF 添加によって細胞内 cAMP 量が上昇する可能性を示す結果であった。そこで、LF またはイソプロテレノールを添加してから、1 時間後及び 24 時間後の細胞を回収し、細胞内 cAMP 量を測定

した (図 2-16)。その結果、ポジティブコントロールである L-イソプロテレノールでは添加 1 時間後に顕著に cAMP 量が上昇するのに対し、LF は添加 24 時間後に cAMP 量が上昇することが明らかとなった。

考察

LF の脂肪合成抑制作用について

LF の脂肪細胞への作用を検討するに際し、ラット腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞の初代培養系にて評価した結果、まず脂肪の合成抑制作用が認められた。我々がデータを取得したのと同じ頃に、2つの研究グループから LF の脂肪合成抑制作用が報告された。Yagi らは、マウス頭蓋冠から単離した前駆脂肪細胞 (MC3T3-G2PA6) ⁷¹⁾ を成熟脂肪細胞へと分化する過程で LF を添加すると、脂肪滴陽性の細胞数が減少することを見出すと共に、脂肪細胞の分化の主要な制御因子である、PPAR γ 、C/EBP α の遺伝子発現が、LF 濃度依存的に抑制されることを報告している ⁷²⁾。また Moreno-Navarrete らは、マウス胚由来前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を用いて実験を行い、Yagi らと同様、LF の脂肪蓄積抑制効果や、PPAR γ の遺伝子発現抑制作用を報告している ⁷³⁾。これらのデータは脂肪細胞の由来が異なっても、LF の脂肪合成抑制作用は保持されていることを示唆している。事実、我々が用いている初代培養系にて、腸間膜脂肪だけでなく、皮下脂肪、精巣周囲脂肪由来の前駆脂肪細胞に対して、LF の脂肪合成抑制作用を評価したところ、腸間膜脂肪由来の細胞と同様、脂肪合成抑制作用が認められた (図 2-17, 18、未発表データ)。これらの結果から、LF の脂肪合成抑制作用には、脂肪細胞の由来は関係が無い様に思われた。ヒト試験において内臓脂肪においてより顕著な脂肪減少効果が認められたのは、前章で示した体内動態の結果、すなわち経口投与後、LF は内臓脂肪に主に集積することを反映しているものと考ええる。

我々が行った遺伝子発現解析の結果では、LF 添加により PPAR γ や C/EBP α の遺伝子発現が減少するという点で、Yagi ら、Moreno-Navarrete らと同様の結果であった ^{72, 73)}。PPAR γ や C/EBP α は脂肪細胞の分化のマスターレギュレーターと言われているが、その遺伝子発現は初期制御因子である C/EBP β や C/EBP δ に制御されていることが報告されている ⁷⁴⁾。3T3-L1 細胞においては、インスリンやデキサメタゾンなどの分化刺激に応じて、こ

これらの初期制御因子の発現は 4 時間後にピークを迎えることが報告されている。また C/EBP β を強発現させると、分化誘導因子を添加しなくても脂肪細胞の分化が誘導されるが、C/EBP δ の強発現ではそれが認められないことも報告されている。このことから 3T3-L1 においては、初期制御因子として C/EBP β の方がより重要であると考えられる。我々の実験系においても、C/EBP β と C/EBP δ の一過的な遺伝子発現上昇は認められたが、興味深いことに C/EBP δ の方がその上昇率は顕著であり、LF の遺伝子発現抑制効果が認められたのも C/EBP δ であった。この結果から、ラット腸間膜脂肪由来前駆脂肪細胞を用いた評価系においては、初期制御因子として C/EBP δ の方が重要であると思われた。これらの結果の相違については、細胞の由来や、分化因子などの違いに起因するものと考えられた。

DNA マイクロアレイ解析結果から、LF レセプターとして知られる LRP1 が前駆脂肪細胞に発現していることも明らかとなった（表 2-6、未発表データ）。食事によって摂取された脂質はカイロミクロンレムナントとして血液中を運搬され、肝臓において LRP1 によって取り込まれることが報告されている⁷⁵⁾。Crawford と Borensztajn は、マウスにおいて LF がカイロミクロンの取り込みを抑制することを報告している⁷⁶⁾。LRP1 は内臓脂肪組織にも発現し、食後の脂質の取り込みに関与することも報告されていることから⁵⁷⁾、LF は LRP1 を介して内臓脂肪における脂質取り込みを抑制していることが考えられた。一方、LRP1 は脂質取り込みに関与する受容体としての作用だけでなく、シグナル伝達を行う受容体としての作用も報告されている。Grey らは LRP1 を介した p42/44 MAPK パスウェイの活性化による骨芽細胞の増殖促進作用が、LF の骨強化作用に関与していることを推察している⁷⁷⁾。MAPK パスウェイの活性化は PPAR γ の発現や活性の抑制に関与することが報告されていることから^{78,79)}、脂肪細胞においても LF が MAPK などの LRP1 シグナルを活性化し、脂肪細胞分化を抑制していることが考えられた。C/EBP δ の関与や、LRP1 の関与など、LF の脂肪細胞分化抑制作用の解明には更なる研究が必要である。

LFはタンパク質であることから、経口摂取すると胃においてペプシンなどの消化酵素で分解される。LFの抗菌作用や免疫賦活作用に関しては、胃で分解されて生じた分子量約2kDaのラクトフェリシンという断片に、LF以上の強力な作用があることが報告されている⁵²⁾。このことから、脂肪合成抑制作用についても、胃で分解されたLFに活性がある可能性も考えられたため、消化酵素で分解したLFの脂肪合成抑制効果を検討した。その結果、小腸の主要な消化酵素であるトリプシンで分解したLFについては、脂肪合成抑制作用は残存するものの、胃の消化酵素であるペプシンで分解したLFは活性が消失することを確認した(図2-7)。すなわち、LFをそのまま食品として摂取しても、脂肪合成抑制作用は期待できず、なんらかの工夫をして小腸まで届ける必要があることが強く示唆された。

LFの脂肪分解促進作用について

これまでに我々の検討も含め、LFが脂肪細胞の分化を制御することにより、脂肪合成を抑制することが複数報告されていた。しかしながら、少なくとも我々の知る限り、LFが脂肪の分解を促進することは未報告であり、本報告はLFの脂肪分解促進作用を示す最初の報告であると考えられる。また脂肪合成抑制作用と同様、脂肪分解促進作用においてもペプシンで分解したLFでは活性が消失したことから、脂肪細胞に対する活性本体はラクトフェリシンのような低分子ペプチドとは異なる可能性が考えられた。

次にLFの脂肪分解促進作用の作用機序を検討するため、DNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、①細胞内のcAMP濃度の上昇、②ペリリピンの遺伝子発現減少、の2つの仮説を設定した。そこでまず細胞内cAMP濃度について検討を行った。通常、イソプロテレノールなどのβ受容体アゴニストは添加後数十分～1時間程度の短時間で細胞内cAMP濃度を上昇させることが知られている。しかしながら、LFは添加24時間後でcAMP濃度を上昇させた。LFにβ受容体アゴニスト様作用が報告されていないことから、LFはイソプロテレノールとは異なる機構を介してcAMP濃度を上昇させ、脂肪分解を促進している

可能性が考えられた。cAMP 濃度が上昇すると、PKA の活性化を介して、HSL が活性化し、脂肪の分解が促進されることが報告されている⁶⁸⁾。DNA マイクロアレイ解析の結果では、HSL を含むリパーゼ類の遺伝子発現変動は認められなかった。したがって、LF はリパーゼの発現を調節するのではなく、活性を調節することにより、脂肪の分解を促進することが強く示唆された。

一方、脂肪滴の周囲に存在し HSL による脂肪滴の分解を防ぐペリリピンの発現が LF により抑制されることを、遺伝子レベルで検証した。本作用については、ペリリピンの遺伝子発現を制御する PPAR γ の発現が LF により抑制されることに起因しているものと考えられた。PPAR γ は LF の脂肪合成抑制作用のみならず、分解促進作用についても中心的な役割を担っているものと考えられた。

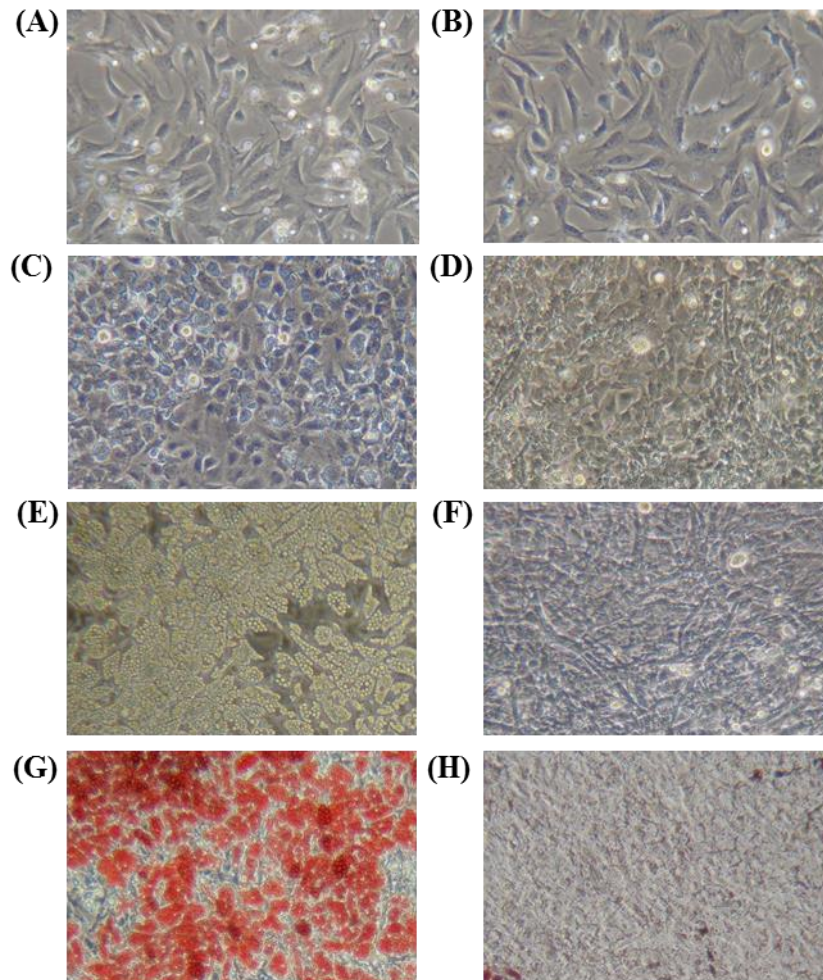


図2-8 位相差顕微鏡による脂肪細胞観察結果

前駆脂肪細胞はラット腸間膜脂肪組織より単離し、脂肪細胞分化培地にて培養を行った。培養開始時にLFを300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、Controlは無添加とした。

(A) control 2 d、 (B) LF 2 d

(C) control 4 d、 (D) LF 4 d

(E) control 6 d、 (F) LF 6 d

(G) control 7 d、 oil red O染色後

(H) LF 7 d oil red O染色後

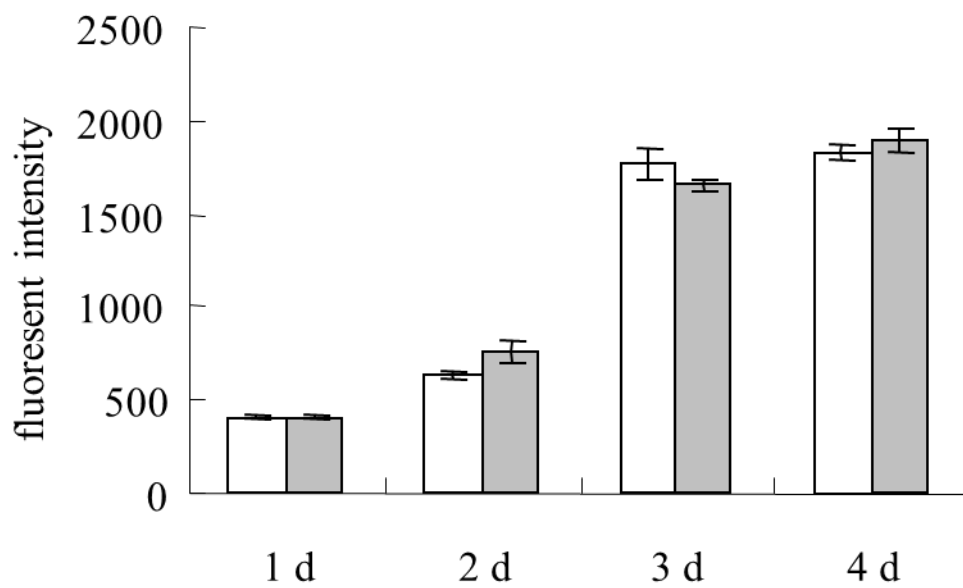


図2-9 脂肪細胞の増殖に対するLFの影響培養
 条件は図2-4と同様。
 Alamar blue assay を培養1, 2, 3, 4 dに実施。
 棒グラフ左側: control
 棒グラフ右側: 300 µg/ml LF
 結果は平均値±標準誤差で表示 (n=3).

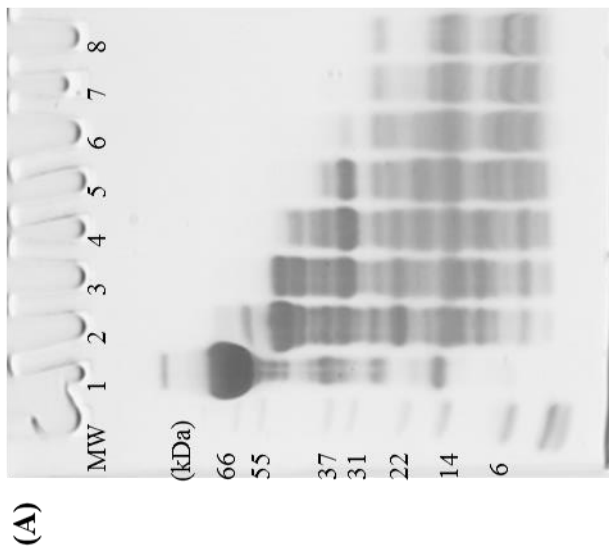
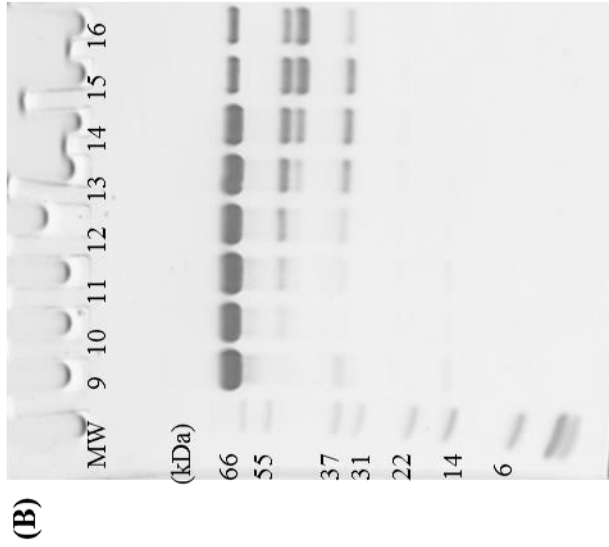


図2-10 消化酵素によるLFの分解挙動

(A) ペプシンでLFを分解時のSDS-PAGEゲル画像
タンパク質として64 μg をアブライ。

MW: 分子量マーカー
レーン1: 反応開始前
レーン2: 3 min
レーン3: 10 min
レーン4: 0.5 h
レーン5: 1.5 h
レーン6: 4 h
レーン7: 7 h
レーン8: 24 h



(B) トリプシンでLFを分解時のSDS-PAGEゲル画像
タンパク質として6.4 μg をアブライ。

レーン9: 反応開始前
レーン10: 3 min
レーン11: 10 min
レーン12: 0.5 h
レーン13: 1.5 h
レーン14: 4 h
レーン15: 24 h
レーン16: 72 h

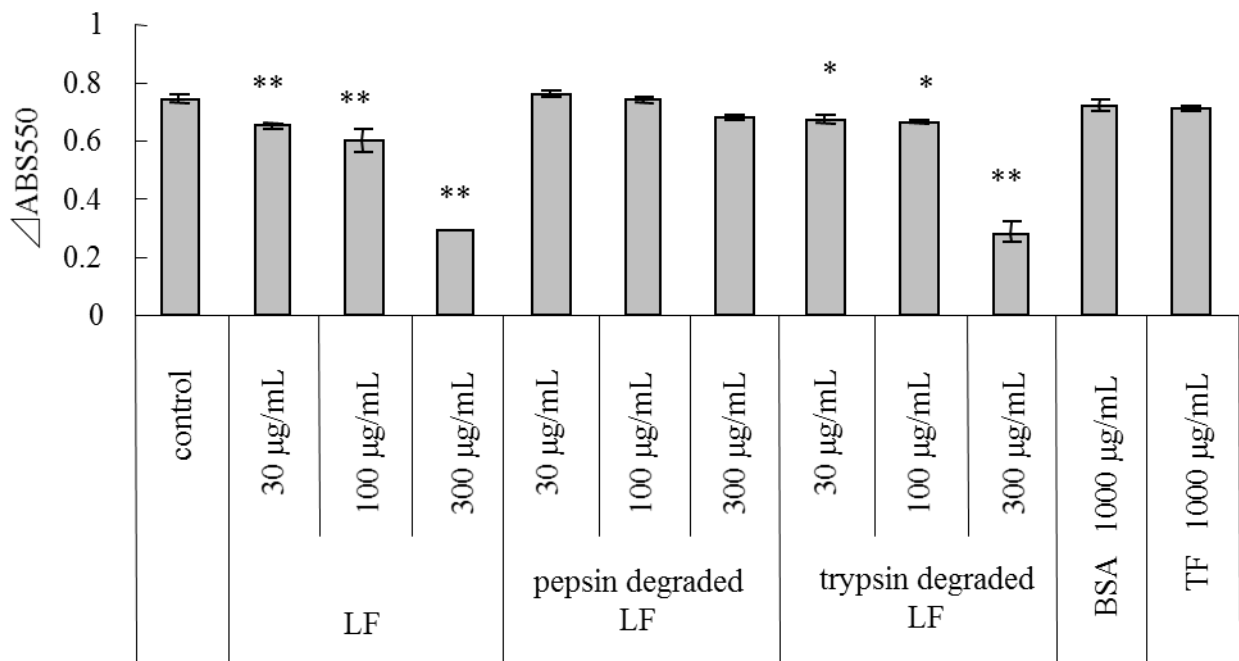


図2-11 LFおよびその分解物の脂肪合成抑制作用

培養7日後の細胞をoil red O染色し、定量した結果を示す。消化酵素による分解時間は24時間とした。Controlは無添加とし、可溶性タンパク質の代表例として bovine serum albumin (BSA)、トランスフェリンファミリーのタンパク質の代表例として transferrin (TF)も評価した。全てのサンプルは培養開始時に添加した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。統計解析はcontrolに対するDunnett testを実施した

*: P < 0.05, **: P < 0.01

表2-2 前駆脂肪細胞に対するLFの作用 培養5日目のDNAマイクロアレイの結果 (脂肪合成に関与するパスウェイを抜粋)

Function	Probe Set	RefSeq Transcript ID	Gene Title	Signal Log Ratio	Change
Glucose transporter Glycolysis	1367989_at	NM_012751	glut4	-4.9	D
	1367617_at	NM_012495	aldolase A	-1.0	D
	1370299_at	NM_012496	aldolase B	-1.0	NC
	1386998_at	NM_012497	aldolase C	-2.4	D
	1367575_at	NM_012554	enolase 1, alpha non-neuron	-1.0	D
	1370341_at	NM_139325	enolase 2, gamma, neuronal	0.2	NC
	1386907_at	NM_012949	enolase 3, beta, muscle	0.3	NC
	1368077_at	NM_012558	fructose-1,6- biphosphatase 1	2.6	NC
	1386944_a_at	NM_013098	glucose-6-phosphatase, catalytic	-0.3	NC
	1367557_s_at	NM_017008	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.5	D
	1387312_a_at	NM_012565	glucokinase	0.5	NC
	1368272_at	NM_012571	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	-0.4	NC
	1367819_at	NM_013177	glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial	0.3	NC
	1386929_at	NM_012734	hexokinase 1	-0.5	D
	1383519_at	NM_012735	Hexokinase 2	-2.9	D
	1367586_at	NM_017025	lactate dehydrogenase A	-1.4	D
	1370218_at	NM_012595	lactate dehydrogenase B	-1.7	D
	1387216_at	NM_017266	lactate dehydrogenase C	1.5	NC
	1367653_a_at	NM_033235	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	-1.3	D
	1369927_at	NM_031151	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	-1.0	D
	1372264_at	NM_198780	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	-0.2	NC
	1386917_at	NM_012744	pyruvate carboxylase	-3.7	D
	1371380_at	NM_001004072	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	-1.7	D
	1369429_at	NM_053994	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2	2.3	NC
	1371388_at	NM_001007620	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	-2.4	D
	1367743_at	NM_013190	phosphofructokinase, liver, B-type	-2.3	D
	1367864_at	NM_031715	phosphofructokinase, muscle	0.2	NC
	1372182_at	NM_206847	phosphofructokinase, platelet	0.2	NC
	1386864_at	NM_053290	phosphoglycerate mutase 1	-1.2	D
	1367951_at	NM_017328	phosphoglycerate mutase 2	1.2	NC
	1388318_at	NM_053291	phosphoglycerate kinase 1	-0.9	D
	1368651_at	NM_012624	pyruvate kinase, liver and red blood cell	-0.2	NC
	1369931_at	NM_053297	pyruvate kinase, muscle	-1.4	D
	1367603_at	NM_022922	triosephosphate isomerase 1	-1.7	D
	Tricarboxylic acid cycle	1367589_at	NM_024398	aconitase 2, mitochondrial	-1.6
1375295_at		NM_130755	Citrate synthase	-1.5	D
1388194_at		NM_031025	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	-2.1	D
1370879_at		NM_001006981	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo- glutarate complex)	-0.8	D
1367670_at		NM_017005	fumarate hydratase 1	-0.9	D
1388403_at		NM_001014161	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	-0.1	NC
1367911_at		NM_053638	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	-1.2	D
1388160_a_at		NM_053581	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	-0.9	D
1370865_at		NM_031551	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD), gamma	-1.1	D
1367653_a_at		NM_033235	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	-1.3	D
1369927_at		NM_031151	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	-1.0	D
1387392_at		NM_013217	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	0.1	NC
1386917_at		NM_012744	pyruvate carboxylase	-3.7	D
1371380_at		NM_001004072	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	-1.7	D
1369429_at		NM_053994	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2	2.3	NC
1371388_at		NM_001007620	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	-2.4	D
1367892_at		NM_030872	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	-1.0	D
1369150_at	NM_053551	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	-0.2	NC	
1367678_at	NM_130428	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	-1.3	D	
1388294_at	NM_198788	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	-1.0	D	
1367642_at	NM_053752	succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit	-1.1	D	

次ページに続く

NC : Not Change, D : Decrease

表2-2 続き

Function	Probe Set	RefSeq Transcript ID	Gene Title	Signal Log Ratio	Change	
Fatty acid synthesis	1398527_at	XM_00107033	AP2 associated kinase 1	0.6	NC	
	1386880_at	NM_130433	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	-1.8	D	
	1387538_at	NM_022193	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	-3.6	D	
	1367854_at	NM_016987	ATP citrate lyase	-2.3	D	
	1367777_at	NM_057197	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	-1.8	D	
	1367829_at	NM_078623	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	-1.8	D	
	1367708_a_at	NM_017332	fatty acid synthase	-2.4	D	
	1370237_at	NM_057186	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	-1.8	D	
	1386917_at	NM_012744	pyruvate carboxylase	-3.7	D	
	1369104_at	NM_019142	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	-0.9	D	
	1369654_at	NM_023991	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	0.2	NC	
	1386945_a_at	NM_031976	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	-0.4	D	
	1369271_at	NM_022627	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	-1.2	NC	
	1367947_at	NM_013010	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit	-0.3	NC	
	1370355_at	NM_139192	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-2.3	D	
	1367668_a_at	NM_031841	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	-1.6	D	
	1367773_at	NM_017307	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, citrate transporter), member 1	-3.1	D	
	Triglyceride synthesis	1391661_at	NM_024381	glycerol kinase	-3.1	D
		1382986_at	NM_017274	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	-3.9	D
		1374570_at	NM_001107821	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta) (predicted)	-3.7	D
1372276_at		NM_001106378	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 (predicted)	-3.9	D	
1368194_at		NM_133406	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	-0.4	NC	
1373169_at		XM_001074443	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon) (predicted)	0.3	NC	
1372919_at		NM_001047849	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid acyltransferase, zeta)	0.2	NC	
1373971_at		NM_001106494	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 7 (lysophosphatidic acid acyltransferase, eta) (predicted)	0.4	NC	
1394966_at		NM_001107720	phosphatidic acid phosphatase type 2	0.6	NC	
1369961_at		NM_022538	phosphatidic acid phosphatase 2a	-0.2	NC	
1372101_at		NM_138905	phosphatidic acid phosphatase type 2B	0.0	NC	
1388913_at		NM_139252	phosphatidic acid phosphatase type 2c	-0.1	NC	
1367915_at		NM_053437	diacylglycerol O-acyltransferase 1	-2.6	D	
1371615_at		NM_001012345	diacylglycerol O-acyltransferase 2	-3.3	D	
1391045_at	NM_001012345	diacylglycerol O-acyltransferase 2	-3.8	D		
Fatty acid transporter	1386901_at	NM_031561	cd36 antigen	-1.9	D	
	1367789_at	NM_053580	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	-1.8	D	
Acyl-CoA synthetase	1392952_at	NM_001034951	acyl-CoA synthetase family member 2	-1.6	D	
	1388969_at	XM_001079424	acyl-CoA synthetase family member 3	-0.5	NC	
	1370939_at	NM_012820	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-2.1	D	
	1368177_at	NM_057107	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	-2.1	D	
	1387101_at	NM_053623	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	-0.7	D	
	1386926_at	NM_053607	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	0.1	NC	
	1368182_at	NM_130739	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	2.7	NC	
	1370436_at	NM_144748	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2A	-1.5	NC	
	1383303_at	NM_033231	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	-1.7	NC	
	1372162_at	NM_001106524	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1 (predicted)	-0.1	NC	
	1375944_at	NM_001107793	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (predicted)	-3.6	D	

表2-3 前駆脂肪細胞に対するLFの作用 DNAマイクロアレイの結果 (脂肪細胞分化制御因子に対するLFの作用)

Probe Set ID	RefSeq Transcript ID	Gene Title	4h		3d		5d			
			Signal Log Ratio	Change	Signal Log Ratio	Change	Signal Log Ratio	Change		
1387087_at	NM_024125	C/EBPβ	-0.1	NC	-0.3	NC	0.2	NC	-0.9	D
1387343_at	NM_013154	C/EBPδ	-0.5	D	0.2	NC	0.2	NC	-0.5	D
1369179_a_at	NM_013124	PPARγ	-0.5	D	-0.5	NC	-2.9	D	-3.2	D
1369658_at	NM_012524	C/EBPα	-1.7	NC	1.2	NC	-4.5	D	-2.5	D
1388185_at	XM_001071121	retinoblastoma 1	-0.1	NC	0.2	NC	-0.5	D	-0.8	D

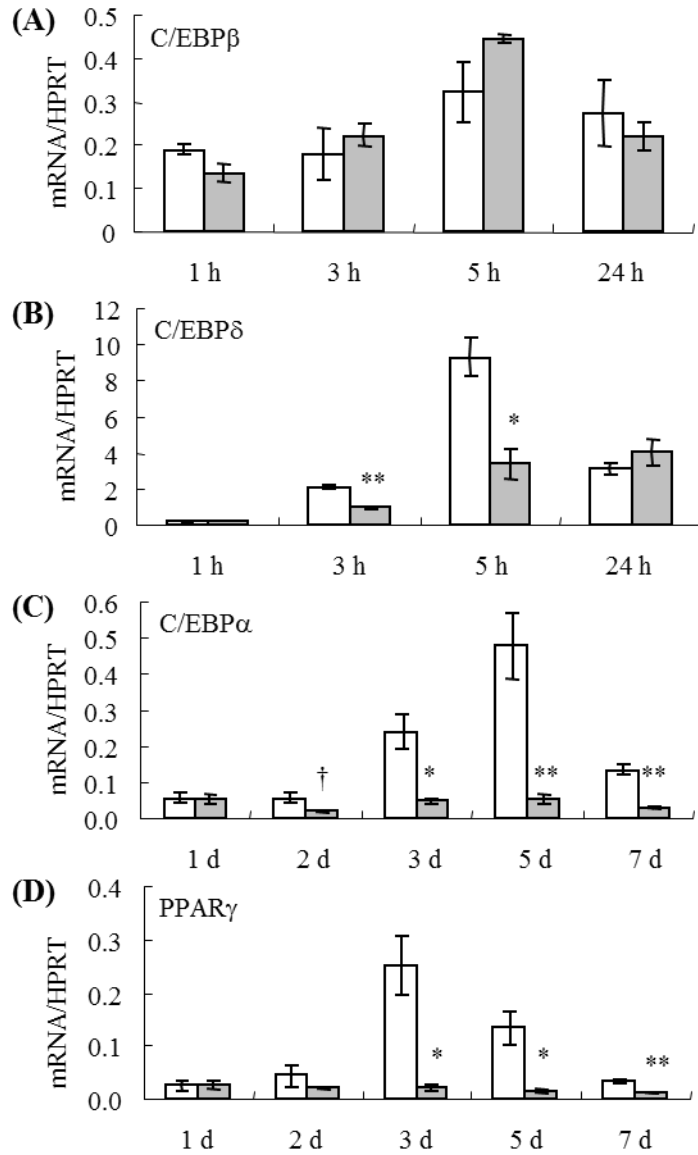


図2-12 ラクトフェリンの脂肪細胞分化制御因子の遺伝子発現に対する作用
 培養条件は図2-4と同様。RT-PCRにて遺伝子発現量を定量し、値はHPRTの
 mRNA発現に対する相対値で示した。左側の棒グラフがControl、右側の棒グラフがLF、(A)C/EBPβ、(B)C/EBPδ、(C)C/EBPα、(D)PPARγ。
 データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。
 統計解析は2way ANOVAの後post hoc analysisとして、t testを実施した。
 †:P < 0.1, *:P < 0.05, **:P < 0.01

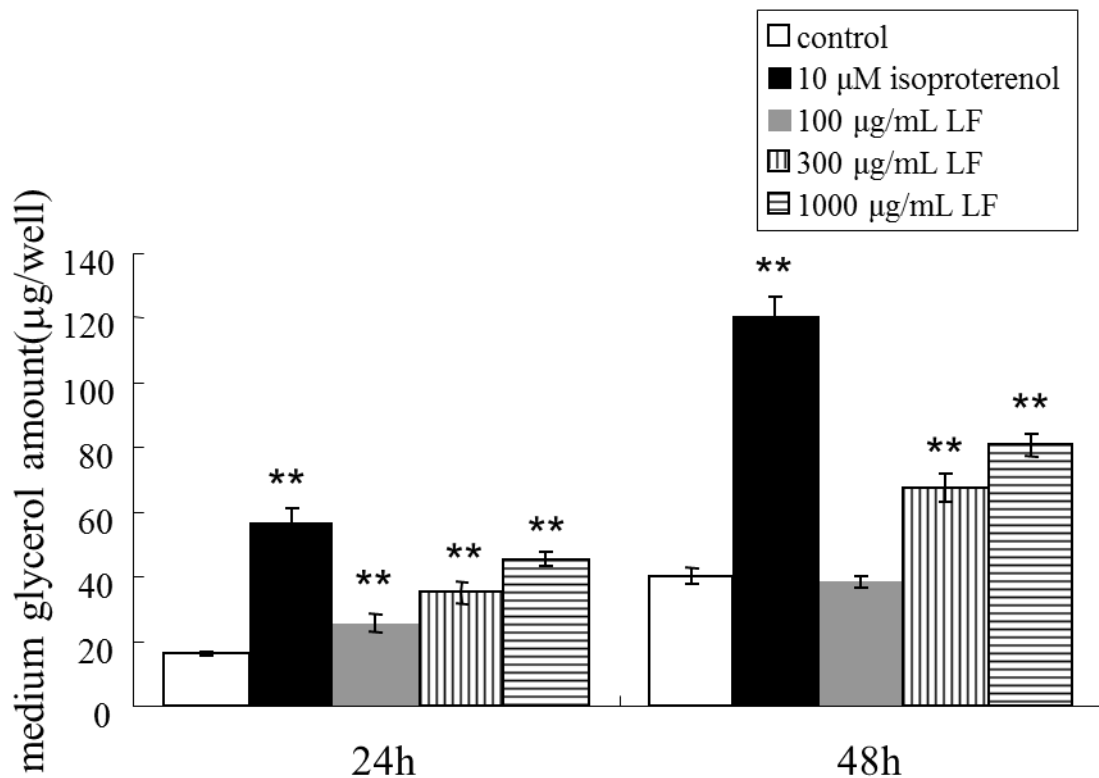


図2-13 LFの成熟脂肪細胞に対する脂肪分解促進作用

培養条件は図2-4とほぼ同様だが、LFは脂肪細胞が成熟した培養6日

目に添加した。Isoproterenolを陽性対象として評価した。

データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。

統計解析はcontrolに対するDunnett testを実施した **: P < 0.01

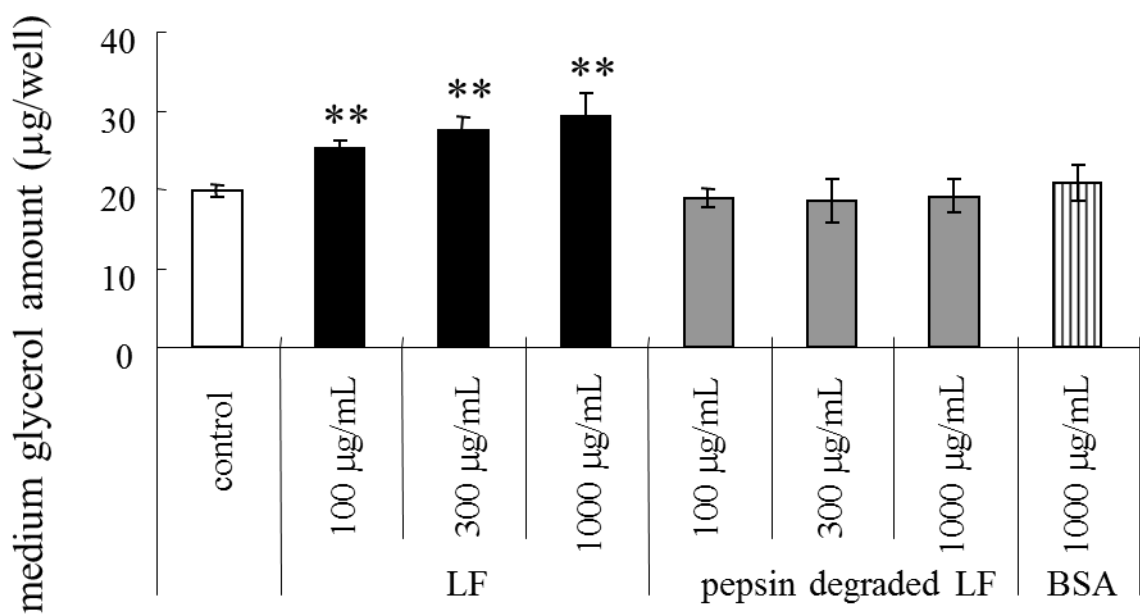


図2-14 LFおよびペプシン分解LFの成熟脂肪細胞に対する脂肪分解促進作用
 培養条件は図2-9と同様。サンプル添加24時間後に培地中のグリセロール濃度を
 測定。Bovine serum albumin (BSA) を陰性対象として評価した。
 データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。
 統計解析はcontrolに対するDunnett testを実施した ** P < 0.01

表2-4 成熟脂肪細胞に対するLFの作用、DNAマイクロアレイの結果（脂肪分解に関与する因子を抜粋）

ensambl ID	symbol	description	signal log ratio*
<i>Altered gene expression profiles of "lipid catabolic process"</i>			
ENSRNOG00000004089	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-1.88
ENSRNOG000000015086	Plin	Perilipin	-1.20
ENSRNOG000000003442	Adora1	Adenosine A1 receptor.	-0.84
ENSRNOG000000014276	Plce1	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon 1	-0.66
ENSRNOG000000020481	Pafah1b3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	0.63
ENSRNOG000000004810	Plcb1	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta 1	0.80
ENSRNOG000000002657	Pla2g4a	Cytosolic phospholipase A2	0.99
<i>gene expression of perilipin transcriptional factor</i>			
ENSRNOG000000008839	Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	-0.58
<i>gene expression profiles of lipase</i>			
ENSRNOG000000010406	Cel	Bile salt-activated lipase precursor	ND
ENSRNOG000000000510	Clps	Colipase precursor	ND
ENSRNOG000000015747	Lipc	Hepatic triacylglycerol lipase precursor	0.30
ENSRNOG000000020538	Lipe	lipase, hormone sensitive	ND
ENSRNOG000000019448	Lipf	Gastric triacylglycerol lipase precursor	ND
ENSRNOG000000012181	Lpl	Lipoprotein lipase precursor	0.04
ENSRNOG000000014508	Mgll	Monoglyceride lipase	-0.83
ENSRNOG000000001153	Pla2g1b	Phospholipase A2 precursor	ND
ENSRNOG000000016945	Pla2g2a	Phospholipase A2, membrane associated precursor	-0.55
ENSRNOG000000016647	Pla2g2c	Group IIC secretory phospholipase A2 precursor	ND
ENSRNOG000000016826	Pla2g2d	phospholipase A2, group IID	0.02
ENSRNOG000000002657	Pla2g4a	Cytosolic phospholipase A2	0.99
ENSRNOG000000016838	Pla2g5	Calcium-dependent phospholipase A2 precursor	-0.17
ENSRNOG000000012295	Pla2g6	85 kDa calcium-independent phospholipase A2	0.31
ENSRNOG000000002896	Prdx6	Acidic calcium-independent phospholipase A2	-0.22
ENSRNOG000000004810	Plcb1	Phospholipase C- beta-1	0.80
ENSRNOG000000021150	Plcb3	Phospholipase C-beta-3	0.24
ENSRNOG0000000033119	Plcb4	Phospholipase C- beta-4	-0.29
ENSRNOG0000000032238	Plcd1	Phospholipase C-delta-1	0.11
ENSRNOG000000016361	Plcd4	phospholipase C, delta 4	-0.16
ENSRNOG000000014276	Plce1	Phospholipase C-epsilon-1	-0.66
ENSRNOG000000016340	Plcg1	Phospholipase C-gamma-1	0.11
ENSRNOG000000013676	Plcg2	Phospholipase C-gamma-2	ND
ENSRNOG0000000028156	Pld1	Phospholipase D1	0.17
ENSRNOG000000018390	Pld3	phospholipase D family, member 3	-0.23
ENSRNOG000000017725	Pnlip	Pancreatic triacylglycerol lipase precursor	ND

*Data are described as the signal log₂ ratio between control (no additive) and lactoferrin

ND: no detection

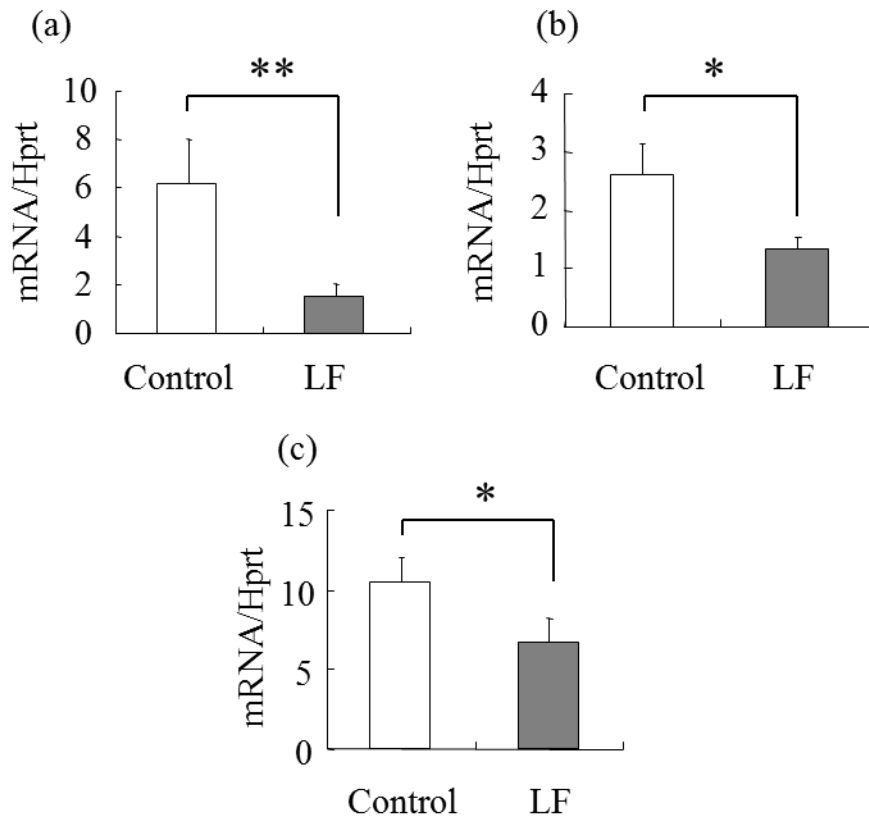


図2-15 LFの各種遺伝子発現に対する作用
 成熟した脂肪細胞にLFを1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し24h後に細胞を回収した。Controlは無添加とした。RT-PCRにて遺伝子発現量を定量し、値はHPRTのmRNA発現に対する相対値で示した。(a)perilipin, (b) PPAR γ , (c)PPAR γ 2。データは平均値±標準偏差で示した (n=3)。統計解析はt testを実施した。*: P < 0.05, **: P < 0.01

表2-5 成熟脂肪細胞に対するLFの作用、DNAマイクロアレイの結果 (cAMPシグナリングパスウェイに關与する因子を抜粋)

ensamb1 ID	symbol	description	signal log ratio*
ENSRNOG00000010235	Pkig	cAMP-dependent protein kinase inhibitor gamma	-1.94
ENSRNOG00000003977	Dusp1	Dual specificity protein phosphatase 1	-1.24
ENSRNOG00000019217	Adrb2	Beta-2 adrenergic receptor	-0.96
ENSRNOG00000010552	Map2k1ip1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1-interacting protein 1	-0.89
ENSRNOG00000018260	Hrh2	Histamine H2 receptor	-0.86
ENSRNOG00000003442	Adora1	Adenosine A1 receptor	-0.84
ENSRNOG00000009495	Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	-0.79
ENSRNOG00000022857	Ppp3r1	Calcineurin subunit B isoform 1	-0.76
ENSRNOG00000003959	Rgs18	regulator of G-protein signaling 18	-0.75
ENSRNOG00000019783	Akap3	A-kinase anchor protein 3	-0.75
ENSRNOG00000013887	Adra2b	Alpha-2B adrenergic receptor	0.60
ENSRNOG00000006559	Akap8	A-kinase anchor protein 8	0.60
ENSRNOG00000013048	Pde7a	High-affinity cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 7A	0.60
ENSRNOG00000002229	Adcy5	Adenylate cyclase type 5	0.63
ENSRNOG00000020271	Rgs10	Regulator of G-protein signaling 10	0.63
ENSRNOG00000006899	Akap14	A-kinase anchor protein 14	0.64
ENSRNOG00000019482	Gnao	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 1	0.65
ENSRNOG00000011310	Pde10a	phosphodiesterase 10A	0.73
ENSRNOG00000002773	Rgs4	Regulator of G-protein signaling 4	0.80
ENSRNOG00000009987	Akap11	A-kinase anchor protein 11	0.82
ENSRNOG00000019005	Pde8a	phosphodiesterase 8A	0.89
ENSRNOG00000017556	Chrm4	Muscarinic acetylcholine receptor M4	1.02
ENSRNOG00000026319	Akap9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	1.44
ENSRNOG00000013042	Htr1b	5-hydroxytryptamine 1B receptor	1.50
ENSRNOG00000010254	Htr1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	1.91

*Data are described as the signal log2 ratio between control (no additive) and lactoferrin

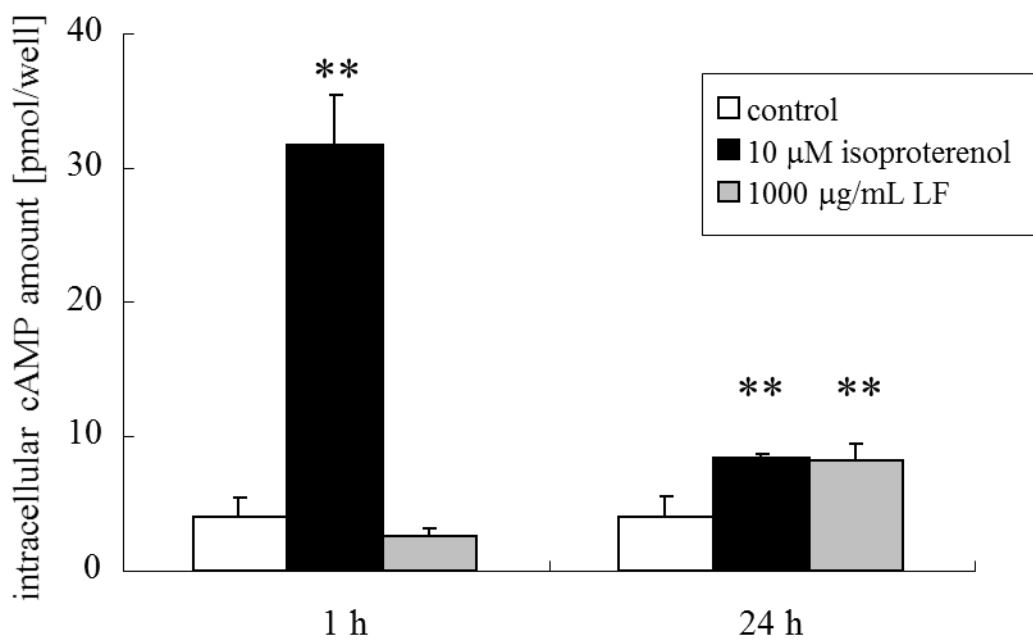


図2-16 LFの成熟脂肪細胞に対する細胞内cAMP濃度への影響
 培養条件は図2-13と同様。Controlは無添加とし、
 isoproterenolを陽性対象として添加した。
 データは平均値±標準偏差で示した (n=3)。
 統計解析はDunnett testを実施した。**: P < 0.01

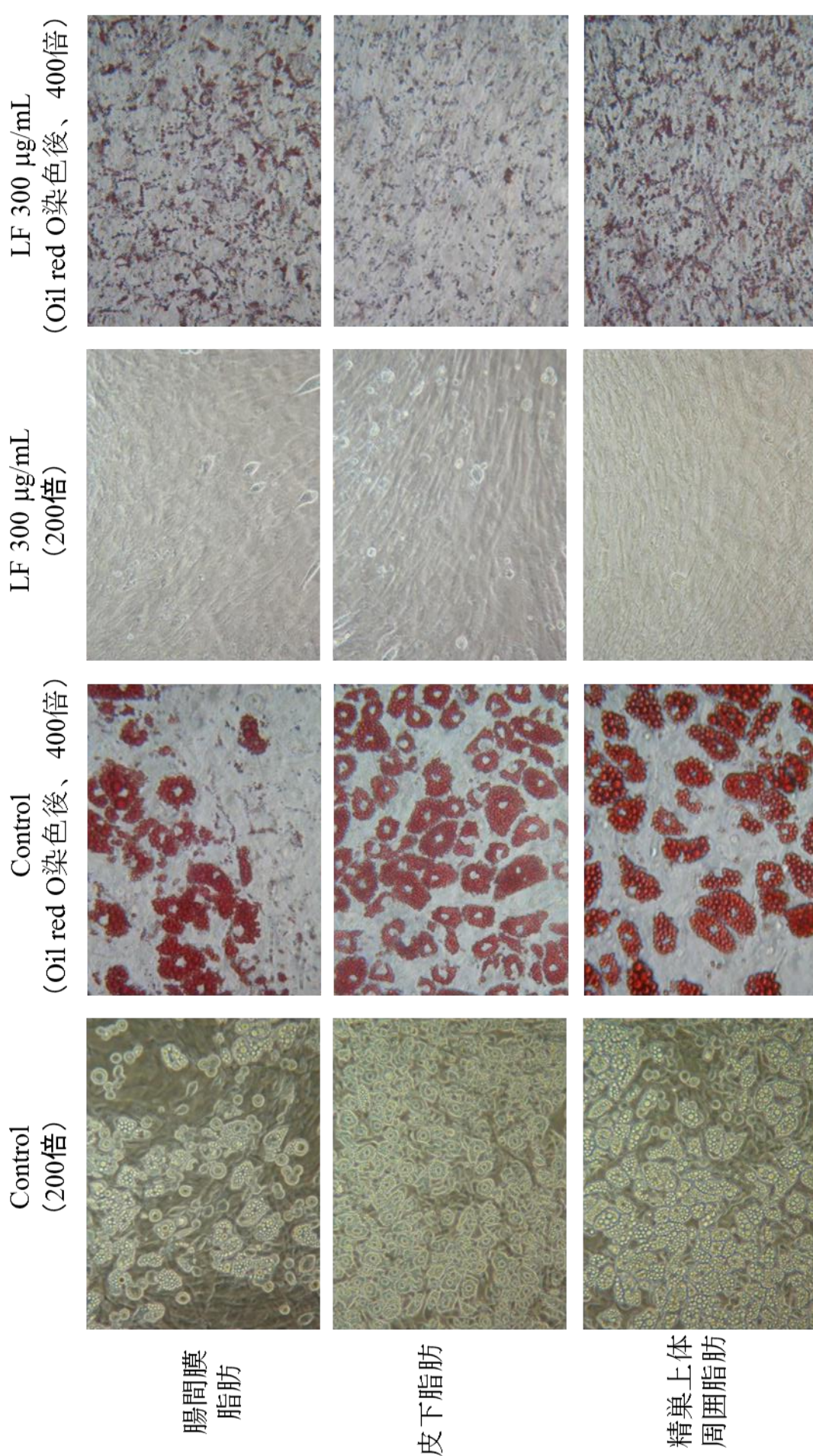


図2-17 各種脂肪細胞に対するLFの脂肪合成抑制作用
 前駆脂肪細胞培養キット3種セットQ-3 (プライマリーセル社、Code No. VESQ3) を使い、添付のプロトコルに従い実施。
 無添加または300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のLFを添加して7日間培養後、Oil red O染色を行った。各群n=2で実施。

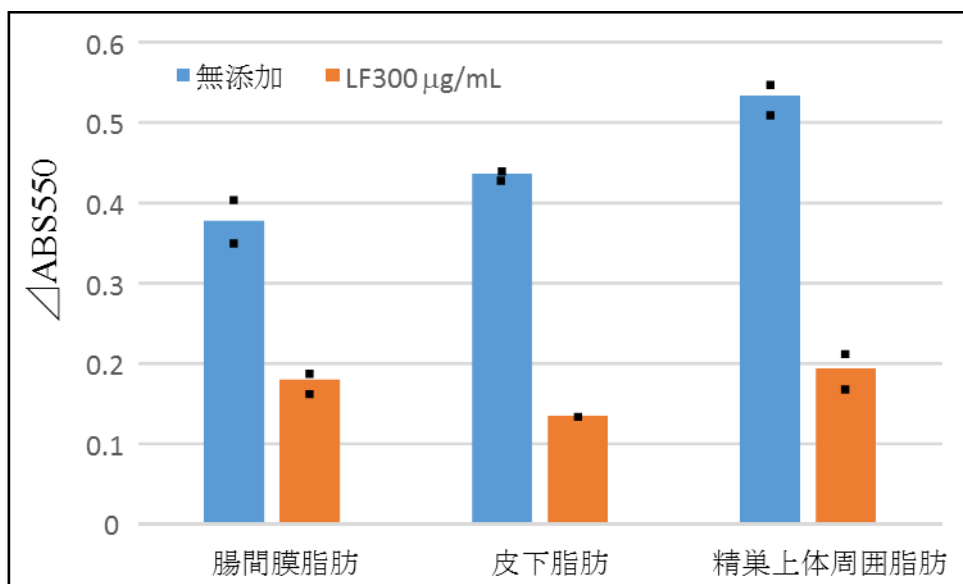


図2-18 各種脂肪細胞に対するLFの脂肪合成抑制作用
 実験方法は図2-17と同様。Oil red O染色後、色素を抽出して定量したデータ
 棒グラフはn=2の平均値、各点は個々のデータを表す

表2-6 DNAマイクロアレイによるLRP1の遺伝子発現解析結果

	4h		1day		3day		5day	
	signal	detection	signal	detection	signal	detection	signal	detection
control	489	Present	834	Present	1154	Present	1391	Present
LF	614	Present	507	Present	1554	Present	2034	Present
	signal log ratio	Change	signal log ratio	Change	signal log ratio	Change	signal log ratio	Change
comparison analysis	0.1	Not Change	-0.7	Decrease	0.3	Increase	0.5	Increase

本実験系ではsignal値50以上で概ね遺伝子発現あり (Present) の判定であり、LRP1はいずれの培養時間においても遺伝子発現が認められ、培養期間中に遺伝子発現量が増加していく様子が観察された。またLFの添加により若干の遺伝子発現の変動があり、培養1日後では、遺伝子発現減少 (Decrease) の判定であり、培養3日目、5日目は遺伝子発現増加 (Increase) の判定であった。

総合討論および将来展望

本研究は腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果の科学的な立証と、その作用機序の明確化を目的とした。LF は多機能性タンパク質として知られており、鉄分補給、抗菌作用、LPS 不活性化作用、抗ウイルス作用、免疫賦活作用、抗酸化作用、抗炎症作用、がん予防作用など⁵⁻¹²⁾、様々な機能を持つことが報告されているが、内臓脂肪に対する作用を検討した事例はなく、その作用機序に関する報告もなかった。

第 1 章では内臓脂肪型肥満が疑われる社外の被験者を対象に、プラセボを対照として、LF の内臓脂肪低減効果を二重盲検群間比較試験にて検討した。その結果、8 週間の腸溶性 LF の摂取により、内臓脂肪面積がプラセボ群と比較して有意に減少したことから、内臓脂肪低減効果を科学的に立証した。

また第 2 章では、LF の内臓脂肪低減効果の作用機序に関する検討を行い以下の 3 つの知見を得た。1)ラットを用いた LF の体内動態の検討結果から、LF が体内に吸収され腸間膜脂肪に局在すること。2)ラット腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞初代培養系を用いた検討結果から、LF が脂肪の合成抑制作用と分解促進作用を有すること。3)ペプシンで分解した LF は、脂肪の合成抑制作用と分解促進作用が消失すること。以上の結果から、経口摂取した腸溶性 LF は、胃で分解されずに小腸で吸収され、短時間のうちに内臓脂肪まで到達し、脂肪の合成抑制と分解促進の両作用により、内臓脂肪を低減することが推察された。

このように本論文では、腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果とその作用機序について述べてきた。ここでは本研究をどのように進展させていくかを中心に述べる。

1. LFの内臓脂肪低減効果について

既報を調査した限りでは、LFの内臓脂肪低減効果をヒトで証明したのは本報告が初めてであり、社会的な問題となっているメタボリックシンドロームの予防手段の一つに加えることができたのは意義があると考えます。しかしながら、今回の研究では症例数が各群13名と小規模であったことが課題であり、今後例数を増やした臨床試験を行うことは重要である。また、今回の被験者は日本人であった。メタボリックシンドロームは日本のみならず、世界的な問題へと広がりを見せており、他の人種においてもLFが同様の内臓脂肪低減効果を示すか否かは興味深い。しかしながら人種、文化、社会的なインフラ等の違いにより、体格、食習慣、運動習慣などは大きく異なることから、腸溶性LFが日本人と同様の効果を示すかは不明である。今後、多様な人種に対するLFの有効性を確認していくことも重要である。これらの研究を通じて、LFの内臓脂肪低減効果に関する頑健性の高いエビデンスを確保することは重要な研究課題であると考えている。

また、機能性食品は医薬品とは異なり作用が強力ではないことから、全ての人に効果を示すとは考えにくい。実際社内試験では、内臓脂肪があまり蓄積していない被験者に対しては、効果が弱いことも明らかになっている。さらに腸溶性LFを摂取した経験のある人に対するアンケート結果では、内臓脂肪が蓄積しているにもかかわらず効果が認められないケースも存在する。腸溶性LFの内臓脂肪低減作用を効果的に発現させるため、例えば栄養指導や、運動処方との組合せに関する検討を行うことも重要である。近年では遺伝子多型と肥満のなりやすさに関する報告も存在する。遺伝子多型解析などに基づき個々人の体質を検査し、その検査結果に基づきLFを含む様々な機能性食品の効果の発揮されやすさが分かれば、その人の体質に応じた機能性食品を提供することも可能となる。我々が内臓脂肪におけるLFの標的分子として想定しているLRP1にも遺伝子多型が存在し、遺伝子多型によってBMIが1程度ことなることも報告されている⁸⁰⁾。LRP1やβ受容体などの肥満に関連する遺伝子の多型によって、LFなどの機能性食品の効果の発揮されやすさが異なるのであれば、オーダ

一モード機能性食品の提案も可能となる。機能性食品によりメタボリックシンドロームを抜本的に予防するためには、このようなアプローチも重要な課題なのではないかと考える。

メタボリックシンドローム患者は動脈硬化の発症リスクが高まることが知られているが、腸溶性 LF が動脈硬化に対しても予防効果があるのか否かは不明である。プレリミナリーなデータではあるが、我々はマイクロミニピッグを用いた食餌誘導性の動脈硬化症モデルにおいて、腸溶 LF の有効性を評価したところ、LF が、動脈硬化症及び高コレステロール血症に対して抑制作用を示すことを確認した（論文投稿中）。今後はヒトでも同様の効果が認められるのか検討していくことも重要な検討課題である。

2. LF の体内動態について

LF のような大きな分子量のタンパク質がなぜ体内に移行するのかについては現在のところ明らかになってはいない。しかしながら、パイエル板に存在している上皮細胞には LF レセプターが高発現していることから、ウシ LF は M 細胞から吸収されるのではないかと考えられている⁸¹⁾。その後、本 LF レセプターは *intelectine* であることや⁸²⁾、LF の小腸上皮細胞への取り込みに関与していることが報告された^{83, 84)}。しかしながら小腸上皮細胞に取り込まれた後、トランスサイトosisなどにより体内に吸収されるのかについては報告がない。また M 細胞から吸収されることを直接証明した報告はなく、また本仮説に *intelectin* が本当に関与しているのかについても不明である。

近年、RANKL が M 細胞への分化を制御する重要な因子で有ることが報告され、RANKL ノックアウトマウスや抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは M 細胞が消失し、RANKL 投与では M 細胞が増加することも明らかになっている⁸⁵⁾。これらのマウスを用いて LF の体内動態を検討することで、前述の仮説が検証できるものと考ええる。LF の吸収経路を解明できれば、より吸収性の高い製剤化技術の開発の足掛かりとなり、LF の内臓脂肪低減効果をより強化できる可能性が考えられるので、重要な研究課題なのではないかと考える。

また今回の実験では 1000 mg という非常に高用量の LF をラットに投与し、約 140 mg の全長 LF が小腸で検出されている。一方ヒト試験では 300 mg の腸溶性 LF を摂取しており、今回の実験よりもかなり低い用量である。しかしながら、長期間腸溶性 LF を摂取し続けることで、LF が持続的に内臓脂肪に作用し、第 2 節で述べる脂肪細胞の脂肪合成抑制作用と、分解促進作用を発揮して、内臓脂肪の低減作用を発揮した可能性が考えられた。今後は、LF の体内動態をヒトレベルで詳細に検討することが必要であると思われる。

3. LF の内臓脂肪低減作用機序について

LF の体内動態の結果と、脂肪細胞に対する作用の結果から腸溶性 LF の内臓脂肪低減機序を考察すると、摂取した腸溶性 LF は小腸から吸収されて内臓脂肪に到達し、脂肪合成抑制作用、脂肪分解促進作用の両作用により、内臓脂肪の低減効果を発揮したものと考えられる。また、LF ペプシン分解物では両作用において活性が消失することから、内臓脂肪に対する効果を発揮するためには腸溶製剤として摂取することが有用であると考えられた。今後は、脂肪細胞における LF のレセプターやその下流のシグナルについて更なる詳細な分子メカニズムを明らかにしていく。未発表のデータではあるが、現在脂肪分解促進作用におけるプロテオーム解析、およびその検証実験を進めている。例えばペリリピンの発現に関しては、タンパク質レベルでは発現変動が認められないものの、リン酸化したペリリピンの発現量が上昇することを Western Blotting などで確認している。脂肪細胞における脂肪分解に必要な酵素である HSL に関しては、遺伝子発現では変動は認められなかったものの、タンパク質発現においては添加 3 時間後に上昇し、その活性調節に重要なリン酸化については添加 15 分後に上昇することを明らかにしている。さらに、HSL のリン酸化に重要な PKA の活性化、PKA の活性化に重要な cAMP 濃度の上昇が 15 分後に起きていることも確認した。また脂肪細胞の表層に存在する LF 結合蛋白を網羅的に解析した結果、LRP1 と LF の結合が確認され、LRP1 の下流シグナルである MAPK パスウェイに関与するタンパク質の活性

化を確認した。現在では siRNA により LRP1 をノックダウンすることで、LF の脂肪分解促進作用に与える影響や、LRP1 と脂肪分解経路を繋ぐ分子機構について検討中である。タンパク質レベルでの解析を進めることにより、遺伝子レベルでの解析では明らかにできていなかったことなどを解明しつつある。

一般に体脂肪の低減のためには、①消化管における脂肪の吸収の抑制、②脂肪組織における脂肪合成の抑制、③脂肪組織における脂肪分解の促進、④筋肉、肝臓、褐色脂肪細胞などにおける脂肪酸の燃焼促進、などが考えられる。上述のように LF はこのうち②と③に作用しているものと考えられる。しかしながら、体内動態を考慮すると、LF は内臓脂肪には到達するものの、皮下脂肪には到達しないので、皮下脂肪に対する作用は弱いものと考えられる。実際ヒト試験においても、皮下脂肪に対する作用は認められなかった。今後、他の作用ポイントに効果を有する素材や、全身性に作用を発揮する素材と組み合わせることで、より効率的な体脂肪の低減効果が期待でき、今後の検討課題としたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/metabo02/>
- 2) Sørensen, M. and Sørensen, S.P.L. The protein in whey. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* **23**, 55–99 (1939)
- 3) 清水洋彦、「ラクトフェリン実用化研究の新たな展開 ―腸溶錠の開発と新規生理作用の発見―」 *FOOD RESEARCH*, 54-59 (2005)
- 4) Anderson, B.F., Baker, H.M., Dodson, E.J., Norris, G.E., Rumball, S.V., Waters, J.M. and Baker, E.N. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1769–1773 (1987)
- 5) Paesano, R., Pietropaoli, M., Gessani, S. and Valenti, P. The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. *Biochimie* **91**, 44-51 (2009)
- 6) Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* **74**, 4137-4142 (1991)
- 7) Tanaka, K., Ikeda, M., Nozaki, A., Kato, N., Tsuda, H., Saito, S. and Sekihara, H. Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 367-371 (1999)
- 8) Harmsen, M.C., Swart, P.J., Béthune, M.P., Pauwels, R., Clercq, E.D., The, T.H. and Meijer, D.K. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* **172**, 380-388 (1995)

- 9) Zimecki, M., Właszczuk, A., Cheneau, P., Brunel, A.S., Mazurier, J., Spik, G. and Kübler, A. Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **46**, 231-240 (1998)
- 10) Shoji, H., Oguchi, S., Shinohara, K., Shimizu, T. and Yamashiro, Y. Effects of iron-unsaturated human lactoferrin on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells. *Pediatr. Res.* **61**, 89-92 (2007)
- 11) Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Iigo, M., Baba-Toriyama, H., Moore, M.A., Murakoshi, M., Satomi, Y., Nishino, H., Kakizoe, T. and Tsuda, H. Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.* **121**, 211-216 (1997)
- 12) Kozu, T., Iinuma, G., Ohashi, Y., Saito, Y., Akasu, T., Saito, D., Alexander, D.B., Iigo, M., Kakizoe, T. and Tsuda, H. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prev. Res (Phila)*. **11**, 975-983 (2009)
- 13) Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* **91**, 52-57 (2009)
- 14) Orsi, N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* **17**, 189-196 (2004)
- 15) Ochoa, T.J., Cleary, T.G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie*. **91**, 30-34 (2009)
- 16) Sachdeva, A., Nagpal, J. Meta-analysis: efficacy of bovine lactoferrin in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther.* **29**, 720-730 (2009)

- 17) Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Kobayashi, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Yoshie, H. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**, 3308-3316 (2009)
- 18) Paesano, R., Berlutti, F., Pietropaoli, M., Goolsbee, W., Pacifici, E., Valenti, P. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron disorders in pregnant and non-pregnant women. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **23**, 577-587 (2010)
- 19) Manzoni, P., Rinaldi, M., Cattani, S., Pugni, L., Romeo, M.G., Messner, H., Stolfi, I., Decembrino, L., Laforgia, N., Vagnarelli, F., Memo, L., Bordignon, L., Saia, O.S., Maule, M., Gallo, E., Mostert, M., Magnani, C., Quercia, M., Bollani, L., Pedicino, R., Renzullo, L., Betta, P., Mosca, F., Ferrari, F., Magaldi, R., Stronati, M., Farina, D. Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA.* **302**, 1421-1428 (2009)
- 20) 鈴木苗穂、木川博光、小野知二、関谷大輔、村越倫明、川上明子、尾川直樹、福井朋恵、小林宏明、長澤繁行、小田茂、渡辺久、大寺基靖、氏家高志、飯郷正明、石川烈 「ラクトフェリンによる歯周病予防効果～ヒト由来歯肉線維芽細胞に対する影響」ラクトフェリン 2007, 日本医学館, 68-74 (2007)
- 21) Offenbacher, S., Beck, J.D., Moss, K., Mendoza, L., Paquette, D.W., Barrow, D.A., Couper, D.J., Stewart, D.D., Falkner, K.L., Graham, S.P., Grossi, S., Gunsolley, J.C., Madden, T., Maupome, G., Trevisan, M., Van Dyke, T.E. and Genco, R.J. Results from the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: a pilot multicentered, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *J. Periodontol.* **80**, 190-201 (2009)
- 22) Teeuw, W.J., Gerdes, V.E. and Loos, B.G. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* **33**, 421-427 (2010)

- 23) Bullon, P., Morillo, J.M., Ramirez-Tortosa, M.C., Quiles, J.L., Newman, H.N. and Battino, M. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? *J. Dent. Res.* **88**, 503-518 (2009)
- 24) Morishita, S., Ono, T., Fujisaki, C., Ishihara, Y., Murakoshi, M., Kato, H., Hosokawa, M., Miyashita, K., Sugiyama, K. and Nishino, H. Bovine lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice. *J. Oleo Sci.* **62**, 97-103 (2013). Erratum in: *J. Oleo Sci.* **62**, 643 (2013).
- 25) Ono, T., Morishita, S., Fujisaki, C., Ohdera, M., Murakoshi, M., Iida, N., Kato, H., Miyashita, K., Iigo, M., Yoshida, T., Sugiyama, K., Nishino, H. Effects of pepsin and trypsin on the anti-adipogenic action of lactoferrin against pre-adipocytes derived from rat mesenteric fat. *Br. J. Nutr.* **105**, 200–211 (2011)
- 26) Ono, T., Murakoshi, M., Suzuki, N., Iida, N., Ohdera, M., Iigo, M., Yoshida, T., Sugiyama, K. and Nishino, H. Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. *Br. J. Nutr.* **104**, 1688–1695 (2010)
- 27) Ono, T., Fujisaki, C., Ishihara, Y., Ikoma, K., Morishita, S., Murakoshi, M., Sugiyama, K., Kato, H., Miyashita, K., Yoshida, T. and Nishino, H. Potent lipolytic activity of lactoferrin in mature adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 566-571 (2013)
- 28) Ishikado, A., Imanaka, H., Kotani, M., Fujita, A., Mitsuishi, Y., Kanemitsu, T., Tamura, Y. and Makino, T. Liposomal lactoferrin induced significant increase of the interferon-alpha (IFN-alpha) producibility in healthy volunteers. *Biofactors* **21**, 69-72 (2004)
- 29) Richmond, W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* **19**, 1350-1356 (1973)

- 30) Sugiuchi, H., Uji, Y., Okabe, H., Irie, T., Uekama, K., Kayahara, N. and Miyauchi, K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin. Chem.* **41**, 717-723 (1995)
- 31) Kanno, T., Sakurabayashi, I., Saito, Y., Mujou, H., Yamada, N., Sekiguchi, M., Kubono, K., Kita, T., Matuzawa, Y., Yamashita, S., Katayama, Y. and Fujita, S. Evaluation of a new assay for determination of LDL-cholesterol. *Jpn. J. Med. Pharm. Sci.* **37**, 635-644 (1997)
- 32) Eggstein, M. and Kreutz, F.H. A new determination of the neutral fats in blood serum and tissue. I. Principles, procedure, and discussion of the method. *Klin. Wochenschr.* **44**, 262-267 (1996)
- 33) Frings, C.S. and Dunn, R.T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**, 89-91 (1970)
- 34) Okabe, H., Uji, Y., Nagashima, K. and Noma, A. Enzymic determination of free fatty acids in serum. *Clin. Chem.* **26**, 1540-1543.(1980)
- 35) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766 (1949)
- 36) Doumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta.* **31**, 87-96 (1971)
- 37) Japan Society of Clinical Chemistry. Recommendations.
<http://www.jscc-jp.gr.jp/eng/measurement.html>
(Accessed February 10, 2005).
- 38) Otsuji, S., Mizuno, K., Ito, S., Kawahara, S. and Kai, M. A new enzymatic approach for estimating total and direct bilirubin. *Clin. Biochem.* **21**, 33-38 (1988)

- 39) Tanganelli, E., Prencipe, L., Bassi, D., Cambiagli, S. and Murador, E. Enzymic assay of creatinine in serum and urine with creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase. *Clin. Chem.* **28**, 1461-1464 (1982)
- 40) Tabacco, A., Meiattini, F., Moda, E. and Tarli, P. Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clin. Chem.* **25**, 336-337. (1979)
- 41) Gochman, N. and Schmitz, J.M. Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. *Clin. Chem.* **17**, 1154-1159 (1971)
- 42) Férard, G., Goester, C., Klumpp, T. and Métais, P. Evaluation of immunonephelometry of C-reactive protein in serum. *Clin. Chem.* **26**, 782-783 (1980)
- 43) Sugiura, M. and Hirano, K. A new colorimetric method for determination of serum glucose. *Clin. Chim. Acta.* **75**, 387-391 (1977)
- 44) John, WG. Hemoglobin A1c measurement: new precise immunoassay method involving latex particle agglutination. *Clin. Chem.* **42**, 1874-1875 (1996)
- 45) Yoshioka, M., Taniguchi, H., Kawaguchi, A., Kobayashi, T., Murakami, K., Seki, M., Tsutou, A., Tamagawa, M., Minoda, H. and Baba S. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for insulin in human serum, and its clinical application. *Clin. Chem.* **25**, 35-38 (1979)
- 46) Tokunaga, K., Matsuzawa, Y., Ishikawa, K. and Tarui, S. A novel technique for the determination of body fat by computed tomography. *Int. J. Obes.* **7**, 437-445 (1983)

- 47) Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan
Standard Tables of Food Composition in Japan, Fifth Revised and Enlarged Edition. Tokyo, Japan (2005)
http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm (accessed November 2009)
- 48) Shimazaki, K. and Yoshimoto, Y. Distribution of bovine lactoferrin in curd and whey. *Japanese J. Dairy Food Sci.* **37**, A-105-108 (1988)
- 49) Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F.J., Bassols, J., Castro, A., Ricart, W. and Fernández-Real, J.M. Association of circulating lactoferrin concentration and 2 nonsynonymous LTF gene polymorphisms with dyslipidemia in men depends on glucose-tolerance status. *Clin. Chem.* **54**, 301-309 (2008)
- 50) Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F.J., Bassols, J., Ricart, W. and Fernández-Real, J.M. Decreased circulating lactoferrin in insulin resistance and altered glucose tolerance as a possible marker of neutrophil dysfunction in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 4036-4044. (2009)
- 51) Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C. and Burcelin, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* **56**, 1761-1772. (2007)
- 52) Wakabayashi, H., Takase, M. and Tomita, M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1277-1287 (2003)
- 53) Fischer, R., Debbabi, H., Blais, A., Dubarry, M., Rautureau, M., Boyaka, P.N. and Tome, D. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues. *Int Immunopharmacol* **7**, 1387-1393 (2007)

- 54) Takeuchi, T., Kitagawa, H., Harada, E. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp Physiol* **89**, 263-270 (2004)
- 55) Takeuchi, T., Jyonotsuka, T., Kamemori, N., Kawano, G., Shimizu, H., Ando, K., Harada, E. Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats. *Exp Physiol*. **91**, 1033-1040 (2006)
- 56) Ishikado, A., Imanaka, H., Takeuchi, T., Harada, E., Makino, T. Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull*. **28**, 1717-1721 (2005)
- 57) Hofmann, S.M., Zhou, L., Perez-Tilve, D., Greer, T., Grant, E., Wancata, L., Thomas, A., Pfluger, P.T., Basford, J.E., Gilham, D., Herz, J., Tschöp, M.H. and Hui, D.Y. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3271-3282 (2007)
- 58) Crawford, S.E. and Borensztajn, J. Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway. *J. Lipid Res.* **40**, 797-805 (1999)
- 59) Moguilevsky, N., Retegui, L.A., Courtoy, P.J., Castracane, C.E. and Masson PL. Uptake of lactoferrin by the liver. III. Critical role of the protein moiety. *Lab. Invest.* **50**, 335-340 (1984)
- 60) Shimizu, K., Sakai, M., Ando, M., Chiji, H., Kawada, T., Mineo, H. and Taira, T. Newly developed primary culture of rat visceral adipocytes and their in vitro characteristics. *Cell Biol. Int.* **30**, 381-388 (2006)
- 61) Mineo, H., Oda, C., Chiji, H., Kawada, T., Shimizu, K. and Taira T. Thiazolidinediones exhibit different effects on preadipocytes isolated from rat mesenteric fat tissue and cell line 3T3-L1 cells derived from mice. *Cell Biol. Int.* **31**, 703-710 (2007)

- 62) Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* **74**, 4137-4142 (1991)
- 63) Nagino, K., Nomura, O., Takii, Y., Myomoto, A., Ichikawa, M., Nakamura, F., Higasa, M., Akiyama, H., Nobumasa, H., Shiojima, S. and Tsujimoto, G. Ultrasensitive DNA chip: gene expression profile analysis without RNA amplification. *J. Biochem.* **139**, 697–703 (2006)
- 64) Clifford, G.M., Londos, C., Kraemer, F.B., Vernon, R.G. and Yeaman, S.J. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5011–5015 (2000)
- 65) Shimizu, M., Takeshita, A., Tsukamoto, T., Gonzalez, F.J. and Osumi, T. Tissue-selective, bidirectional regulation of PEX11 alpha and perilipin genes through a common peroxisome proliferator response element. *Mol. Cell Biol.* **24**, 1313–1323 (2004)
- 66) Arimura, N., Horiba, T., Imagawa, M., Shimizu, M. and Sato, R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 10070–10076 (2004)
- 67) Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R. and Lass, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid Res.* **50**, 3–21 (2009)
- 68) Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1120–1124 (2003)
- 69) Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G. and Zechner R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* **3**, 309–319 (2006)

- 70) Watts, V.J. Molecular mechanisms for heterologous sensitization of adenylate cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 1–7 (2002)
- 71) Kodama, H.A., Amagai, Y., Koyama, H. and Kasai, S. A new preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell Physiol.* **112**, 89-95 (1982)
- 72) Yagi, M., Suzuki, N., Takayama, T., Arisue, M., Kodama, T., Yoda, Y., Numasaki, H., Otsuka, K. and Ito, K. Lactoferrin suppress the adipogenic differentiation of MC3T3-G2/PA6 cells. *J. Oral Sci.* **50**, 419-425 (2008)
- 73) Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F.J., Ricart, W. and Fernandez-Real, J.M. Lactoferrin increases (172Thr) AMPK phosphorylation and insulin-induced (p473Ser)AKT while impairing adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. (Lond)* **33**, 991-1000 (2009)
- 74) Otto, T.C. and Lane, M.D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 229-242 (2005)
- 75) Herz, J. and Strickland, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* **108**, 779-784 (2001)
- 76) Crawford, S.E. and Borensztajn, J. Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway. *J. Lipid Res.* **40**, 797-805 (1999)
- 77) Grey, A., Banovic, T., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K., Palmano, K., Ross, J., Naot, D., Reid, I.R. and Cornish, J. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2268-2278 (2004)

- 78) Tanabe, Y., Koga, M., Saito, M., Matsunaga, Y. and Nakayama K. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPARgamma2. *J. Cell Sci.* **117**, 3605–3614 (2004)
- 79) Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P. and Spiegelman, B.M. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* **274**, 2100–2103 (1996)
- 80) Frazier-Wood, A.C., Kabagambe, E.K., Borecki, I.B., Tiwari, H.K., Ordovas, J.M., Arnett, D.K. Preliminary evidence for an association between LRP-1 genotype and body mass index in humans. *PLoS One.* **7**, e30732 (2012)
- 81) Talukder, M.J., Takeuchi, T. and Harada, E. Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **50**, 123-131 (2003)
- 82) Wrackmeyer, U., Hansen, G.H., Seya, T., Danielsen, E.M. Intelectin: a novel lipid raft-associated protein in the enterocyte brush border. *Biochemistry.* **45**, 9188-9197 (2006)
- 83) Akiyama, Y., Oshima, K., Shin, K., Wakabayashi, H., Abe, F., Nadano, D., Matsuda, T. Intracellular retention and subsequent release of bovine milk lactoferrin taken up by human enterocyte-like cell lines, Caco-2, C2BBel and HT-29. *Biosci Biotechnol Biochem.* **77**, 1023-1029 (2013)
- 84) Akiyama, Y., Oshima, K., Kuhara, T., Shin, K., Abe, F., Iwatsuki, K., Nadano, D., Matsuda, T. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Biochem.* **154**, 437-448 (2013)

85) Knoop, K.A., Kumar, N., Butler, B.R., Sakthivel, S.K., Taylor, R.T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., Williams, I.R. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.* **183**, 5738-5747 (2009)

要旨

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に高血糖・高血圧・脂質異常のうち2つ以上を合併した状態を指し、日本人男性の2人に1人、日本人女性の5人に1人が、メタボリックシンドロームが強く疑われる者あるいは予備群と考えられ、その発症を予防することは国民の健康を考える上で非常に重要である。内臓脂肪のコントロールには、食事と運動のバランスを保つなど、適切な生活習慣を続けることが最も重要であると考えられているが、現代社会の中ではなかなか適切な生活習慣を続けることが困難なケースもあり、一つの手段として機能性食品による内臓脂肪のコントロールが注目を浴びている。一方、ラクトフェリン（以下LF）は乳中に含まれる多機能性タンパク質であり、鉄分補給、抗菌作用、LPS不活性化作用、抗ウイルス作用、免疫賦活作用、抗酸化作用、抗炎症作用、がん予防作用など、様々な機能を持つことが報告されている。商業的に流通しているLFは牛乳からチーズを製造する際の副産物である乳清から、陽イオン交換樹脂を用いて製造される。LFは乳中に存在し乳幼児が摂取することから安全性が非常に高いと考えられており、日本では食品添加物として、米国ではGRAS（generally recognized as safe）に認定されている。

我々の研究グループでは、歯周病予防効果のある食品素材をスクリーニングする過程で、LFに歯周病原菌由来LPSに対する強い不活性化作用があることを見出した。一方、歯周病が全身の健康にも影響を与えるという疫学調査が報告され始めた時期でもあり、歯周病原菌由来LPSがその仲介因子の一つとして考えられていた。そこで、全身の健康に関するパラメーターについても留意して検討を進めていたところ、偶然にもLFがマウスの内臓脂肪を低減するという現象を発見した。内臓脂肪低減効果の発見を契機に、脂肪細胞に対するLFの作用を検討した結果、LFが脂肪の合成を抑制するという新しい知見を見出し、動物実験の結果を裏付けるデータを取得した。しかしながら胃の消化酵素であるペプシンで分解したLFはその活性が消失することも明らかとなった。そこで、LF腸溶錠（胃で崩壊せずに小腸で崩壊する錠剤、すなわちペプシンによる分解を回避できる製剤）に着目し、

ライオン(株)において社内ヒト試験を実施したところ、8週間の摂取により、初期値と比較して有意な体重減少効果を見出し、とりわけ内臓脂肪の減少が顕著であることを確認した。

上述のヒト試験の課題として、社内のオープン試験であったことから、プラセボ効果を排除できていないことが挙げられた。そこで腸溶性 LF の有効性を科学的に証明するため、外部の臨床試験機関による二重盲検群間比較試験を実施した。肥満傾向の日本人男女（BMI 25 kg/m² 以上、内臓脂肪面積が被験者平均値として 100 cm² 以上）に対して、LF 群及び LF の代わりに乳糖を配合した群（プラセボ群）の 2 群（各群 n=13）を設定し、1日に 300 mg、8 週間摂取してもらった。被験者背景については測定したいずれの項目についても両群間に統計学的な有意差は認められなかった。また試験期間中の、試験食品の摂取率、運動量、エネルギー摂取量なども両群間で有意差は認められなかった。身体計測の結果では、LF の 8 週間摂取によりプラセボ群と比較して、体重、BMI、腹囲、臀部囲はそれぞれ 2.5 kg、0.9 kg/m²、3.5 cm、2.4 cm 減少し、有意差あるいは有意傾向が認められた（ANCOVA ; P=0.013, 0.041, 0.073, 0.032）。CT による腹部脂肪面積測定結果では、LF の 8 週間摂取によりプラセボ群と比較して、内臓脂肪面積は 12.8 cm² 有意に減少（P=0.0089）し有意差が認められた。一方、皮下脂肪面積、全体脂肪面積ではプラセボ群と比較した場合、LF 群で有意な減少が認められなかったことから、腸溶性 LF の体脂肪低減効果は内臓脂肪に特徴的に作用することが示唆された。血液検査の結果では、測定したいずれの項目においても、プラセボ群と比較して LF 群において有意な変動は認められなかった。また、本試験において有害事象は認められなかった。以上の結果から腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果を科学的に立証した。

腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果を明らかにしたが、その作用機序については不明であったため、腸溶性 LF の内臓脂肪低減効果の作用機序について検討した。作用機序を検討するに当たり、まず体内動態を検討し作用部位を推定することとした。ラットを用いて LF を強制胃内投与し、小腸内容物、血液、肝臓、腸間膜脂肪中の LF を解析した結果、未分解の LF

が一部小腸に到達していることを SDS-PAGE にて確認した。また、ELISA にて、血液、肝臓、腸間膜脂肪中の LF 量を解析した結果、血液、肝臓ではほとんど検出されず、腸間膜脂肪に局在していることを明らかにした。そこで、先に見出した脂肪細胞に対する LF の脂肪合成抑制作用に対する作用メカニズムの検討に着手した。前述の実験系について DNA マイクロアレイ解析を行った結果、LF が脂肪合成に関与する酵素群の遺伝子発現を抑制するのみならず、PPAR γ などの脂肪細胞の分化調節因子の発現を抑制することを見出した。一方、成熟脂肪細胞を用いて、脂肪の分解過程に対する LF の作用を検討した結果、LF が脂肪分解促進作用をも有することを新たに見出した。本実験系においても DNA マイクロアレイ解析を実施した結果、脂肪滴の周囲に存在し、リパーゼによる分解を防御するペリリピンの発現が LF により減少し、また脂肪分解に重要な経路である cAMP シグナリングパスウェイの変動も認められた。また cAMP シグナリングパスウェイの変動については、細胞内 cAMP 濃度を測定し、LF が脂肪細胞の cAMP 濃度を上昇させることを見出した。以上の結果から、経口摂取した腸溶性 LF は、胃で分解されずに小腸で吸収され、短時間のうちに内臓脂肪まで到達し、脂肪の合成抑制と分解促進の両作用により、内臓脂肪を低減することが推察された。

謝辞

本研究は、多くの方々のご協力のもと、東京大学総括プロジェクト機構総括寄付講座「食と生命」特任教授 加藤久典先生に統括指導して頂き、このように博士論文の形にすることができました。ここに謝意を述べさせていただきます。

本研究を推進するにあたり、研究全体を統括して頂いた京都府立医科大学名誉教授 西野輔翼先生に御礼申し上げます。先生にはライオン株式会社研究顧問として研究の方向性などを設定する際に常に親身になって相談に乗っていただきました。当社の LF 研究がここまで発展できたのは偏に西野先生のご尽力の賜物と考えております。深く御礼申し上げます。

ヒト試験の検討においては、医療法人親友会島原病院糖尿病内科部長吉田俊秀先生（京都府立医科大学元教授、京都市立病院元糖尿病代謝内科部長）にご助言を頂きました。LF の内臓脂肪低減効果はこれまで全く知られてなく、また当社は脂質代謝に関する知識、ノウハウを持ち合わせていなかったため、吉田先生のご助言なくしては、ヒト試験のデータ取得は出来なかったものと思われます。ここに深く感謝申し上げます。

脂肪細胞の検討においては、北海道大学大学院水産科学研究院教授 宮下和夫先生、同准教授 細川雅史にご指導頂きました。当社では脂肪細胞の培養のノウハウが無かったため、実験方法や研究の方向性の設定などで直接ご指導を頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

DNA マイクロアレイ解析では、東京大学総括プロジェクト機構総括寄付講座「食と生命」特任教授 加藤久典先生、同講座特任研究員 齊藤憲司博士にご指導頂きました。先生方には、当社の若手研究員を受託研究員として受け入れて頂き、直接 DNA マイクロアレイ解析の実験方法、データの解析方法についてご指導頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

更に、本研究に携わる機会を与えて下さり、また本研究遂行に際してご指導頂きました、

ライオン株式会社 顧問（元常務執行役員、立命館大学客員教授） 杉山圭吉博士、研究フェロー（前生命科学研究所長、横浜市立大学客員教授） 大寺基靖氏、生命科学研究所長（京都府立医科大学客員教授） 村越倫明博士、また共同研究者として、実験・解析を共に行って頂いた、薬品第1研究所（元含む） 鈴木則行副主研、古田恭子研究員、 生命科学研究所（元含む） 木川博光主研、鈴木苗穂副主研、森下聡副主研、藤原久美子副主研、生駒桂子副主研、廣島俊輔研究員、小坪美聡研究員、藤崎央子研究員、石原康晴研究員、中村佳菜恵研究員と、その他様々な実験においてご協力を頂いた皆様に深く感謝申し上げます。

最後に私的ではございますが、本研究の遂行にあたり影で支え、励ましてくれた妻 久美子、娘 陽菜に心からの感謝の意をここに記します。