

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 小野 知二

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・高脂血症のうち 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、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、がん予防作用等、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。一方、歯周病が全身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。そこで、全身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（図 1）。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㈱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。そこで腸溶性ラクトフェリン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 25kg/m^2 以上、内臓脂肪面積が被験者平均値として 100cm^2 以上）に対して、ラクトフェリン群及びラクトフェリン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 300mg 、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、エネルギー摂取量等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、ラクトフェリンの 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/m^2 、 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、ラクトフェリンの 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 (P=0.0089)。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、ラクトフェリン群で有意な減少が認められなかったことから、腸溶性ラクトフェリン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ラクトフェリン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。ラットを用いてラクトフェリンを強制胃内投与し、小腸内容物、血液、肝臓、腸間膜脂肪中のラクトフェリンを解析した結果、未分解のラクトフェリン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、腸間膜脂肪中のラクトフェリン量を解析した結果、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ラクトフェリン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、ラクトフェリン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 等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ラクトフェリンの作用を検討した結果、ラクトフェリン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ラクトフェリンにより減少し、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、ラクトフェリンが脂肪細胞の 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。

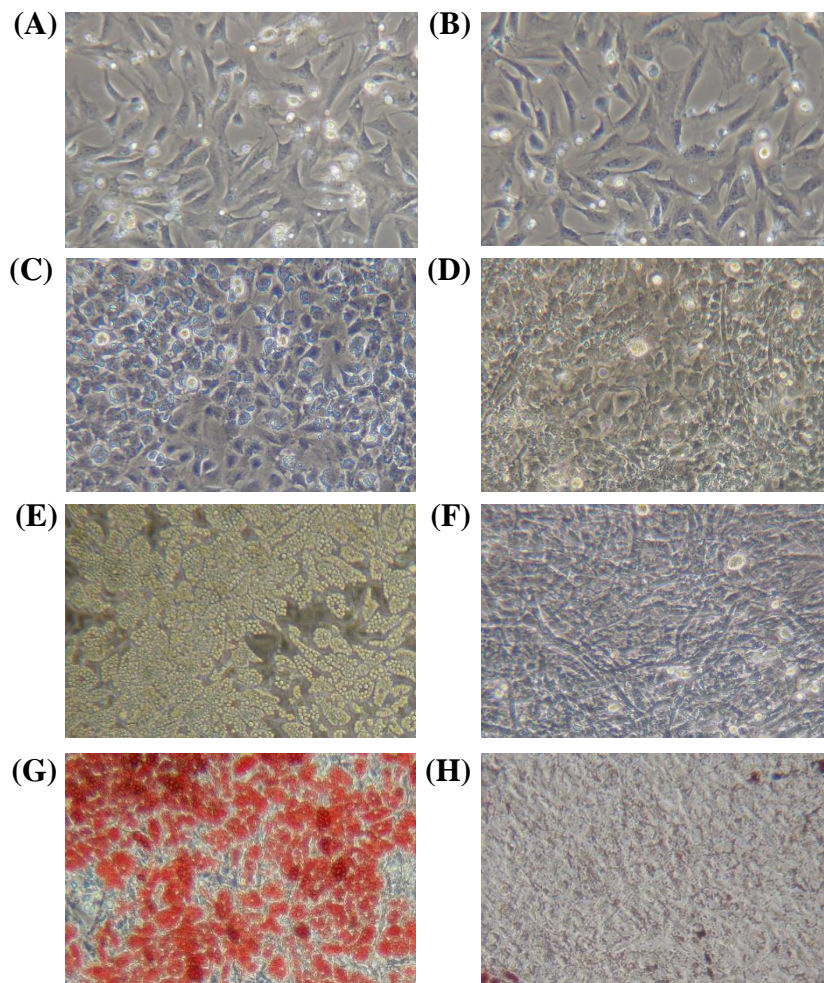


図1 位相差顕微鏡による脂肪細胞観察結果。前駆脂肪細胞はラット腸間膜脂肪組織より単離し、脂肪細胞分化培地にて培養を行った。培養開始時に LF を 300 μ g/ml の濃度で添加し、Control は無添加とした。(A) control 2 d、(B) LF 2 d、(C) control 4 d、(D) LF 4 d、(E) control 6 d、(F) LF 6 d、(G) control 7d、oil red O 染色後、(H) LF 7d oil red O 染色後