

牛乳由来 α -ラクトアルブミンの
抗炎症作用に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科

山口 真

2014

目次

	頁
緒論	1
第1章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの新規作用： シクロオキシゲナーゼ-2阻害による鎮痛および抗炎症作用	5
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
図表	
第2章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの小腸虚血再灌流障害に対する抑制効果	20
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
図表	
第3章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの大腸発がんに対する抑制効果	35
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
図表	
総括	54
謝辞	55
引用文献	56

緒 論

哺乳類の乳成分組成は、出生後の子の成長速度、発育環境などによって異なっている。たとえば、牛乳と人乳の一般成分組成を比較すると、タンパク質および糖質含量が著しく異なっており、牛乳の方が高濃度となっている (Jenness R, 1982)。これは、成長が速い動物ほど、体をつくるタンパク質が多量必要になることがその理由であると考えられている。成長速度は出生時の体重が 2 倍になる日数で表すと、ウシとヒトではそれぞれ約 50 日と 90~120 日であり、ヒトは最も成長の遅い哺乳動物となる。したがって、ヒトの乳は、哺乳動物の中で最もタンパク質含量が少ない。しかし、乳の脂質含量は、ウシとヒトではほぼ同じであり、生活環境が全く違うクジラなどの乳には 5 倍以上も多く含まれている。水棲動物は、陸棲動物よりも体熱の損失が大きく、多量のエネルギーを消費するからである。一方、ウシとヒトの乳の灰分含量は、タンパク質と同じように異なっている。しかし、タンパク質/灰分比をみるとほとんど差がみられない。タンパク質の溶解には、それに見合った塩類（灰分）が必要だからである。

タンパク質、脂質および糖質は、体のエネルギー源となる三大栄養素である。これらの栄養素のエネルギー比(PFC エネルギー比)を比較すると、牛乳と母乳の脂質エネルギー比は全エネルギーの 45~50%であり、また初乳と成熟乳でもほとんど差がみられない (Christie WW, 1983)。しかし、タンパク質エネルギー比は初乳から成熟乳にかけて低下する。この変化は、乳タンパク質には様々な役割があることを示唆している。

タンパク質は約 20 種類のアミノ酸が鎖状に結合した巨大分子（ペプチド鎖）であり、自然界には無数のタンパク質が存在する。牛乳中の主要タンパク質は、乳腺細胞で合成または修飾されたもの、血液中から移行したものなどがある。前者にはカゼイン、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミンなどがあり、後者には血清アルブミン、免疫グロブリンなどがある。しかし、乳のタンパク質濃度が血液よりも高く、しかも乳腺細胞ではつくられず、単に移行とは考え難いタンパク質も存在する。哺乳動物の乳にもタンパク質とその関連物質が 100 種類以上含まれている (Jenness R, 1982)。

また、乳のタンパク質は、いずれの動物種もカゼインとホエイタンパク質に分けることができる。カゼインはアミノ酸以外にリンを含む複合タンパク質であり、乳特有のリンタンパク質である (Schmidt DG, 1982)。乳の pH は血液とほぼ同じ中性 (7.0) であり、牛乳では pH 約 6.8 である。牛乳から脂肪を除いた脱脂乳に酸 (乳酸, 塩酸など) を加えて pH4.6 にすると、カゼインは容易に凝集して沈殿する。また、牛乳に凝乳酵素を作用すると、豆腐状に凝固する。この凝固物の本体がカゼインであり、チーズはこの凝固物からつくられる。

ホエイは、牛乳からカゼインを取り除いた薄黄色の透明な溶液である。ホエイには種々のタンパク質が含まれている。ホエイタンパク質の分画には、当初塩類濃度や pH によるタンパク質の溶解性の差が利用された。すなわち、ホエイ (pH7) に 50%飽和まで硫酸アンモニウムを加えて沈殿するタンパク質はラクトグロブリン、さらに飽和状態で沈殿するタンパク質はラクトアルブミンと呼ばれる。この分画は、ホエイタンパク質分画の最初の操作として汎用されている (Pearce RJ *et al.*, 1983)。

哺乳類の新生仔は出生後の一定期間を母親が分泌する乳のみを食物として摂取することで発育する。出生直後の新生仔には十分な感染防御機能や免疫機能は備わっていないことや、新生仔の成長速度は成体のそれと比べて顕著に早いことなどから、乳成分は単に栄養機能を果たすだけでなく、新生仔の健全な発育のための生理機能も有していると考えられている。ホエイにはこれらの生理機能を有している成分の多くが移行している。それゆえ、ホエイ画分に含まれる生理機能成分を加工・抽出し、バランス栄養食品や経管栄養向けの利用が高まっている。牛乳のホエイでは、主要な成分としてβ-ラクトグロブリン、α-ラクトアルブミン、血清アルブミンと免疫グロブリン、わずかに含まれる成分としてラクトフェリンがあるほか、ビタミン結合タンパク質などの微量タンパク質の存在も知られている。

ここで、ホエイタンパク質の栄養的な価値についても触れておく。ホエイタンパク質は、必須アミノ酸含量が高く、生物学的な価値も高い。タンパク質の栄養的価値は、必須アミノ酸と非必須アミノ酸の配合比率が均衡の取れている状態で、そのタンパク質が窒素を供

給する機能を備えているかどうかで決まる。乳幼児の場合には成長の度合いによってタンパク質の栄養価が評価され、成人の場合には窒素保持機能によってその窒素バランスが評価されてきている (Miller DS *et al.*, 1955)。1 g のタンパク質を摂取した場合に体重が何 g 増加するかを示すタンパク質効率 (PER, Protein Efficiency Ratio) は、大豆タンパク質が 2.0、カゼインが 2.5 に対してホエイタンパク質が 3.0 となっている (Hackler LR *et al.*, 1963)。また、吸収された窒素量に対する体内に保持された窒素量の割合を示す生物価 (BV, Biological Value) は大豆タンパク質 74、カゼイン 71 に対してホエイタンパク質が 104 と高い。

ホエイタンパク質は食した後、短時間で小腸に到達するものの、腸内での加水分解はカゼインに比較して緩慢であるため、その消化と吸収は腸の広い範囲で行われる (Boirie Y *et al.*, 1997)。ホエイタンパク質がアミノ酸の供給源としてのみならず、様々な機能性を併せ持っているのは、このようなユニークな消化吸収の特性に起因する可能性もある。

免疫反応は、病原性微生物のみならず異種動物の成分や細胞、動植物由来のタンパク質や多糖類、化学物質等、「自己」以外のあらゆるものに対して起こり得る。生体に異物が侵入すると、貪食作用を有するマクロファージに取り込まれ、免疫担当細胞の活性化に必要なサイトカインを産生する。ホエイタンパク質はこれらの免疫応答を調節する機能を持ち、免疫系や炎症に関係した種々の細胞の機能に影響を及ぼす (Marshall K *et al.*, 2004)。例えば、人乳の初乳中に多いタンパク質であるラクトフェリンの機能性に関しては、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗がん作用などが報告されている (島崎敬一, 2001)。しかしながら、ラクトフェリンは牛乳中にはわずかしか含まれていないため、機能性成分として利用する上では、精製コストが高くなるという難点がある。

そこで、本研究では、牛乳と人乳の両方に豊富に含まれている、 α -ラクトアルブミンに着目した。 α -ラクトアルブミンは、牛乳タンパク質中の約 4%、人乳タンパク質中には約 18%含まれており、他の多くの哺乳類の乳にも含まれる。また、 α -ラクトアルブミンは、乳腺細胞内で乳糖の生合成に不可欠なタンパク質であり、 α -ラクトアルブミン含量と乳糖の間には高い相関関係があることが明らかになっている (Kleinberg DL *et al.*, 1983)。

本研究では、 α -ラクトアルブミンの生理機能のひとつとして鎮痛および抗炎症作用に着目し、鎮痛および抗炎症作用を発揮するメカニズムを解明することを目的に、疼痛に対する作用（マウス酢酸ライジングモデル）、急性炎症に対する作用（ラットカラゲニン浮腫モデル）、慢性（亜急性）炎症に対する作用（ラットアジュバント関節炎モデル）、アラキドン酸代謝関連酵素に対する阻害活性をそれぞれ検討した。さらに、ラット虚血再灌流モデル、マウス大腸発がんモデルを用いて、 α -ラクトアルブミンの抗炎症作用に基づく新しい機能性を解明しようと試みた。

第1章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの新規作用：シクロオキシゲナーゼ-2 阻害による鎮痛および抗炎症作用

緒言

近年では、乳成分は、健康上のアウトカムに直接的な効果を有することが示唆されており、機能性食品として認識されるようになってきている (Marshall K *et al.*, 2004)。ミルクには2つの主要なタンパク質源、カゼインとホエイが含まれている。ホエイは、数々の健康上の利点から機能性食品としても注目されている。ホエイタンパク質画分は、4つの主要なタンパク質画分、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、血清アルブミン、および免疫グロブリンを含む。ホエイの構成成分は、免疫賦活作用 (Low PP *et al.*, 2003)、酸化防止作用 (LinksBrown EC *et al.*, 2004)、抗圧作用 (Saito T. 2008)、抗腫瘍作用 (Bounous G *et al.*, 1991)、脂質低下作用 (Marshall K *et al.*, 2004)、ウイルス感染防御作用 (Neurath AR *et al.*, 1996)、抗菌作用 (Shah NP *et al.*, 2000) と、キレート作用 (Hurrell RF *et al.*, 1989) などを示すことが知られている。

ホエイタンパク質の微量成分であるラクトフェリンが、単球からの炎症性サイトカイン TNF- α 、インターロイキン (IL) -1 β および IL-6 産生を阻害することはよく知られている (Crouch SP *et al.*, 1992)。私たちは、ラクトフェリンがリポ多糖による肝臓の単球 (クッパー細胞) の刺激によって誘導される腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor; TNF) - α の産生を抑制することを確認した (Yamaguchi M *et al.*, 2001)。最近、ラクトフェリンが、熱刺激による疼痛、酢酸による内臓痛、ホルマリンによる炎症性疼痛を抑制することが報告されている (Hayashida K *et al.*, 2003)。しかしながら、その作用メカニズムの詳細は明らかになっておらず、またホエイタンパク質の主要な成分である β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンの作用については、明らかにされていない。

シクロオキシゲナーゼ (COX) およびホスホリパーゼ A2 (PLA2) により合成されるプロスタグランジン類は、疼痛および炎症の主要なメディエーターである (Smith HS *et al.*,

2006)。COX 阻害剤である非ステロイド系抗炎症剤（たとえば、アスピリン、ジクロフェナク、インドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、ピロキシカム）や PLA2 阻害剤は、抗炎症、鎮痛、解熱を目的に、世界各国で広く用いられている。

これらの背景を踏まえて、第 1 章では各種動物モデルを用いて、 α -ラクトアルブミンの鎮痛活性、 α -ラクトアルブミンの抗炎症活性、COX および PLA2 に着目した α -ラクトアルブミンの作用メカニズムを明らかにしようとした。本研究では、内臓痛・体性痛のモデルであるマウス酢酸ライジング、ラットカラゲニン足浮腫、リウマチ性関節炎のモデルであるラットアジュバント関節炎のモデルを用いた。

材料および方法

実験動物の飼育

本実験で使用した実験動物は恒温恒湿室（温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ ）において 7 時～19 時、19～7 時の 12 時間毎の明暗サイクル環境下で飼育し、この間、水と飼料は自由に摂取させた。本研究のすべての実験プロトコールは、明治乳業株式会社（現・株式会社 明治）動物実験倫理委員会の承認を受け、委員会の定める動物実験における倫理規程に則って行った。

マウス酢酸ライジングモデル

マウス（ICR, 雄, 20~25 g, 日本クレア）の腹腔内に 0.6%酢酸を 0.3 mL 投与することにより疼痛関連行動（ライジング；身もだえるような症状）が惹起される。マウスは 4 つの群に割り付けた（ $n=6$ ）：1) 対照群；2) α -ラクトアルブミン（300 mg/kg 体重）投与群；3) β -ラクトグロブリン（300 mg/kg 体重）投与群；4) ジクロフェナク（50 mg/kg 体重）投与群。試験物質および溶媒（対照群に対する生理食塩水）は 10 mL/kg で、酢酸投与の 1 時間前に経口投与した。酢酸投与後の 20 分間にわたり疼痛関連行動の回数を測定した。

マウス酢酸ライジングモデルにおける α -ラクトアルブミンの用量反応性試験

α -ラクトアルブミン3用量 (30, 100, 300 mg/kg 体重) について, 生理学的効果を発揮する用量を検討した。マウス (ICR, 雄, 20~25 g, 日本クレア) に対し, 試験物質および溶媒 (対照群に対する生理食塩水) は 10 mL/kg 体重で, 酢酸投与の 1 時間前に経口投与した。酢酸投与後の 20 分間にわたり疼痛関連行動の回数を測定した。

ラットカラゲニン足浮腫モデル

ラット (Wistar, 雄, 200~250 g, 日本クレア) の後肢足踵に 1%カラゲニンを 0.1 mL 皮下投与することにより浮腫を形成させた。 α -ラクトアルブミン3用量 (30, 100, 300 mg/kg 体重), ジクロフェナク (50 mg/kg 体重), および溶媒 (対照群, 生理食塩水) は 4 mL/kg 体重で, カラゲニン皮下投与の 1 時間前に経口投与した。カラゲニン投与後の 3 時間後に足容積を容積計で測定した。

ランダルセリット法による鎮痛活性試験

ラット (Wistar, 雄, 200~250 g, 日本クレア) の後肢足踵に 1%カラゲニンを 0.1 mL 皮下投与することにより浮腫を形成させた。 α -ラクトアルブミン3用量 (30, 100, 300 mg/kg 体重), ジクロフェナク (50 mg/kg 体重), および溶媒 (対照群, 生理食塩水) は 4 mL/kg 体重でカラゲニン皮下投与の 1 時間前に経口投与した。カラゲニン投与前およびカラゲニン投与 3 時間後の逃避閾値をランダルセリット装置 (ラットの後肢を一定の速度で加圧していき, ラットが痛みを感じて反応したときの圧力が記録される) により測定した。

後肢浸出液中の IL-6 と PGE2 測定

ランダルセリット試験の終了後, 麻酔下でラットを放血により安楽死させた。踝より下部を切断し, 浮腫部位の皮膚に切開を加え遠心し, 遠心後の浸出液を採取した。適度に希釈後, 浸出液中の IL-6 と PGE2 を測定した。

ラットアジュバント関節炎モデル

ラット後肢足蹠に完全フロイントアジュバントを 0.1 mL 皮内投与し、亜急性な関節の腫脹を形成させた。

ラットアジュバント関節炎モデルにおける α - ラクトアルブミンの治療効果

ラット (Wistar, 雄, 200~250 g, 日本クレア) は4つの群に割り付けた (n=6)。1) 対照群; 2) α - ラクトアルブミン (300 mg/kg 体重) 投与群; 3) β - ラクトグロブリン (300 mg/kg 体重) 投与群; 4) ジクロフェナク (50 mg/kg 体重) 投与群。試験物質および溶媒 (対照群に対する生理食塩水) は完全フロイントアジュバント投与後 14 日目より 3 日間連続で経口投与した。完全フロイントアジュバント投与後 14, 15, 17 日目に足容積を容積計で測定した。

ラットアジュバント関節炎モデルにおける α - ラクトアルブミンの鎮痛効果

ラット (Wistar, 雄, 200~250 g, 日本クレア) は4つの群に割り付けた (n=6) : 1) 対照群; 2) α - ラクトアルブミン (300 mg/kg 体重) 投与群; 3) β - ラクトグロブリン (300 mg/kg 体重) 投与群; 4) ジクロフェナク (50 mg/kg 体重) 投与群。試験物質および溶媒 (対照群に対する生理食塩水) は完全フロイントアジュバント投与後 16 日目に経口投与した。腫脹した関節の屈伸運動を 10 回行ったときの屈曲痛に伴う苦悶行動 (鳴啼およびもがき反応) の回数を測定した。

酵素阻害実験

α - ラクトアルブミンの鎮痛効果および抗炎症効果の作用機序について検討するために、 α - ラクトアルブミンのシクロオキシゲナーゼ (COX) およびホスホリパーゼ A2 (PLA2) 阻害活性を検討した。COX 阻害活性は、COX により産生される PGH₂ を SnCl₂ で還元して得られる PGE₂ を EIA により測定することで求めた。PLA2 阻害活性は、1-パルミトイ

ル-2-[1-¹⁴C]オレオイル-L-3-ホスファチジルコリンからの酵素反応生成物である ¹⁴C-オレイン酸を EIA により測定することで求めた。それぞれの用量反応曲線を用いて、50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。

試薬

β-ラクトグロブリン (BioPURE-Betalactoglobulin), α-ラクトアルブミン (BioPURE-Alpha lactalbumin) はダビスコフーズより購入した。酢酸, ジクロフェナク, カラゲニン, 完全フロイントアジュバントは和光純薬工業より購入した。

統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。得られた結果の統計解析は, Dunnett's multiple comparison test (parametric test) および Mann-Whitney's U Test (non-parametric test) により検定し, $p<0.05$ を有意と判定した。

結 果

マウス酢酸ライジングモデルにおける α-ラクトアルブミンの鎮痛効果

酢酸 (0.6%, 0.3 mL) の腹腔内投与により, マウスは疼痛関連行動 (ライジング, 身もだえるような症状) を示した (Fig. 1a)。α-ラクトアルブミンの経口投与により疼痛は有意に抑制された ($p<0.05$ vs. 対照群)。一方, β-ラクトグロブリンにはそのような効果はみられなかった。非ステロイド系抗炎症剤であるジクロフェナクは疼痛関連行動を有意に減少させた ($p<0.01$)。α-ラクトアルブミンは用量依存的に疼痛を抑制した (Fig. 1b)。その最小有効用量は 300 mg/kg であった。

ラットカラゲニン足浮腫モデルにおける α-ラクトアルブミンの浮腫抑制効果

カラゲニン (1%, 0.1 mL) の後肢足踵皮下投与により, ラットの後肢足踵に浮腫が形成された (Fig. 2)。α-ラクトアルブミンは用量依存的に足浮腫の形成を抑制した (100 mg/kg

体重と 300 mg/kg 体重, $p<0.05$ vs. 対照群)。ジクロフェナク投与により足浮腫の形成は有意に減少した ($p<0.01$)。

ランダルセリット法による α -ラクトアルブミンの鎮痛効果

カラゲニン (1%, 0.1 mL) を後肢足腫に皮下投与した対照群のラットでは, 正常なラットに比較して逃避閾値が著しく減少した (Fig. 3)。 α -ラクトアルブミンは用量依存的に鎮痛効果を示した (100 mg/kg と 300 mg/kg, $p<0.05$ vs. 対照群)。ジクロフェナクは逃避閾値を有意に増加させた ($p<0.01$)。

後肢浸出液中の IL-6 と PGE2 の変化

カラゲニン (1%, 0.1 mL) を後肢足腫に皮下投与した対照群のラットでは, 正常なラットに比較して, 浸出液中の IL-6 (Fig. 4a) と PGE2 (Fig. 4b) が著しく増加した。 α -ラクトアルブミンは用量依存的に IL-6 と PGE2 を減少させた (300 mg/kg, $p<0.05$ vs. 対照群)。ジクロフェナクは IL-6 と PGE2 を有意に減少させた ($p<0.01$)。

ラットアジュバント関節炎モデルにおける α -ラクトアルブミンの治療効果

対照群のラットでは, 試験期間中 (完全フロイントアジュバント投与後 14 日目より 3 日間), 緩やかに関節の腫脹が増大した (Fig. 5a)。 α -ラクトアルブミン投与群では関節の腫脹の増大が抑制された ($p<0.05$ vs. 対照群)。一方, β -ラクトグロブリンにはそのような効果はみられなかった。ジクロフェナクは関節の腫脹を有意に抑制した ($p<0.01$)。

ラットアジュバント関節炎モデルにおける α -ラクトアルブミンの鎮痛効果

完全フロイントアジュバント投与後 16 日目のラットでは, 腫脹した関節に屈曲痛がみられた (Fig. 5b)。 α -ラクトアルブミン投与群では屈曲痛が有意に抑制された ($p<0.05$ vs. 対照群)。一方, β -ラクトグロブリンにはそのような効果はみられなかった。ジクロフェナクは屈曲痛を有意に改善した ($p<0.01$)。

α -ラクトアルブミンの COX-1, COX-2, PLA2 酵素阻害活性

α -ラクトアルブミンは COX-2 阻害活性を有しており、その 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 37 μ mol/L であった (Fig. 6a)。 α -ラクトアルブミンの COX-1 阻害は 39%阻害濃度として 704 μ mol/L (反応系に添加可能な最大濃度) であることから、COX -2 に対して選択的な阻害活性を示すことが明らかになった。また、 α -ラクトアルブミンは PLA2 阻害活性を有しており、その 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 76 μ mol/L であった (Fig. 6b)。

考 察

痛みは危険を避け、身を守るために有益なシグナルであるが、関節痛、腹痛などの病的な痛みは、生活の質 (Quality of Life: QOL) を低下させる。そのため、痛みを取り除いたり、軽減したりすることは QOL の向上に重要である。本研究から、経口投与した α -ラクトアルブミンは、疼痛と炎症に対し予防的および治療的効果をもつことが明らかとなった。

ミルクは雌の哺乳類の乳腺で生成される不透明な白色の液体である。牛乳には、平均して 3.4%のタンパク質、3.6%脂肪、4.6%ラクトース、0.7%のミネラルが含まれており、100 mL 当たりのエネルギーは 66 キロカロリーである。 α -ラクトアルブミンは牛乳 (100 mL) 中に約 120 mg 存在しており、他の多くの哺乳動物種の乳中にも存在する。

足蹠へのカラゲニンの投与による急性炎症モデルにおいて、浮腫は顕著な COX mRNA および thromboxane mRNAs の増加を伴い引き起こされる (Seibert K *et al.*, 1994)。本実験においても、カラゲニンの投与は、投与を受けた足における COX の増加に関連した PGE2 の産生増加と著しい浮腫を誘発した。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) は、COX 酵素を阻害することによって痛みを緩和する (Schmelzer KR *et al.*, 2006)。COX-2 選択的阻害剤は、炎症および疼痛に関与する酵素を標的とした NSAID である。COX-2 に対する選択性は、消化性潰瘍の危険性を減少させる (Stichtenoth DO *et al.*, 2004)。本研究では、 α -ラクトアルブミンは COX を阻害した。さらに α -ラクトアルブミンは、COX-1 と

比較して、COX-2 に選択性を示した。これらの結果は、 α -ラクトアルブミンは胃腸副作用を示さず、効果的に炎症を抑制することを示唆している。

α -ラクトアルブミンは胃粘液産生細胞でムチン合成および分泌を刺激することにより粘液ゲル層を保護すること、およびこの保護効果は、内因性 PGE₂ とは無関係であることが報告されている (Ushida Y *et al.*, 2007)。 α -ラクトアルブミンが、胃の蠕動運動に寄与する胃粘液産生細胞にムチン合成および分泌を刺激することは、 α -ラクトアルブミンによる粘液代謝の刺激を示唆し、胃粘膜内粘液ゲル層の厚さを増加させ誘導する可能性を示している。

カラゲニン誘発炎症性疼痛では、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、および IL-6 が炎症反応の初期において重要な役割を果たしている (Chou TC *et al.*, 2003)。本研究では、 α -ラクトアルブミンは炎症性疼痛における予防および治療効果を有することを実証した。また、 α -ラクトアルブミンは IL-6 の生成を阻害することにより鎮痛および抗炎症効果を発揮した。

カラゲニン誘発足浮腫は二相性の炎症モデルであると考えられている。キニンの産生に続くヒスタミンおよび 5-ヒドロキシトリプタミンの放出による第一段階、PG 産生が引き起こされる第二段階に分けられる。また、浮腫の第二段階 (3 時間) において抗炎症薬が最も有効であることが報告されている (Arunachalam G *et al.*, 2002)。カラゲニン投与後 3 時間目でみられた α -ラクトアルブミンの抗炎症効果は、 α -ラクトアルブミンが PG 産生を阻害したことを示唆している。

COX-1 および COX-2 isozymes の異なる特性および機能は、これらのタンパク質の活性部位に小さな構造的な違いがあり、それは分子レベルで説明することができる。COX-1 のアミノ酸配列にあるイソロイシン-434 および-523 が、COX-2 ではイソロイシンより小さいバリン残基によって置換されている (Botting RM, 2006)。したがって、COX-2 の活性部位における結合ポケットは、COX-1 の場合よりもより広々としている。COX-2 上の α -ラクトアルブミンの選択性は、結合部位の構造におけるポケットの広さに依存していると考えられる。これらの点はさらなる研究が必要である。

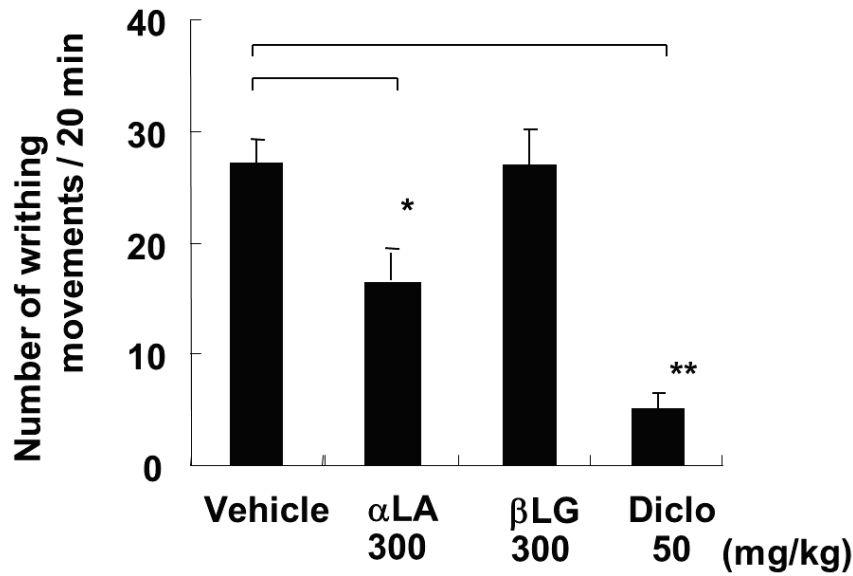
本研究で示した鎮痛および抗炎症作用に加えて、 α -ラクトアルブミンは免疫調節作用および小腸の成熟など、多彩な機能を有する (Lönnnerdal B *et al.*, 2003)。 α -ラクトアルブミンは哺乳動物の乳汁に含まれているタンパク質であることから、各哺乳動物種の乳幼児用に最適化されていると考えられる。カゼインは胃の中で酸性条件におかれると塊 (カード) となるが、 α -ラクトアルブミンを含めてホエイタンパク質は酸性条件下においても可溶性タンパク質であるため、胃から速やかに排出される (Boirie Y *et al.*, 1997)。このような α -ラクトアルブミンのユニークな特徴は、腸管内での生理活性を維持と関連する可能性が考えられる。

牛乳が示す生物学的活性は、主に牛乳中のタンパク質およびペプチドが担っていると考えられる。また、乳タンパク質の示す生物活性のいくつかは、潜在的であり、タンパク質が酵素により分解された際に産生されるペプチドに由来する (Clare DA *et al.*, 2000)。生理活性ペプチドは、胃腸管において、そしてまた、発酵食品加工中のミルクの消化中に生成される。生理活性ペプチドの生理学的効果は、小腸上皮を通しての吸収性や、血液を介しての末梢器官への送達性に依存する。したがって、 α -ラクトアルブミンが示す顕著な鎮痛および抗炎症効果に関しても、ペプシンおよび膵臓の酵素 (トリプシン, キモトリプシン, カルボキシおよびアミノペプチダーゼ) による消化により生成するペプチドに起因する可能性が考えられる。

α -ラクトアルブミンの LD_{50} は 2000 mg/kg 体重 以上であることが報告されている (Hayasawa H *et al.*, 2004)。これは α -ラクトアルブミンの毒性が極めて低いことを示す。したがって、 α -ラクトアルブミンは鎮痛および抗炎症効果を発揮する用量範囲において安全であることが保障されている。

本研究において、牛乳由来 α -ラクトアルブミンが鎮痛および抗炎症作用をもち、そのメカニズムとして従来の研究では報告されていない COX-2 阻害活性をはじめて明らかにした。以上の結果から、 α -ラクトアルブミンは、抗炎症剤を必要とする疼痛をもつ患者に対して、安全に使用できる、有用な生物資源であると考えられる。

(a)



(b)

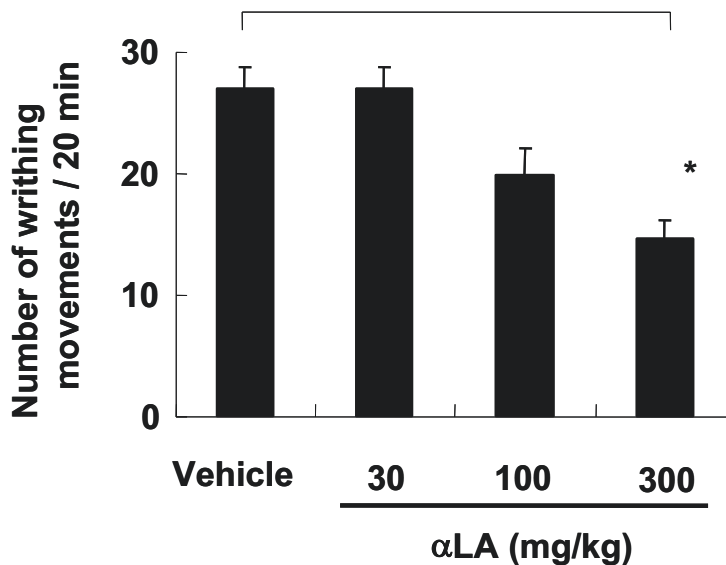


Fig. 1. The effect of α LA, β LG or diclofenac on acetic acid-induced writhing. α LA (300 mg/kg), β LG (300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg; positive control) or vehicle (saline) was administered orally at 1 hr prior to the acetic acid injection (0.6%, 0.3 mL/body; *i.p.*) (a). Does response effect of α LA (30, 100, 300 mg/kg) on the acetic acid-induced writhing was also determined (b). Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant differences from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

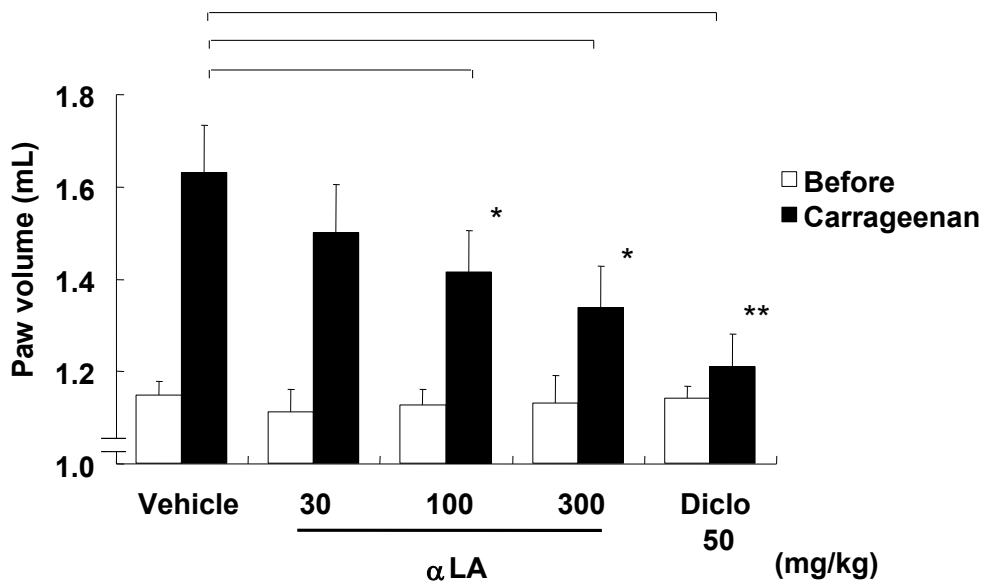


Fig. 2. The effect of α LA or diclofenac on carrageenan-induced inflammation elicited in the hind paw. α LA (30, 100, 300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg; positive control) or vehicle was administered orally at 1 hr prior to the carrageenan injection. The paw volume was measured at 0 and 3 hrs after the intraplantar injection of 1% carrageenan (0.1 mL). Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

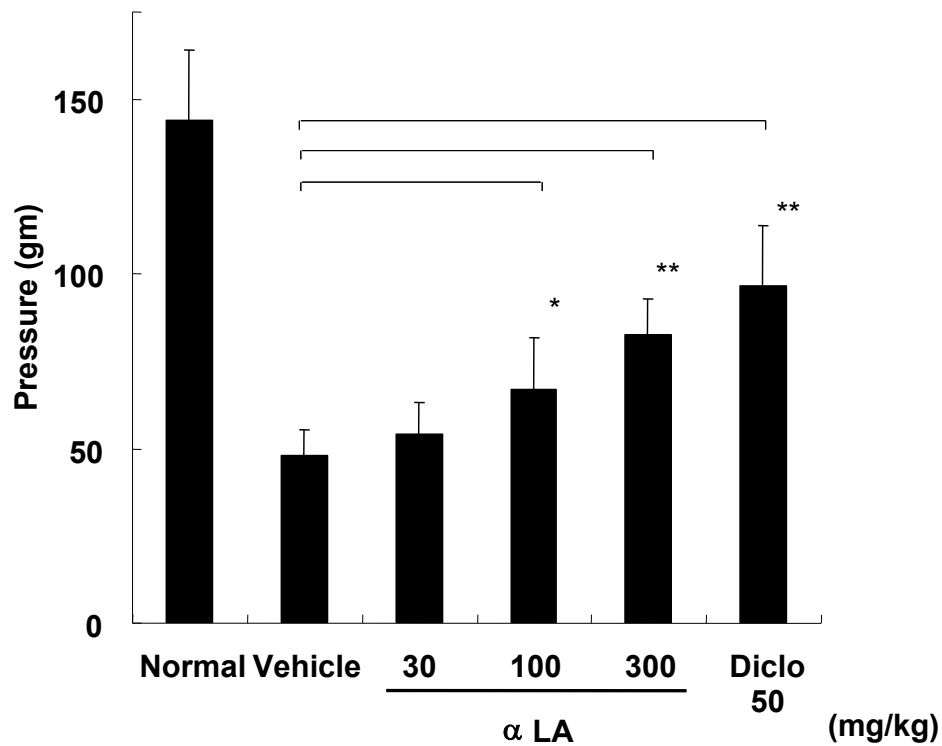


Fig. 3. The effect of α LA or diclofenac on nociception during the Randall & Selitto test. α LA (30, 100, 300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg; positive control) or vehicle (saline) was administered orally at 1 hr prior to the carrageenan injection. The threshold for pain sensation was measured at 3 hrs after the intraplantar injection of 1% carrageenan (0.1 mL). Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

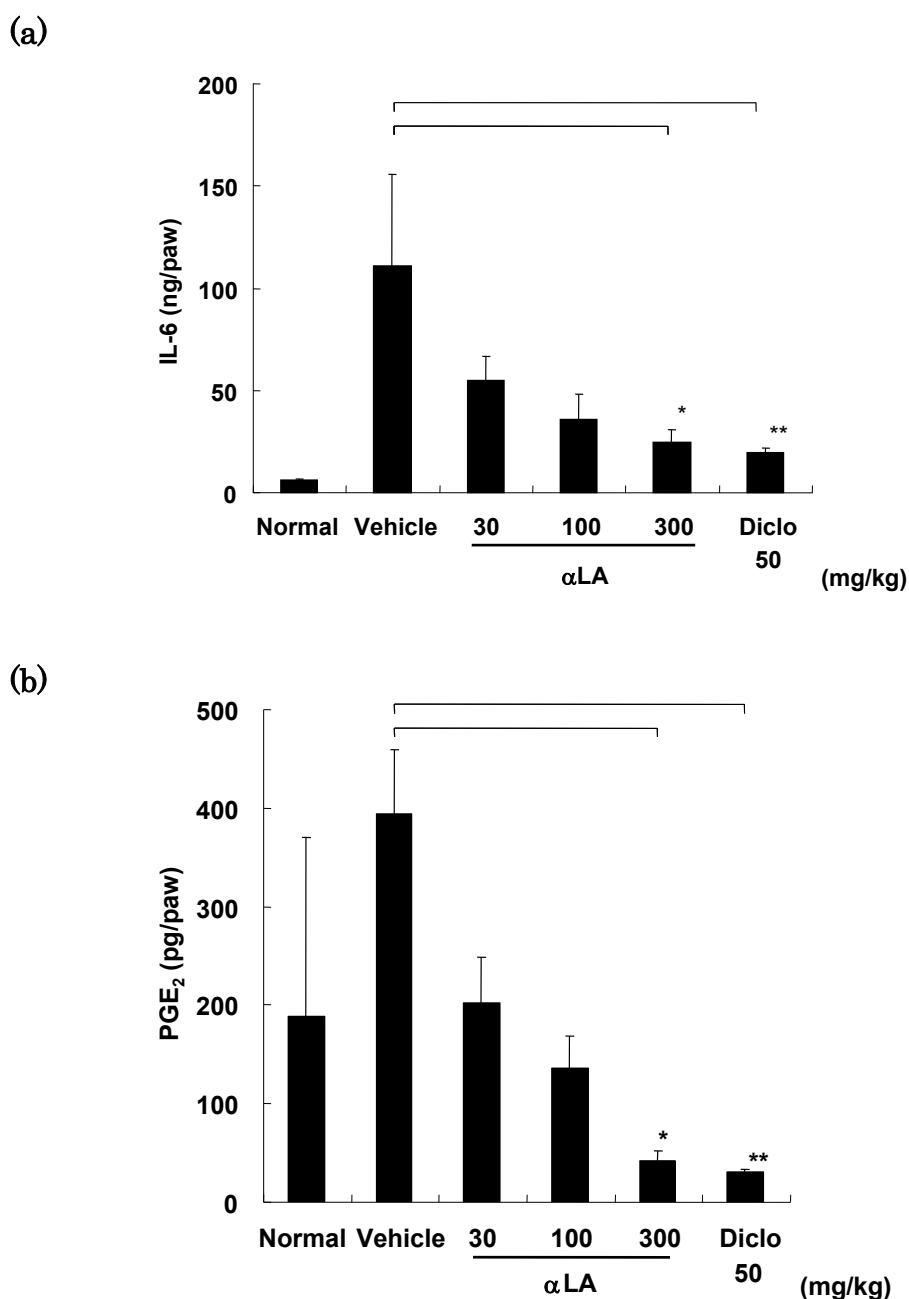


Fig. 4. IL-6 and PGE₂ concentrations in paw exudates collected from the carrageenan-induced inflammation model rats preadministered with α LA. α LA (30, 100, 300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg; positive control) or vehicle (saline) was administered orally at 1 hr prior to the carrageenan injection. At 3 hrs after carrageenan injection, the hind paws were cut at the level of the calcaneus bone and centrifuged to collect the exudates. IL-6 (a) and PGE₂ (b) concentrations in the paw exudates were measured by ELISA as described in the text. Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

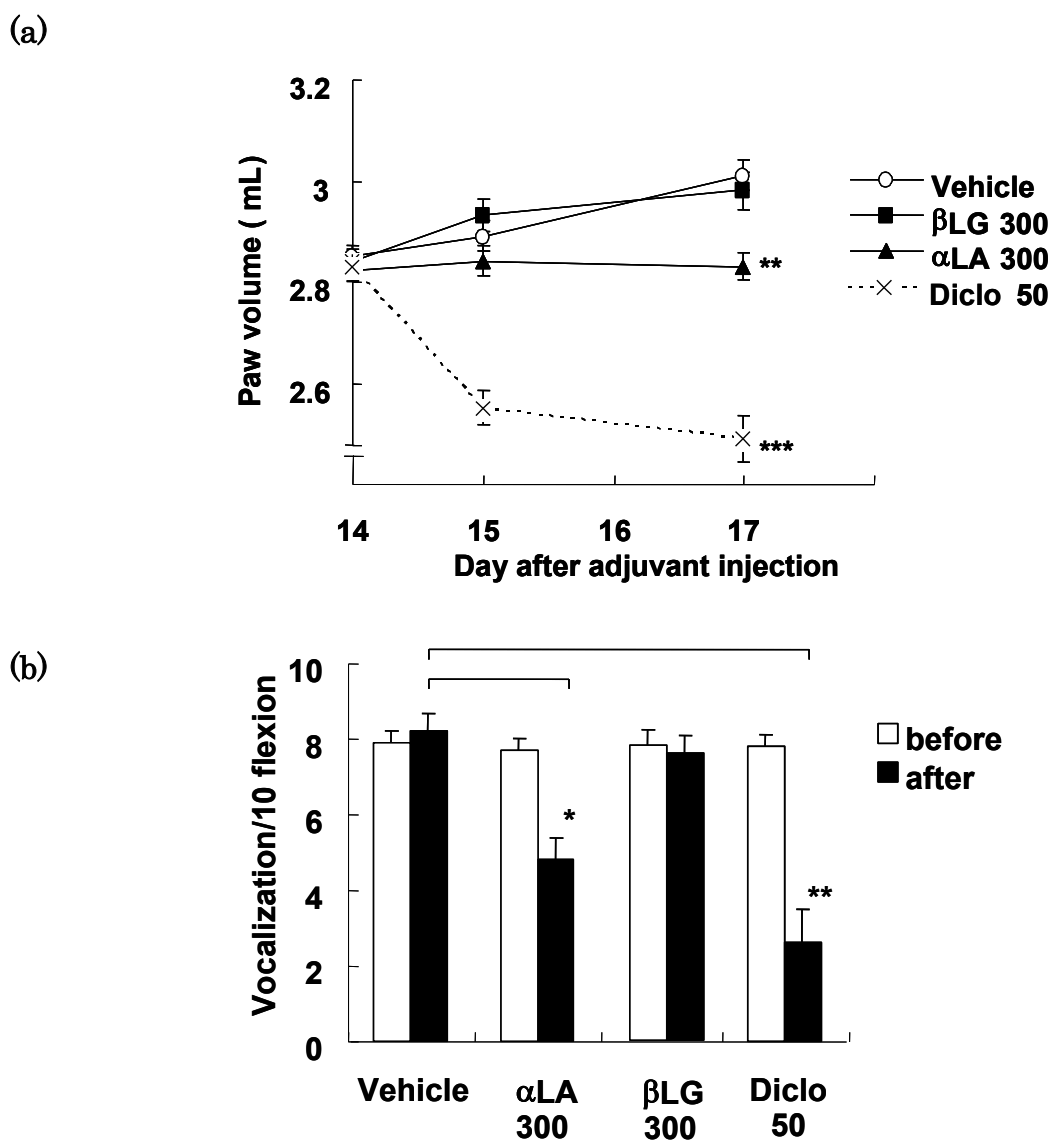
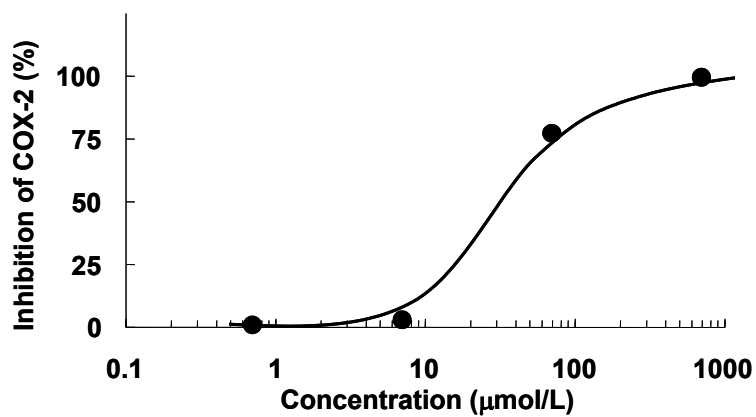


Fig. 5. The effects of α LA and β LG on the inflammation elicited by the adjuvant arthritis.

To examine the therapeutic effect of α LA and β LG on the adjuvant arthritis, the rats received a subplantar injection of Freund's complete adjuvant (100 μ L) in the left hind paw under ether anesthesia on the first day of the experiments (day 0). α LA (300 mg/kg), β LG (300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg; positive control) or saline (vehicle) was administered once a day for consecutive 3 days, starting at day 14 after the injection of Freund's complete adjuvant. The hind paw volume was measured by water displacement plethysmometry (a). To examine the preventive effects of α LA and β LG on joint hyperalgesia in the adjuvant-induced arthritis, α LA (300 mg/kg), β LG (300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg; positive control) or saline (vehicle) was administered at day 16 after the injection of Freund's complete adjuvant. The pain-related responses (vocalizations) were measured on each day at 1 hr after the α LA (300 mg/kg), β LG (300 mg/kg), diclofenac (Diclo, 50 mg/kg) or saline (vehicle) administration.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, **Significant differences from the vehicle-administered ($p < 0.05$, 0.01).

(a)



(b)

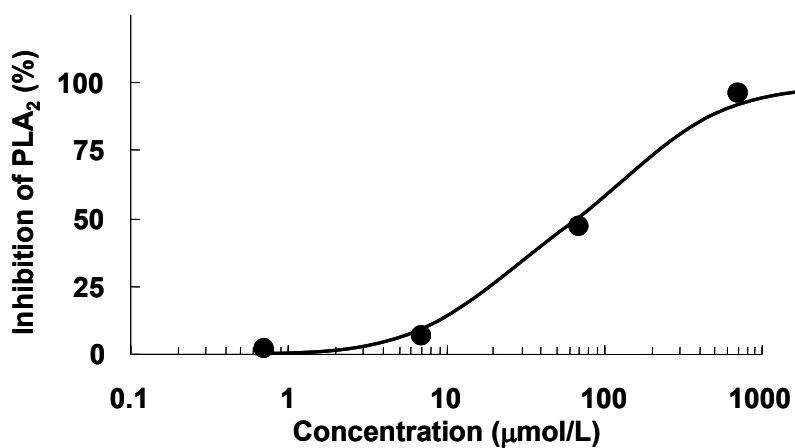


Fig. 6. Inhibition of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2 activities by α LA. The cyclooxygenase (COX-2, a) and phospholipase A2 (PLA₂, b) activities were measured as described in the text. The effect of α LA on COX-2 and PLA₂ activities were expressed by inhibition rate to control as shown in y-axis. The IC₅₀ value was calculated to be 39 $\mu\text{mol/L}$ for COX-2 and 76 $\mu\text{mol/L}$ for PLA₂.

第2章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの小腸虚血再灌流障害に対する抑制効果

緒言

消化管は、食物の消化と吸収のみならず、生体防御を担う巨大な免疫器官、複雑な情報の授受を行う神経系器官、様々な生体調節因子を分泌する内分泌器官としても機能している。さらには、独特の代謝機能により恒常性維持に寄与し、生息する多様な微生物の力をも活用しているなど重要な役割も果たしている。腸管には体内の全免疫細胞の約70%が存在しており、体内最大の免疫組織を構築している (Mowat AM *et al.*, 1997)。この腸管免疫において重要な役割を担っているのがパイエル板であり、パイエル板にはM細胞と呼ばれる抗原を体内に取り込む細胞が存在している。さらにその下部には抗原提示細胞や免疫担当細胞が集合している。ショックに起因した多臓器不全などの病態発生においては、腸管での循環障害による炎症性サイトカインの産生や、粘膜バリア機能の低下による腸内細菌のトランスロケーションが重要な役割を果たしていることが多くの基礎研究、臨床研究により明らかにされている (Swank GM *et al.*, 1996; Tamion F *et al.*, 1997)。

外科手術や敗血症などの外科侵襲期には腸管のバリア機能が破綻し、腸管内の細菌やエンドトキシンが血液中へと移行し、高サイトカイン血症となることが知られている (Markel *et al.*, 2006)。そのために異化反応が亢進し、体タンパク質の喪失が大きくなる。更に、上昇した血中のサイトカインは直接的に消化管粘膜細胞を喪失させ、吸収機能が失われるために栄養状態は一段と悪化する。したがって、抗炎症作用を示すとともに消化管からの栄養吸収状態を改善するような素材の開発は有用と考えられる。

第1章にて、ホエイタンパク質の画分である α -ラクトアルブミンが種々の炎症モデルに対し有効であることを示した。また、ホエイタンパク質は抗炎症作用を有するだけでなく、分岐鎖アミノ酸を豊富に含んでおり体内利用率が高いことから術後侵襲期のタンパク質栄養状態の改善にも効果的であることが報告されている (Rivadeneira, DE *et al.*, 1998; Grimble, RF, 2001; Heyland, DK *et al.*, 1993)。そこで本章では、腸管の循環障害のモデ

ルである上腸間膜動脈虚血再灌流法を用い、ホエイタンパク質の消化管炎症に対する抑制効果を薬理的に解析した。

材料および方法

実験動物の飼育

本実験で使用した実験動物は恒温恒湿室（温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 15\%$ ）において7時～19時，19～7時の12時間毎の明暗サイクル環境下で飼育し，この間，水と飼料は自由に摂取させた。本研究のすべての実験プロトコールは，明治乳業株式会社（現・株式会社 明治）動物実験倫理委員会の承認を受け，委員会の定める動物実験における倫理規程に則って行った。

腸管虚血再灌流モデルの作製と採血

ラット（Wistar，雄，200～250 g，日本クレア）を，ウレタン 1 g/kg 体重の腹腔内投与による麻酔下で，頸静脈にカテーテルを装着した。頸静脈カテーテルは，ヘパリン加生理食塩水を満たした状態で留置した。上腸間膜動脈をクランプすることによって45分虚血し，クランプを外して3時間再灌流する事で虚血再灌流を行った。対照群として虚血再灌流を行わず頸静脈にカテーテルのみ留置する疑似手術群(Sham 群)を設けた。再灌流開始から0, 1, 2, 3 時間目に頸静脈カテーテルから約 $300 \mu\text{L}$ を採血し，遠心分離 ($20,000 \times g$, 20 分) により血漿を得た。血漿は，サイトカイン濃度を測定するまで -80°C に保存した。

牛乳由来タンパク質のインターロイキン-6 (IL-6) 産生に対する効果

ラット（Wistar，雄，200～250 g，日本クレア）を，ウレタン 1 g/kg 体重の腹腔内投与による麻酔下で，頸静脈にカテーテルを装着した。頸静脈カテーテルは，ヘパリン加生理食塩水を満たした状態で留置した。ホエイタンパク質分離物，カゼインナトリウム，ウシ

血清アルブミン， β -ラクトグロブリン， α -ラクトアルブミンはそれぞれ生理食塩水に溶解し，300 mg/kg 体重の用量で虚血の1時間前に十二指腸内へ投与した。上腸間膜動脈をクランプすることによって45分虚血し，クランプを外して3時間再灌流する事で虚血再灌流を行った。再灌流開始から0, 1, 2, 3時間目に頸静脈カテーテルから約300 μ Lを採血し，遠心分離（20,000 $\times g$ ，20分）により血漿を得た。血漿は，サイトカインを測定するまで-80°Cに保存した。

一酸化窒素合成酵素阻害剤のIL-6産生に対する効果

ラット（Wistar，雄，200~250 g，日本クレア）を，ウレタン1 g/kg 体重の腹腔内投与による麻酔下で，頸静脈にカテーテルを装着した。頸静脈カテーテルは，ヘパリン加生理食塩水を満たした状態で留置した。 α -ラクトアルブミン（300 mg/kg 体重）および／またはNG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル（L-NAME, 1 mg/kg 体重）を虚血の1時間前に十二指腸内へ投与した。上腸間膜動脈をクランプすることによって45分虚血し，クランプを外して3時間再灌流する事で虚血再灌流を行った。再灌流開始から0, 1, 2, 3時間目に頸静脈カテーテルから約300 μ Lを採血し，遠心分離（20,000 $\times g$ ，20分）により血漿を得た。血漿は，サイトカインを測定するまで-80°Cに保存した。

α -ラクトアルブミンの効果持続時間に関する検討

ラット（Wistar，雄，200~250 g，日本クレア）を，ウレタン1 g/kg 体重の腹腔内投与による麻酔下で，頸静脈にカテーテルを装着した。頸静脈カテーテルは，ヘパリン加生理食塩水を満たした状態で留置した。 α -ラクトアルブミン（300 mg/kg 体重）を虚血の4~1時間前に十二指腸内へ投与した。上腸間膜動脈をクランプすることによって45分虚血し，クランプを外して3時間再灌流する事で虚血再灌流を行った。再灌流開始から3時間目に頸静脈カテーテルから約300 μ Lを採血し，遠心分離（20,000 $\times g$ ，20分）により血漿を得た。血漿は，サイトカインを測定するまで-80°Cに保存した。

α-ラクトアルブミンの血中濃度推移に関する検討

ラット (Wistar, 雄, 200~250 g, 日本クレア) を, ウレタン 1 g/kg 体重の腹腔内投与による麻酔下で, 頸静脈にカテーテルを装着した。頸静脈カテーテルは, ヘパリン加生理食塩水を満たした状態で留置した。α-ラクトアルブミンを 300 mg/kg 体重の用量で十二指腸内へ投与した。投与 0, 30, 60, 90, 120, 180 分後に頸静脈カテーテルから約 300 μL を採血し, 遠心分離 (20,000×g, 20 分) により血漿を得た。血漿は, α-ラクトアルブミンを測定するまで-80°Cに保存した。

サイトカイン測定

血漿中に含まれる IL-6 は, ラットサイトカイン ELISA システム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) で測定した。

α-ラクトアルブミン測定

血漿中に含まれる α-ラクトアルブミンは, Bovine alpha-Lactalbumin ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Inc.) を用いて測定した。

統計学的検討

すべての結果は平均値±標準誤差で示した。統計学的検討は二群比較では Mann-Whitney's U-test を用い, 多重比較では Dunnett's multiple comparison test を用いた。 $p<0.05$ を有意と判定した。

結 果

虚血再灌流モデルの作成と炎症反応指標

再灌流前では疑似手術群(Sham 群)および虚血再灌流群の血漿 IL-6 濃度には群間で有意な差は認められなかった。虚血再灌流により炎症反応の指標である血漿 IL-6 濃度は再灌流

後 3 時間目まで経時的に増加した。再灌流後は疑似手術群 (Sham 群) に比較して血漿 IL-6 濃度が有意に高かった (Fig. 7)。

牛乳由来タンパク質の IL-6 産生に対する効果

再灌流前では対照群および各種乳タンパク質投与群の血漿 IL-6 濃度には群間で有意な差は認められなかった。虚血再灌流 3 時間後のホエイタンパク質分離物投与群では対照群に比較して血漿 IL-6 濃度は有意に低値であった ($p<0.05$, Fig. 8)。しかし、カゼインおよびウシ血清アルブミン投与群では対照群とほぼ同じ値を示し、有意な差は認められなかった。ホエイタンパク質の主要な成分について検討したところ、 β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンともに虚血再灌流 3 時間後の血漿 IL-6 濃度は有意に低値であった (Fig. 9)。このとき比活性は α -ラクトアルブミンの方が強かった。

α -ラクトアルブミンの用量反応性

α -ラクトアルブミンは用量依存的に、虚血再灌流 3 時間後の血漿 IL-6 濃度を低下させた (Fig. 10)。最少有効用量は 100 mg/kg 体重であった。

一酸化窒素合成酵素阻害剤の IL-6 産生に対する効果

一酸化窒素合成酵素阻害剤である L-NAME 単独投与では、虚血再灌流 3 時間後の血漿 IL-6 濃度に影響を及ぼさなかった (Fig. 11)。また、 α -ラクトアルブミンの血漿 IL-6 産生抑制効果は、L-NAME の投与により、有意に減弱した。

α -ラクトアルブミンの効果持続時間

α -ラクトアルブミン投与と虚血再灌流の時間が開くほど、血漿 IL-6 産生抑制効果は弱くなった (Fig. 12)。しかしながら、 α -ラクトアルブミン投与 2 時間目までに虚血再灌流したときには、有意な血漿 IL-6 産生抑制効果を認めた。

α -ラクトアルブミンの血中濃度推移

十二指腸内に α -ラクトアルブミンを投与した後、血漿中 α -ラクトアルブミン濃度は投与 1 時間後にピークを示した(Fig. 13)。その後、2, 3 時間後には速やかに α -ラクトアルブミンは消失した。

考 察

本研究から、ホエイタンパク質は、腸管虚血/再灌流後のインターロイキン 6 放出を抑制することが明らかになった。ホエイタンパク質の主成分である α -ラクトアルブミンは、IL-6 産生に対して最も強力かつ用量依存的な抑制効果を示した。また、作用機序に関して、 α -ラクトアルブミンは、NO を介して、少なくとも部分的に、IL-6 放出の顕著な抑制活性を有することが明らかになった。また、小腸虚血再灌流モデルにおける検討では、第 1 章での結果とは異なり、 β -ラクトグロブリンも炎症性サイトカインである IL-6 の産生抑制効果を示した。これは、虚血により引き起こされる障害が酸化ストレスを含んでいることと、 β -ラクトグロブリンのアミノ酸配列に、グルタチオンの生合成に使われる前駆配列が含まれていることが関係していると考えられる。

NO は、単球および上皮細胞を含む種々の細胞において NF- κ B による転写の活性化を阻害する (Kupatt C. *et al.*, 1997; Matthews JR *et al.*, 1996)。NF- κ B は、いくつかの炎症性メディエーター、例えば、TNF- α 、IL-8、IL-1 β 、IL-2、および IL-6 の活性化に必須な DNA 結合性転写因子である。NF- κ B 複合体は P50 (NF- κ B1) および p65 (RelA) と呼ばれる 2 分子のヘテロダイマーで構成される。多くの細胞において、NF- κ B が活性化するとき、I κ B (NF- κ B の阻害因子) は、リン酸化され、タンパク質分解を受ける。NO は NF- κ B/I κ B 複合体の解離を阻害し、IL-6 などの炎症性サイトカインのそれぞれの DNA のプロモーター領域に NF- κ B が結合することを阻害する (Stefano GB *et al.*, 2000a)。この一酸化窒素を介したシグナル伝達系に関与する内因性リガンドとしては、エンドルフィン、カンナビノイド、IL-10、エストロゲンが知られている (Stefano GB *et al.*,

2000b)。本研究では、 α -ラクトアルブミンによる IL-6 産生の抑制は NOS 阻害剤によって減弱した。これらの知見は、 α -ラクトアルブミンは NO を介して NF- κ B/I κ B 複合体の解離を阻害し、NF- κ B 転写活性化を阻害することを示唆している。腸管虚血・再灌流後の組織障害には白血球・血小板凝集塊の形成と接着白血球による血管内皮細胞障害が関与している (Iba T *et al.*, 2006)。このとき COX-2 阻害剤のひとつであるアスピリンは前者を抑制するが、後者は抑制できず、臓器障害の緩和効果は十分ではないことが報告されている。本研究において、 α -ラクトアルブミンは、IL-6 産生に対して最も強力かつ用量依存的な抑制効果を示していることから、血小板に対してはアスピリンと同様に凝集抑制を示し、それとともに白血球や血管内皮に作用して接着分子の発現を抑制して内皮細胞障害を緩和し、eNOS をアップレギュレートすることにより血流を維持している可能性が考えられた。また、第 1 章で示したように、 α -ラクトアルブミンは COX-2 に選択的な阻害効果を示すことから、内皮における COX-1 阻害による PGI₂ の産生抑制が少なく、内皮保護の観点でも有利な側面を持っていると考えられた。

本研究では α -ラクトアルブミンが、ラットにおいて小腸から吸収され、血液循環に移行したことを示している。竹内らは最近、十二指腸内に投与した異種タンパク質であるウシラクトフェリンが、成体ラットにおける門脈循環を介し、リンパ経路を経由して血液循環に輸送されることを示している (Takeuchi T *et al.*, 2004)。また、 α -ラクトアルブミンはリゾチームとアミノ酸配列において相同性が高く (Warme PK *et al.*, 1974)、そのリゾチームは、ヒトにおいて血液循環への移行が報告されている (Hashida S *et al.*, 2002)。したがって、 α -ラクトアルブミンも、これらのタンパク質のように血液循環中に移行することができると考えられる。

本研究の実験モデルにおいて、虚血再灌流後の IL-6 産生に対する抑制効果と、血漿中 α -ラクトアルブミン濃度との間に正の相関が観察された。この結果は、 α -ラクトアルブミンの生理学的効果は、腸管内腔から吸収と、特定の組織または細胞への血液循環による移行に依存していることを示唆している。

マクロファージによる LPS 誘導性の IL-6 産生の抑制におけるホエイタンパク質の有効

性を評価するために、 α -ラクトアルブミンをマウス単球細胞株である RAW264 の培養液に添加したとき、RAW264 細胞による IL-6 産生は抑制された（データは図示せず）。このことから、経口投与された α -ラクトアルブミンは、腸のリンパ節またはパイエル板に存在する免疫応答性細胞と直接相互作用して抗炎症作用を発揮している可能性がある。これらの点については、さらなる研究が必要とされるであろう。

本研究では、小腸虚血再灌流障害に対する抑制効果を検討する中で、一酸化窒素を介した抗炎症作用メカニズムを見出した。また、 α -ラクトアルブミンの血清中濃度と抗炎症作用の間に正の相関があることをはじめて明らかにし、血液中に吸収された α -ラクトアルブミンおよびそのペプチドが抗炎症作用の活性本体であることを示唆する結果を得た。本研究で示した、炎症性サイトカイン産生に対する抑制効果は、抗炎症薬を必要とする重篤な腸の虚血性ショックの患者のために安全に使用される生物資源となり得ることを示唆しており、壊死性腸炎を含めた虚血性腸炎をもつ患者に大きな利点となるものである。

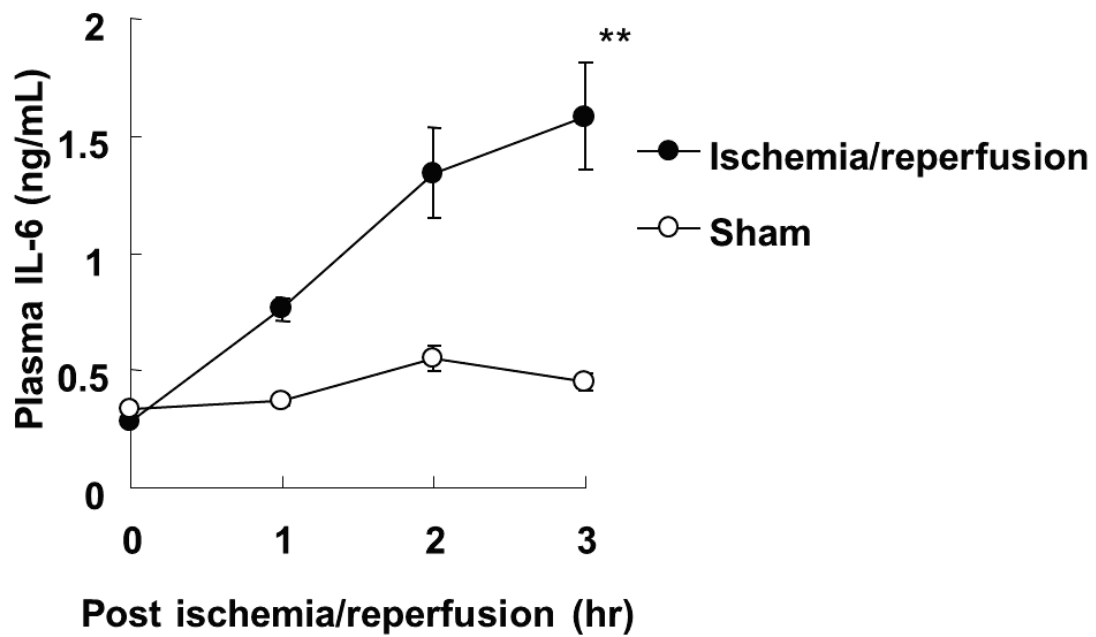


Fig. 7. Induction of IL-6 release by the superior mesenteric artery ischemia/reperfusion.

The superior mesenteric artery (SMA) was occluded for 45 min followed by reperfusion for 180 min (ischemia/reperfusion). The SMA ischemia/reperfusion induced IL-6 release. Plasma IL-6 concentration was measured by ELISA.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). ** Significant differences from the sham-operated group ($p < 0.01$).

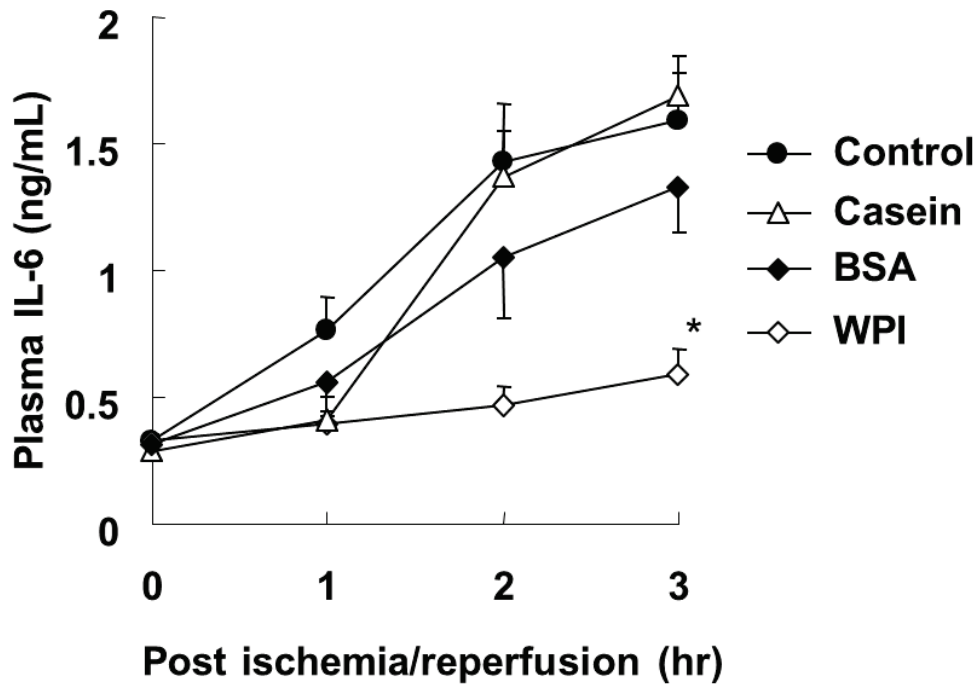


Fig. 8. Effects of whey protein (WPI) on ischemia/reperfusion-induced IL-6 release.

Each milk proteins (300 mg/kg) were injected into the duodenum at 1 hr before the induction of ischemia. WPI suppressed IL-6 release induced by ischemia/reperfusion.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). * Significant differences from the control group ($p < 0.05$).

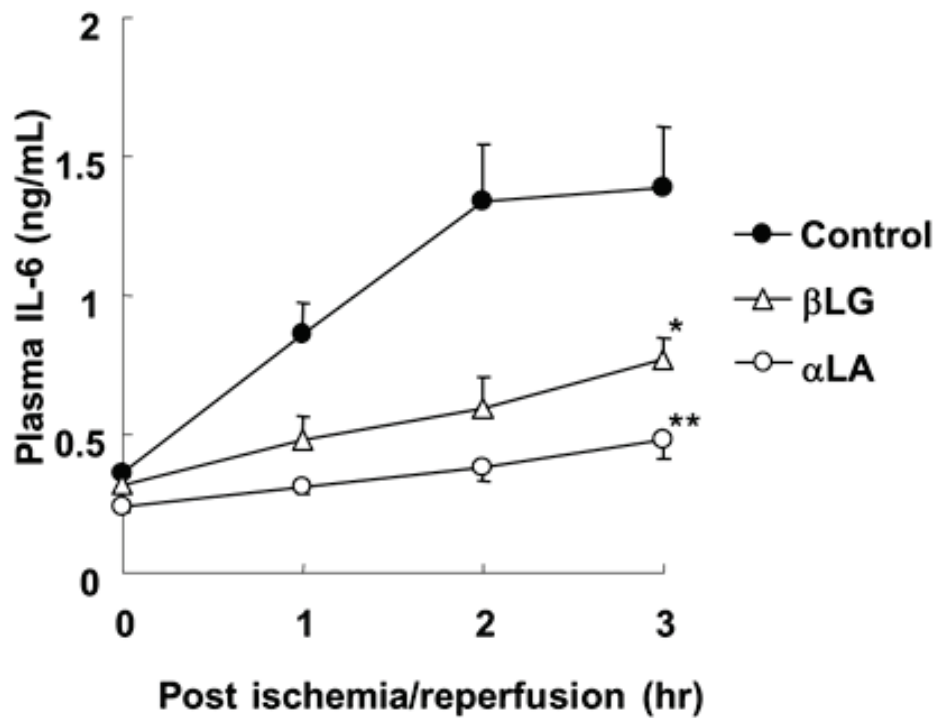


Fig. 9. Effects of α LA and β LG on ischemia/reperfusion-induced IL-6 release.

Each milk proteins (300 mg/kg) were injected into the duodenum at 1 hr before the induction of ischemia. Among the three major components contained in WPI, α LA showed the most potent suppressive effect on IL-6 release.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant differences from the control group ($p < 0.05, 0.01$).

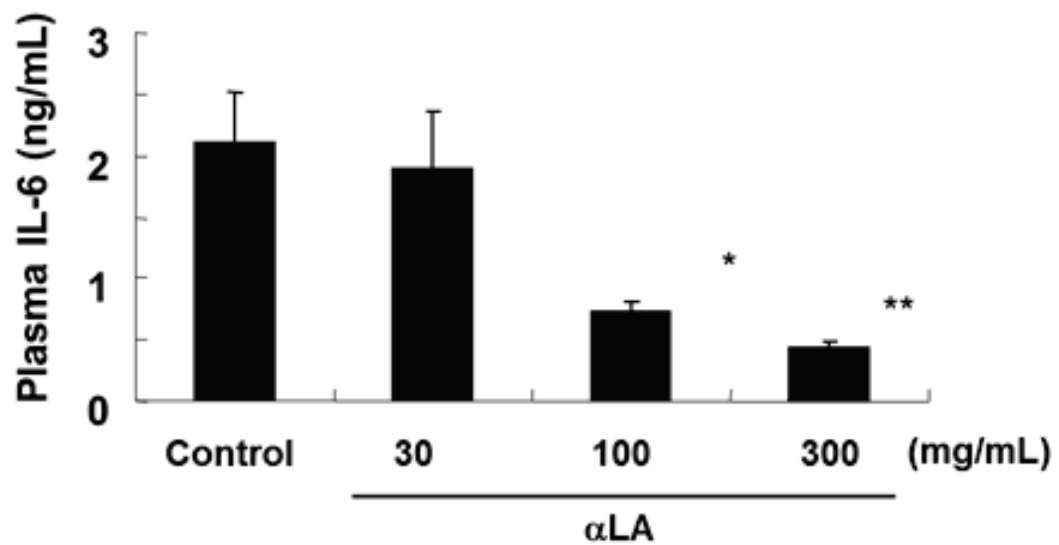


Fig. 10. Dose response effect of α LA on the suppression of IL-6 release.

α LA was injected into the duodenum at 1 hr before the induction of ischemia. α LA showed the dose-dependent suppressive effect on IL-6 release.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant differences from the control group ($p < 0.05$, 0.01).

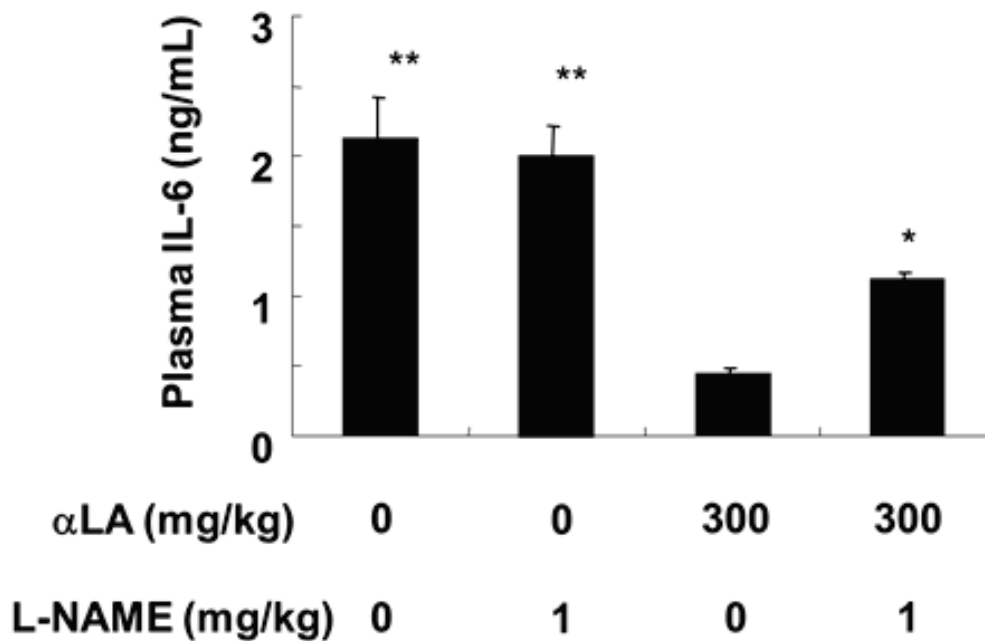


Fig. 11. The effect of NOS inhibitor on the suppression of IL-6 release by α LA.

α LA and/or N^G-nitro-L-arginine methyl ester, nitric oxide (NO) synthase inhibitor, was injected into the duodenum 1 hr before the induction of ischemia. N^G-nitro-L-arginine methyl ester significantly attenuated the suppressive effect on IL-6 release by α LA.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant differences from the α LA-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

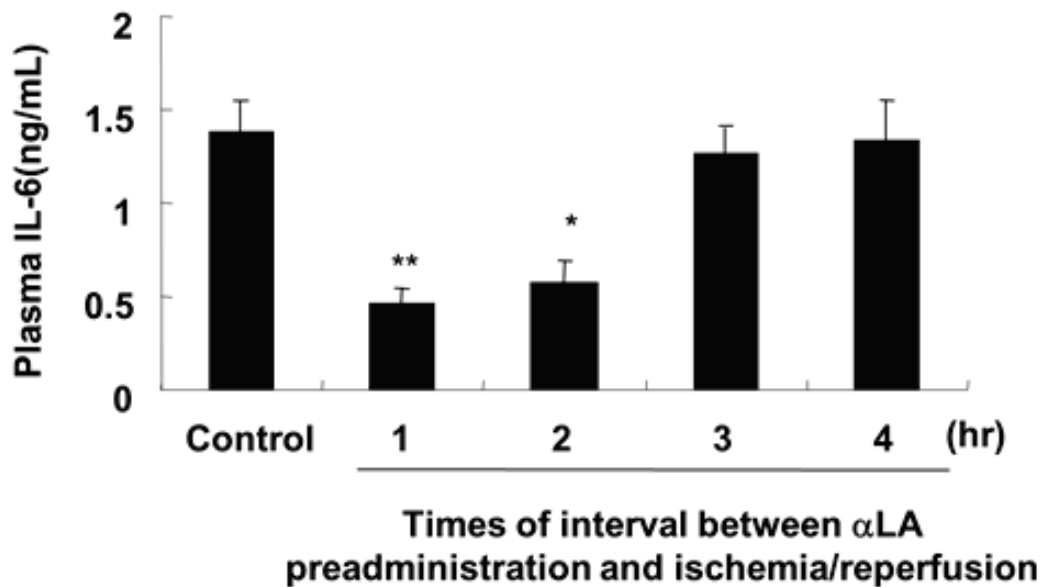


Fig. 12. Relationship between the timing of α LA preadministration and their protective effect against IL-6 release.

α LA was injected into the duodenum at 1, 2, 3, or 4 hr(s) before the induction of ischemia. The prophylactic protective effect of α LA was observed in rats preadministered α LA at 1 or 2 hrs before the induction of ischemia/reperfusion, but not at 3 or 4 hrs.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=6). *, ** Significant differences from the control group ($p < 0.05, 0.01$).

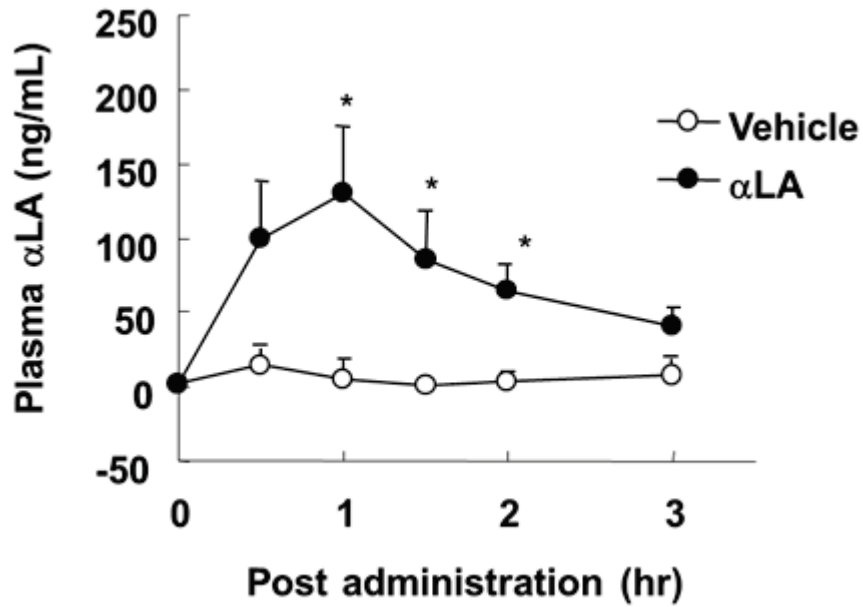


Fig. 13. Changes in the plasma αLA concentration after the oral administration. αLA (300 mg/kg body weight) was injected into the duodenum. Plasma αLA concentration was measured by ELISA. Values represent the mean ± S.E.M. (n=6). * Significant differences from the vehicle-administered group ($p < 0.05$).

第3章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの大腸発がんに対する抑制効果

緒 論

牛乳中のタンパク質画分は必須アミノ酸を豊富に含むことから栄養学的に高く評価されているだけでなく、多くの生理活性を有することが知られており、それらを抽出・加工したものが広く利用されてきている (Marshall K, 2004)。これまでに、牛乳中タンパク質に関する新規生理機能について鋭意研究した結果、ホエイタンパク質の主要な成分である α -ラクトアルブミンが、炎症性サイトカインおよびプロスタグランジン (PG) の産生を抑制することがわかり、そのメカニズムとしてアラキドン酸を基質とした PG 生合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 を阻害することを明らかにした。

本研究では、 α -ラクトアルブミンがもつ抗炎症作用を機能性食品などに応用することを視野に入れ、近年罹患数が激増しており、高齢になるほど罹患率が高くなる大腸がんに注目した。

大腸がんは、欧米におけるがん関連死の主要な原因の1つである (Ferlay J *et al.*, 2013)。日本においても大腸がんの発生率は、食生活の多様化やライフスタイルの変化により増加している。このような現況において、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) を用いて結腸直腸がんを抑制する化学的予防に関する臨床および疫学的研究が進められている (Gupta RA *et al.*, 1998)。NSAID は、アラキドン酸をプロスタグランジン類へ変換するシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害する薬剤である。COX 酵素群は、様々な組織で恒常的に発現している古典的な COX-1 と、誘導型の COX-2 から構成されている。COX-2 は、分裂促進因子およびサイトカインなどの様々な刺激によって誘導され、炎症反応に関与している。NSAID は COX-1 と COX-2 の両方を阻害するので、これらの薬剤には腸管粘膜障害や出血などの副作用がある (Bjarnason I *et al.*, 1993)。COX-2 により産生されるプロスタグランジン E2 (PGE2) は、その受容体に結合し、細胞増殖を制御するシグナル伝達経路を活性化することによって腫瘍増殖を促進する (Hanif R *et al.*, 1996)。そのため、COX-2

阻害は大腸がんの化学予防のための有望なアプローチである。

牛乳および乳製品の消費が結腸がんのリスクを減少させることが報告されている (Shannon J *et al.*, 1996; Kampman E *et al.*, 2000; Murata M *et al.*, 1999)。牛乳および乳製品の結腸がんリスクの減少に寄与する活性成分は、まだ明らかにされていないが、例えば、カルシウムやビタミン D などがあり、このほかにも乳製品に含まれる様々な成分が関与している可能性がある。これらの乳製品の抗腫瘍活性は、総乳タンパク質の 20%をしめるホエイ画分のタンパク質に起因している可能性が考えられる。実際、ホエイタンパク質は、大腸における発がん物質で誘発される実験的腫瘍発生を抑制する (Hakkak R *et al.*, 2001; Bounous G *et al.*, 1991; Attaallah W *et al.*, 2012)。しかしながら、ホエイタンパク質による結腸がん発生の予防機序はまだ明らかにされていない。

このような背景から、本章では、マウスに O⁶-メチルグアニン産生誘導のあるアゾキメタン (AOM) を投与後に、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を頻回反復飲用させると、大腸炎の発症後に、大腸に β カテニンの核内集積を認める腫瘍が多発する、大腸二段階発がんモデル (AOM/DSS 併用モデル) を用い、COX-2 の阻害活性をもつ α -ラクトアルブミンが大腸がんの発生を抑制する可能性について検討した。

材料および方法

実験 1 α -ラクトアルブミンの大腸発がん抑制効果に関する検討

本実験には、C57BL/6J 系雄性マウス (3 週齢, 日本チャールス・リバー株式会社) を使用した。マウスは恒温恒湿室 (温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$) において 7 時~19 時, 19~7 時の 12 時間毎の明暗サイクル環境下で飼育し、この間、水と飼料は自由に摂取させた。本研究のすべての実験プロトコールは、株式会社 明治 動物実験倫理委員会の承認を受け、委員会の定める動物実験における倫理規程に則って行った。

馴化期間中は、AIN-93M 粉末を給餌した。馴化期間終了後、体重を測定し、平均体重が

なるべく等しくなるように 10 匹ずつ 4 群に群分けした (1 群: Normal 群, 2 群: コントロール群(+AOM+DSS), 3 群: α -ラクトアルブミン給餌群(+AOM+DSS), 4 群: アスピリン給餌群(+AOM+DSS))。群分け後から, 3 群には基本飼料である AIN-93M に含まれるミルクカゼインの半量 (AIN-93M 中の 7%) を α -ラクトアルブミンに置き換えた飼料を給餌し, 4 群には基本飼料である AIN-93M にアスピリンを 0.1% となるように混合した飼料を給餌した。

群分け当日, Normal 群のマウス 10 匹には PBS (10 mL/kg 体重) を腹腔内投与した。2-4 群のマウス 30 匹には AOM (1 mg/mL, 10 mL/kg 体重) を腹腔内投与した。AOM 投与 7 日後から 2%DSS を 1 週間自由摂取させた。DSS 摂取 3 日目に便潜血検査を行った。DSS 投与終了後, 飲水を通常の UV 殺菌水に戻し, 7 週間飼育した。飼育終了後, 大腸を摘出して湿重量, がんの個数を調べた。摘出した大腸粘膜から 0.1% IGEPAL CA-630 を含む PBS を用いてホモジネートを調製し, 炎症・発がん関連物質 (PGE₂, TNF- α , IL-1 β) の発現量測定に用いた (Fig. 14)。

実験 2 DSS 炎症期に対する α -ラクトアルブミンの効果に関する検討

本実験には, C57BL/6J 系雄性マウス (3 週齢, 日本チャールス・リバー株式会社) を使用した。マウスは恒温恒湿室 (温度 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度 55 \pm 15%) において 7 時~19 時, 19~7 時の 12 時間毎の明暗サイクル環境下で飼育し, この間, 水と飼料は自由に摂取させた。本研究のすべての実験プロトコールは, 株式会社 明治 動物実験倫理委員会の承認を受け, 委員会の定める動物実験における倫理規程に則って行った。

馴化期間中は, AIN-93M 粉末を給餌した。馴化期間終了後, 体重を測定し, 平均体重がなるべく等しくなるように 7 群に群分けした (1 群: Normal 群(n=5), 2 群: コントロール群(+AOM+DSS, n=10), 3 群: α -ラクトアルブミン給餌群(+AOM+DSS, n=10), 4 群: アスピリン給餌群(+AOM+DSS, n=10), 5 群: DSS 単独コントロール群(-AOM+DSS, n=5), 6 群: DSS 単独 α -ラクトアルブミン給餌群(-AOM+DSS, n=5), 7 群: DSS 単独: アスピリン給餌群(-AOM+DSS, n=5))。群分け後から, 3 群と 6 群には基本飼料である AIN-93M に含ま

れるミルクカゼインの半量 (AIN-93M 中の 7%) を α -ラクトアルブミンに置き換えた飼料を給餌し、4 群と 7 群には基本飼料である AIN-93M にアスピリンを 0.1% となるように混合した飼料を給餌した。

群分け当日、1 群と 5-7 群のマウス 10 匹には PBS (10 mL/kg 体重) を腹腔内投与した。2-4 群のマウス 30 匹には AOM (1 mg/mL, 10 mL/kg 体重) を腹腔内投与した。AOM 投与 7 日後から 2%DSS を 1 週間自由摂取させた。DSS 投与終了後、心臓より採血して血漿を得た。得られた血漿は PGE₂, ロイコトリエン (LT) B₄ の濃度測定に用いるまで -80°C で保存した。また、大腸を摘出して長さとし湿重量を測定し、大腸粘膜の肥厚の指標となる大腸長 1 cm 当たりの重量 (mg/cm) を算出した。摘出した大腸粘膜から 0.1% IGEPAL CA-630 を含む PBS を用いてホモジネートを調製し、炎症・発がん関連物質 (PGE₂, LTB₄, TNF- α , IL-1 β) の発現量測定に用いた (Fig. 15)。

統計処理

Fisher's PLSD (Protected Least Significant Difference) または Mann-Whitney's U-test を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

結 果

AOM/DSS 処理マウスが呈する便潜血に対する α -ラクトアルブミンの効果 (実験 1)

DSS 摂取 3 日目の便潜血反応を Table 1 に示す。AOM/DSS 処理により著しい便潜血反応陽性 (gross bleeding) を呈するマウスは 10 匹中 7 匹であった。 α -ラクトアルブミンの給餌により著しい便潜血反応陽性を呈するマウスは 10 匹中 2 匹と有意に減少した ($p < 0.05$ vs. control, Mann-Whitney's U-test)。アスピリンの給餌では 10 匹中 6 匹が著しい便潜血反応陽性を呈した。

AOM/DSS 処理マウスの大腸湿重量と発がん数に対する α -ラクトアルブミンの効果 (実験

1)

Fig. 16 に大腸湿重量 (a) と発がん数 (b) を示す。AOM/DSS 処理により大腸湿重量と発がん数が増加した。 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌により大腸湿重量と発がん数の増加は有意に抑制された。

AOM/DSS 処理マウスの大腸組織中 PGE2 量の変化 (実験 1)

AOM/DSS 処理により大腸組織中 PGE2 は増加したが、 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌による効果は見られなかった (図示せず)。

AOM/DSS 処理マウスの大腸組織中 TNF- α 量と IL-1 β 量の変化 (実験 1)

Fig. 17 に大腸組織中 TNF- α 量 (a) と IL-1 β 量 (b) を示す。AOM/DSS 処理により TNF- α 量と IL-1 β 量が増加した。 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌により TNF- α 量と IL-1 β 量の増加は有意に抑制された。

DSS 炎症期マウスの大腸長 1 cm 当たりの重量 (実験 2)

Fig. 18 に DSS 炎症期マウスの大腸長 1 cm 当たりの重量を示す。AOM 投与の有無に関わらず、DSS の自由摂取により大腸長 1 cm 当たりの重量が増加した。 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌により大腸長 1 cm 当たりの重量の増加は有意に抑制された。

DSS 炎症期マウスの血漿中 LTB4 濃度と PGE2 濃度の変化 (実験 2)

Fig. 19 に血漿中 LTB4 濃度 (a) と PGE2 濃度 (b) を示す。血漿中 LTB4 濃度は AOM 投与の有無に関わらず増加した。血漿中 PGE2 濃度は DSS を単独で用いた時よりも、AOM と DSS を併用したときに著しく増加した。 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌により、AOM/DSS 併用群において、PGE2 濃度と LTB4 濃度の増加は有意に抑制された。

DSS 炎症期マウスの大腸組織中 LTB4 量と PGE2 量の変化 (実験 2)

Fig. 20 に大腸組織中 LTB4 量 (a) と PGE2 量 (b) を示す。大腸組織中 LTB4 量と PGE2 量は DSS を単独で用いた時よりも、AOM と DSS を併用したときに著しく増加した。 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌により、AOM/DSS 併用群において、PGE2 量と LTB4 量の増加は有意に抑制された。

DSS 炎症期マウスの大腸組織中 TNF- α 量と IL-1 β 量の変化 (実験 2)

Fig. 21 に大腸組織中 TNF- α 量 (a) と IL-1 β 量 (b) を示す。大腸組織中 TNF- α 量と IL-1 β 量は AOM 投与の有無に関わらず増加した。 α -ラクトアルブミンまたはアスピリンの給餌により、AOM/DSS 併用群、DSS 単独群のいずれにおいても、TNF- α 量と IL-1 β 量の増加は有意に抑制された。

考 察

本研究では、AOM と DSS により誘導された大腸発がんに対する、 α -ラクトアルブミンの効果の評価することを目的とした。この研究から、 α -ラクトアルブミンは、この動物モデルにおいて大腸発がんを抑制することが明らかになった。

本研究において、AOM/ DSS 処置マウスにおける血漿および結腸 PGE2 のレベルは、DSS 単独で処置したマウスにおけるレベルよりも高かった。この結果は、最近報告された研究とよく一致している (Ju J *et al.*, 2009)。また、 α -ラクトアルブミンは AOM/ DSS 処置マウスにおいて高発現された PGE2 を抑制した。また、AOM の前処理は、DSS 誘発性炎症の寛解を抑制し、さらに、大腸過形成および潰瘍形成を促進することが報告されている (Marks F *et al.*, 1981; Fantini MC *et al.*, 2008)。このことは、大腸炎に起因した大腸発がんのプロセスは、PGE2 によって促進されることを示唆している。すなわち、PGE2 は、慢性的な炎症により発症する大腸がんに関与している発がん促進物質の一つであると考えられる。

COX-2 は、様々な病理学的プロセスに関与しており、細胞増殖、血管新生、および免疫抑制を促進するプロスタグランジンの産生を調節している。著者らは、牛乳由来の α -ラクトアルブミンが、鎮痛および抗炎症作用をもつことを示している。選択的 COX-2 阻害剤であるロフェコキシブは、好中球浸潤を低減させることにより炎症を緩和して、大腸炎を改善することが報告されている (Martín AR *et al.*, 2005)。そのうえ、ロフェコキシブによる処理は、陰窩上皮において DSS により生じる COX-2 の発現は同じレベルのままであったが、COX-1 の減少を抑制したことが報告されている。実験 1 では、 α -ラクトアルブミンとアスピリンを添加した飼料の給餌は、発がん大腸ホモジネートにおける PGE2 レベルに影響を及ぼさないことを実証した (データ示さず)。これらの結果は、 α -ラクトアルブミンは、AOM の前処理によって DSS 誘発性炎症中に上昇する COX-2 活性を低下させることにより、大腸発がんを抑制することを示唆している。さらなる研究で、大腸発がんにおける異なる段階でのプロスタグランジンを産生する細胞種 (単数または複数) を明確にする必要がある。

本研究において、 α -ラクトアルブミンを給餌したマウスは、対照群と比較して、TNF- α および IL-1 β の誘導が有意に低いことを証明した。第 1 章および第 2 章において、 α -ラクトアルブミンが様々な動物モデルにおいて炎症性サイトカインの放出を阻害することを見出した。いくつかの炎症誘発性サイトカインは、NF- κ B の活性化および血管新生および接着分子の高発現を通じて腫瘍の進行を促進することが報告されている (Tsujiimoto H *et al.*, 2010)。これらの結果は、 α -ラクトアルブミンは、TNF- α および IL-1 β をダウンレギュレーションして、大腸がんの発生を抑制したことを示している。

アスピリンを含む飼料を給餌した AOM/ DSS 処置マウスの体重変化は、実験の初期段階において、対照群よりもわずかに低く推移した。また、 α -ラクトアルブミンの給餌は糞便出血を減少したが、アスピリンでは、このような効果を示さなかった。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) は、関節炎または他の炎症性疾患を有する患者のために症状の緩和をもたらす。しかし、これらの薬剤は胃酸の粘膜バリアを損ない、上部消化管に対する副作用を伴う (Bjarnason I *et al.*, 1993)。この粘膜障害は、ペプシンの作用による上部消化管症

状、消化性潰瘍を合併することがある。

COX-2 とは異なり、COX-1 は、胃酸から胃を保護するある特定のプロスタグランジンを生成する。したがって COX-1 は、潰瘍出血に対する保護効果を発揮する。アスピリンのような NSAID は COX-1 も同時に阻害することにより、消化性潰瘍や出血のリスクを高める。一方、本研究では α -ラクトアルブミンが選択的に COX-2 を阻害し、COX-1 は阻害しないことを見出しており、 α -ラクトアルブミンは胃腸副作用が少ないことが考えられる。このことは、 α -ラクトアルブミンが大腸発がんを予防するための安全で有用な生物資源であることを示すものである。

人乳由来の α -ラクトアルブミンは、ヒト結腸腺がん細胞株の増殖を阻害することが示されている (Sternhagen LG *et al.*, 2001)。 α -ラクトアルブミンはいくつかの脂肪酸結合部位を持ち、ステアリン酸、パルミチン酸およびオレイン酸を結合する (Cawthorn KM *et al.*, 1997)。ヒト α -ラクトアルブミンおよびオレイン酸の複合体 (HAMLET) は、もともと強力な抗がん剤としてヒトの乳から単離されたもので、*in vivo* および *in vivo* の両方で、様々な由来の形質転換細胞にアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しないことが報告されている (Svensson M *et al.*, 2003)。HAMLET のウシ相同物である、ウシ α -ラクトアルブミンとオレイン酸 (BAMLET) の複合体も、腫瘍細胞株においてアポトーシスを誘導することが報告されている (Svensson M *et al.*, 2000; Rammer P *et al.*, 2010)。

一方で、 α -ラクトアルブミンは、組織中のグルタチオンの濃度を増加させる (Bounous G *et al.*, 1991b)。グルタチオンは DNA の修復および多数の発がん物質および変異原性物質を解毒するための抗酸化作用を有する。これは、 α -ラクトアルブミン分子中に含まれるシステインがグルタチオンの合成のための前駆体アミノ酸として供給され、免疫増強効果に寄与することで説明されている。しかしながら、ホエイタンパク質を給餌したラットにおいて、カゼイン含有飼料で飼育したときと肝臓のグルタチオンレベルに差がなかったことも報告されている (Hakkak R *et al.*, 2001)。これらの知見は、 α -ラクトアルブミンが BAMLET および/または細胞内システイン濃度の上昇を介して、少なくとも部分的に、大

腸発がんを抑制することを示唆している。

がんが発生するプロセスには、3つの段階があると考えられている。初期段階（イニシエーション）は正常細胞のDNAが、変異原性物質によって損傷され、DNA変異を起こす段階で、本実験においてはAOMが変異原性物質である。次の促進段階（プロモーション）は、変異が生じた細胞が正常な制御を逸脱していく段階で、本実験においてはDSSによって引き起こされる炎症反応期が相当する。その後、がん細胞の周辺で血管新生が起き、がん細胞が急速に増殖する進行段階（プログレッション）へと進展する。

本研究では、 α -ラクトアルブミンの大腸発がんに対する抑制効果を検討するなかで、大腸発がんにおけるプロモーション段階でプロスタグランジン産生を抑制することが重要であることを明らかにした。また、 α -ラクトアルブミンはがん進行段階においても炎症関連物質の抑制を通して慢性炎症を改善することも明らかになった。以上の結果から、 α -ラクトアルブミンを長期にわたり摂取し続けることで、大腸粘膜での慢性炎症が抑制され、大腸がんのリスクを低減できる可能性が考えられた。

Table 1 Composition of diets used in this study

	Diets		
	Control (AIN-93M)	α-lactalbumin enriched	Aspirin contained
<i>Ingredients (%)</i>			
casein	14.0	7.0	14.0
α-lactalbumin		7.0	
corn starch	46.5692	46.5692	46.5227
α corn starch	15.50	15.50	15.48
caster sugar	10.0	10.0	10.0
soy oil	4.0	4.0	4.0
cellulose powder	5.0	5.0	5.0
mineral mix (AIN-93M)	3.5	3.5	3.5
vitamin mix (AIN-93)	1.0	1.0	1.0
L-cystine	0.18	0.18	0.18
choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
tertiary butylhydroquinone	0.0008	0.0008	0.0008
aspirin			0.1
Total	100.0	100.0	100.0

Table 2 Fecal Occult Blood Score

	Guaiac (-)	Guaiac(+)	Gross bleeding
Normal	10	0	0
Control	1	2	7
α-Lactalbumin	5	3	2
Aspirin	2	2	6

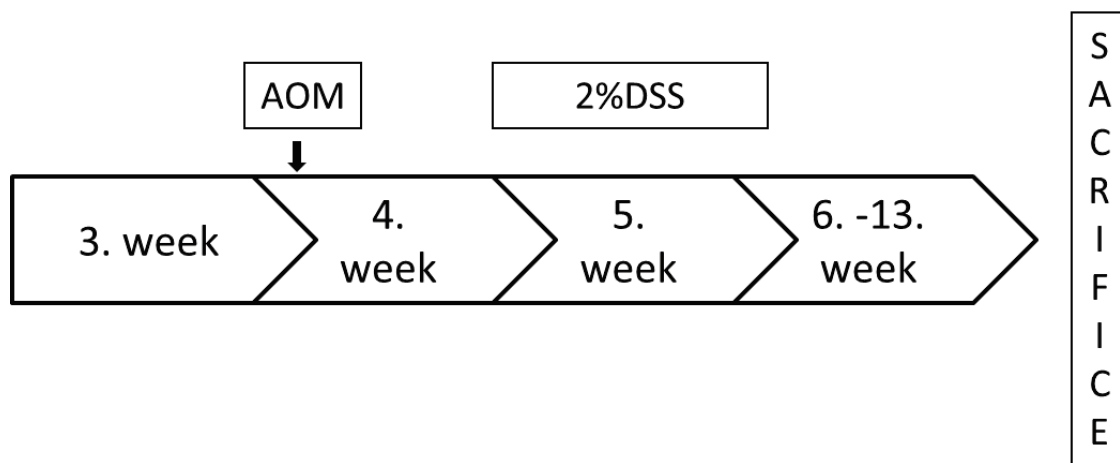


Fig. 14. Protocol for the induction of tumor by AOM and 2%DSS.

C57BL/6J (3 weeks old) was employed in this experiment. After the acclimation for one week, AOM (10 mg/kg body weight) was administered by *i.p.* at 4 weeks-old. The 2%DSS solution was given as drinking water during 5-weeks old for one week. The mice were sacrificed at 13 weeks-old.

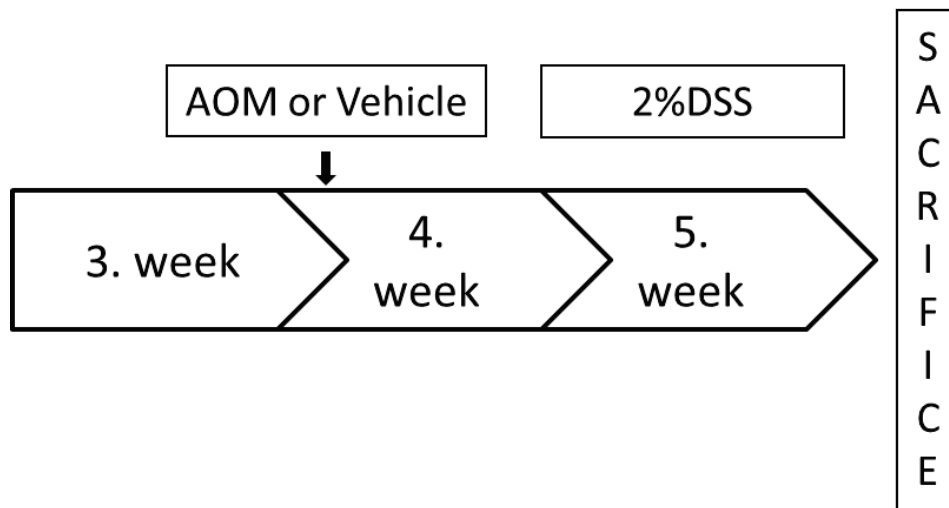
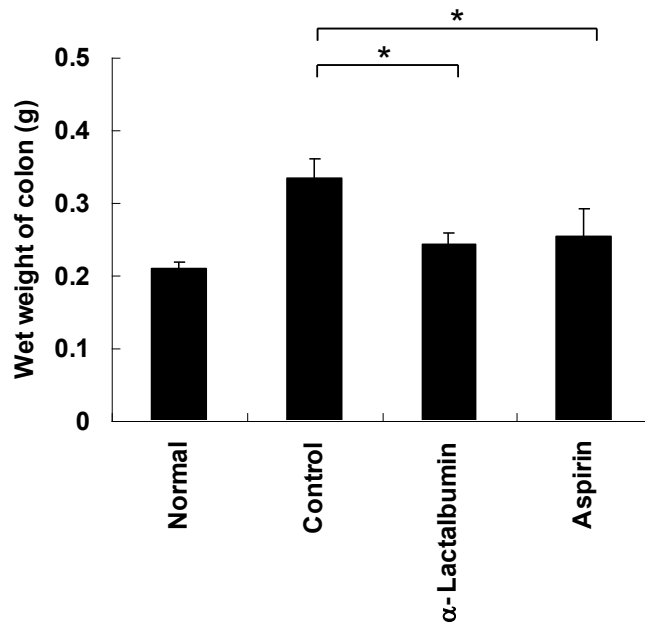


Fig. 15. Protocol for the induction of inflammation by AOM and 2%DSS.

C57BL/6J (3 weeks old) was employed in this experiment. After the acclimation for one week, AOM (10 mg/kg body weight) or the vehicle (sterile saline) was administered by *i.p.* at 4 weeks-old. The 2%DSS solution was given as drinking water during 5-weeks old for one week. The mice were sacrificed after 7 days' DSS intake.

(a)



(b)

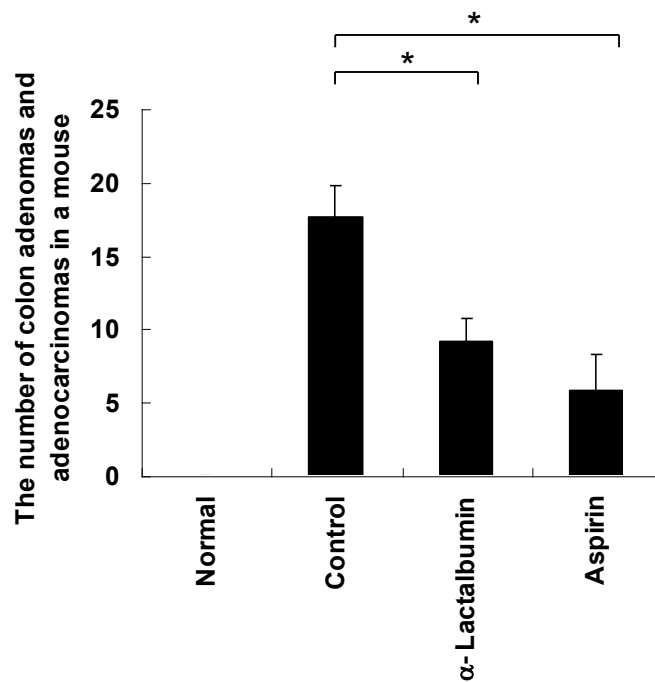
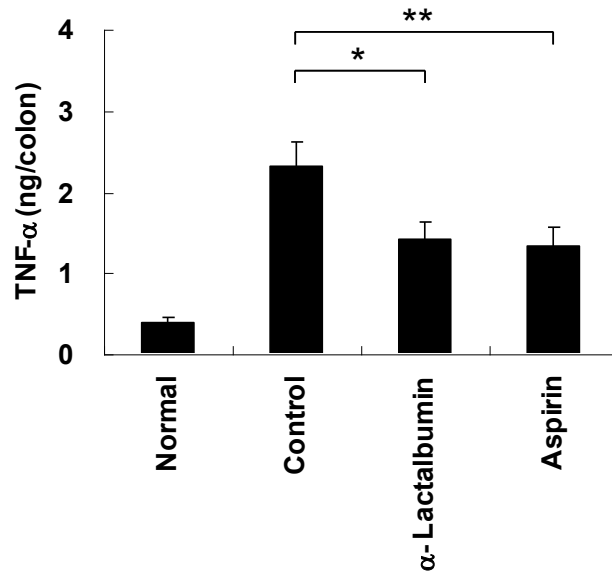


Fig. 16. The effect of α LA or aspirin on wet-weight of colon and formation of colon adenoma/adenocarcinoma in AOM/DSS-treated mice.

Wet-weight of colon (a) and the number of colon adenoma and adenocarcinoma (b) were determined at 9 weeks after the AOM/DSS-treatment.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=10). * Significant difference from the control group ($p < 0.05$).

(a)



(b)

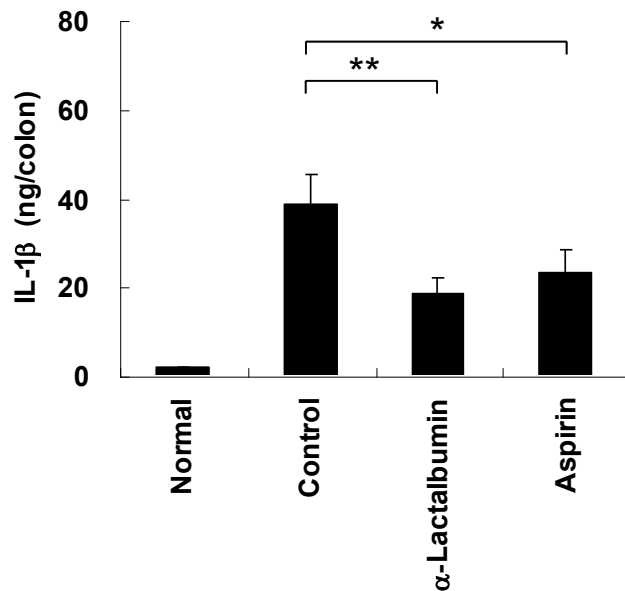


Fig. 17. The effect of α LA or aspirin on TNF- α and IL-1 β levels in the colon tissues of AOM/DSS-treated mice.

The levels of TNF- α (a) and IL-1 β (b) were determined at 9 weeks after the AOM/DSS-treatment. Colon tissues were homogenized and centrifuged to collect the supernatant, followed by measuring the cytokine levels with ELISA.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=10). *, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

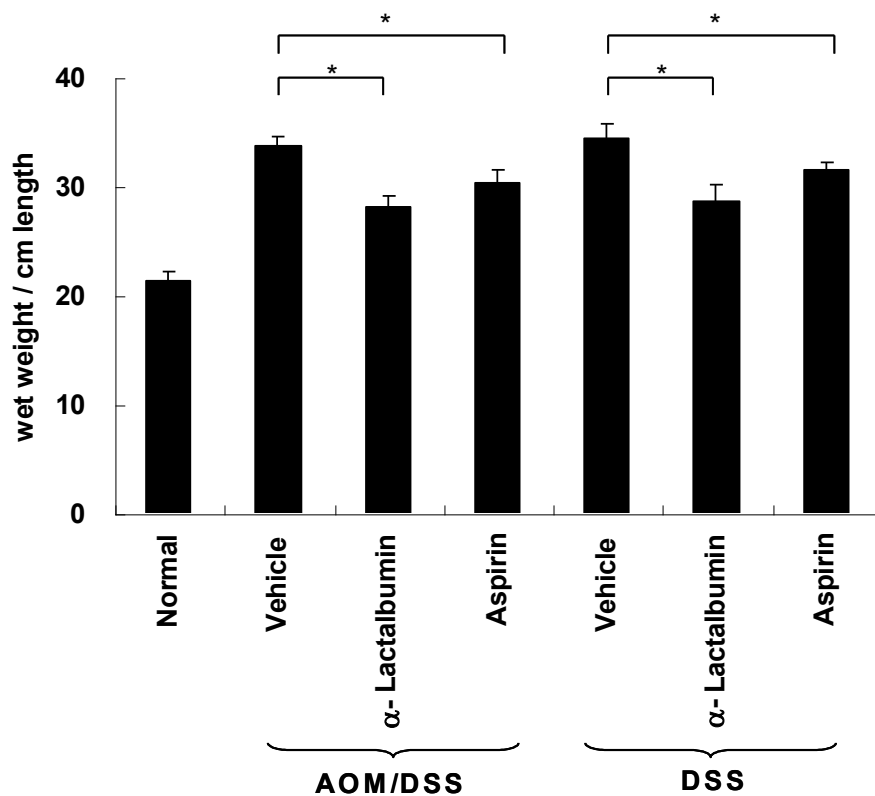


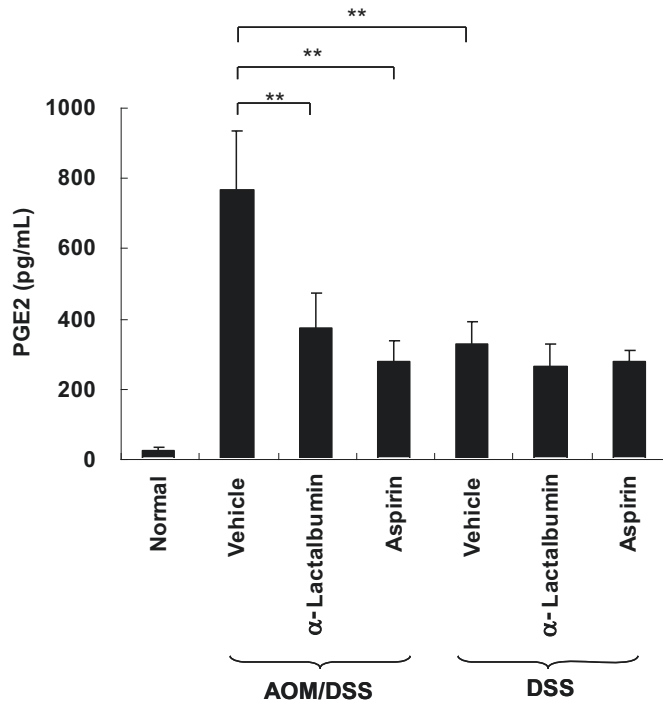
Fig. 18. The effect of α LA or aspirin on wet-weight/length ratio of the colon in AOM/DSS-treated mice.

Mice were injected with AOM (10 mg/kg body weight, *i.p.*) or vehicle. One week later, they were given DSS solution as drinking water for 1 week. Wet-weight/length ratio of the colon was determined at 7 days after the DSS-treatment.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=10; AOM/DSS treated group, n=5; DSS only treated group).

*, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

(a)



(b)

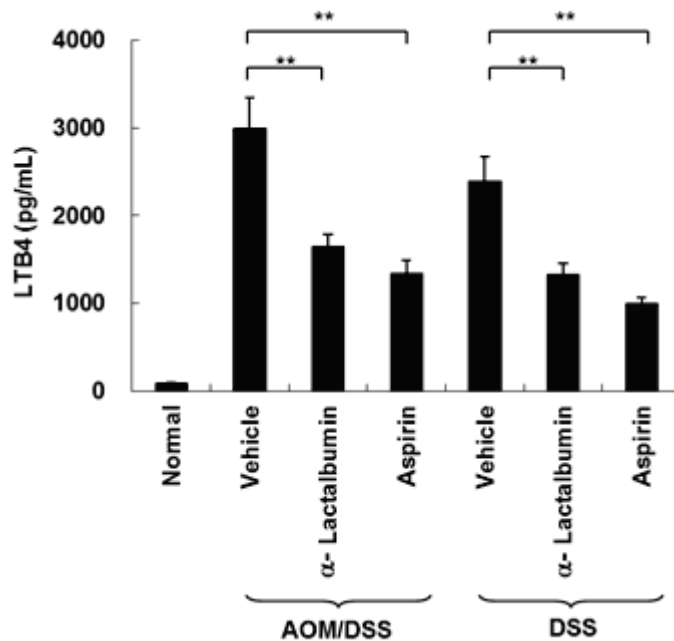


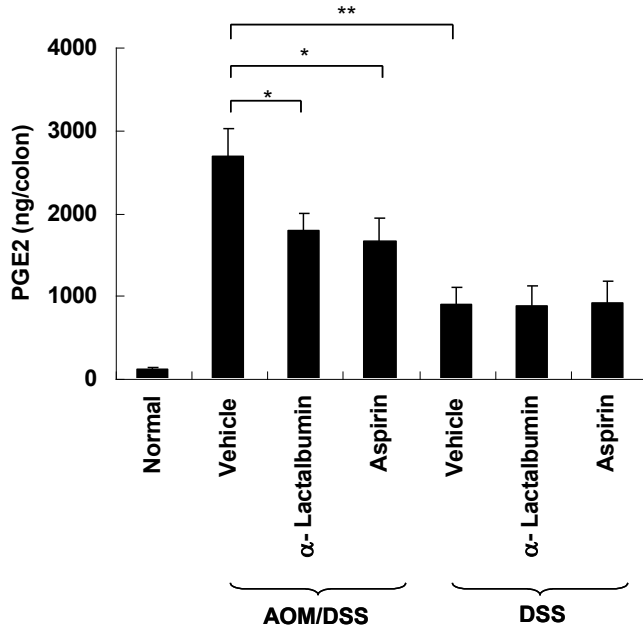
Fig. 19. The effect of α LA or aspirin on plasma PGE2 and LTB4 concentrations in AOM/DSS-treated mice.

Mice were injected with AOM (10 mg/kg body weight, *i.p.*) or vehicle. One week later, they were given DSS solution as drinking water for 1 week. Plasma PGE2 (a) and LTB4 (b) concentrations were determined at 7 days after DSS-treatment.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=10; AOM/DSS treated group, n=5; DSS only treated group).

*, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

(a)



(b)

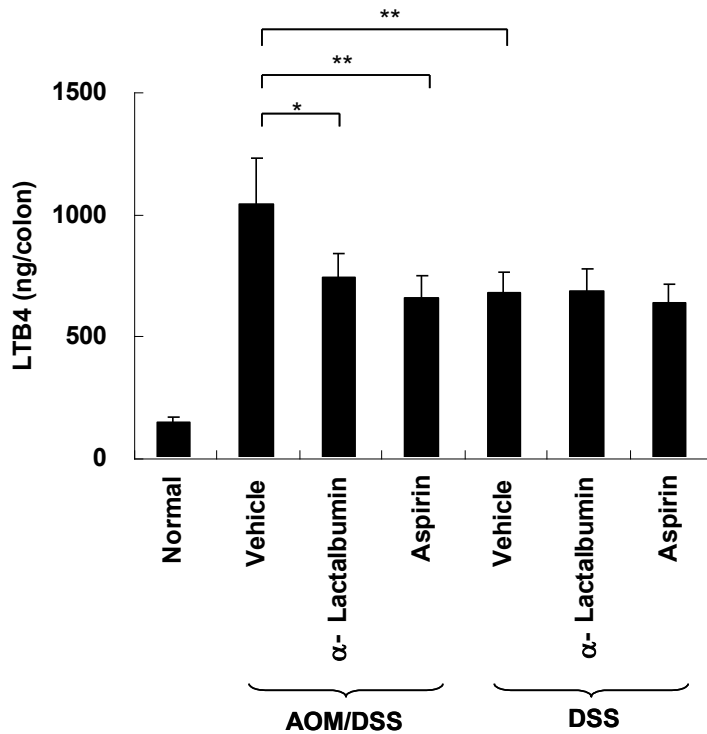


Fig. 20. The effect of α LA or aspirin on PGE2 and LTB4 levels in the colon tissues of AOM/DSS-treated mice.

Mice were injected with AOM (10 mg/kg body weight, *i.p.*) or vehicle. One week later, they were given DSS solution as drinking water for 1 week. PGE2 (a) and LTB4 (b) were determined at 1 week after the DSS-treatment. Colon tissues were homogenized and centrifuged to collect the supernatant, followed by measuring the PGE2 and LTB4 levels with ELISA.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=10; AOM/DSS treated group, n=5; DSS only treated group).

*, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

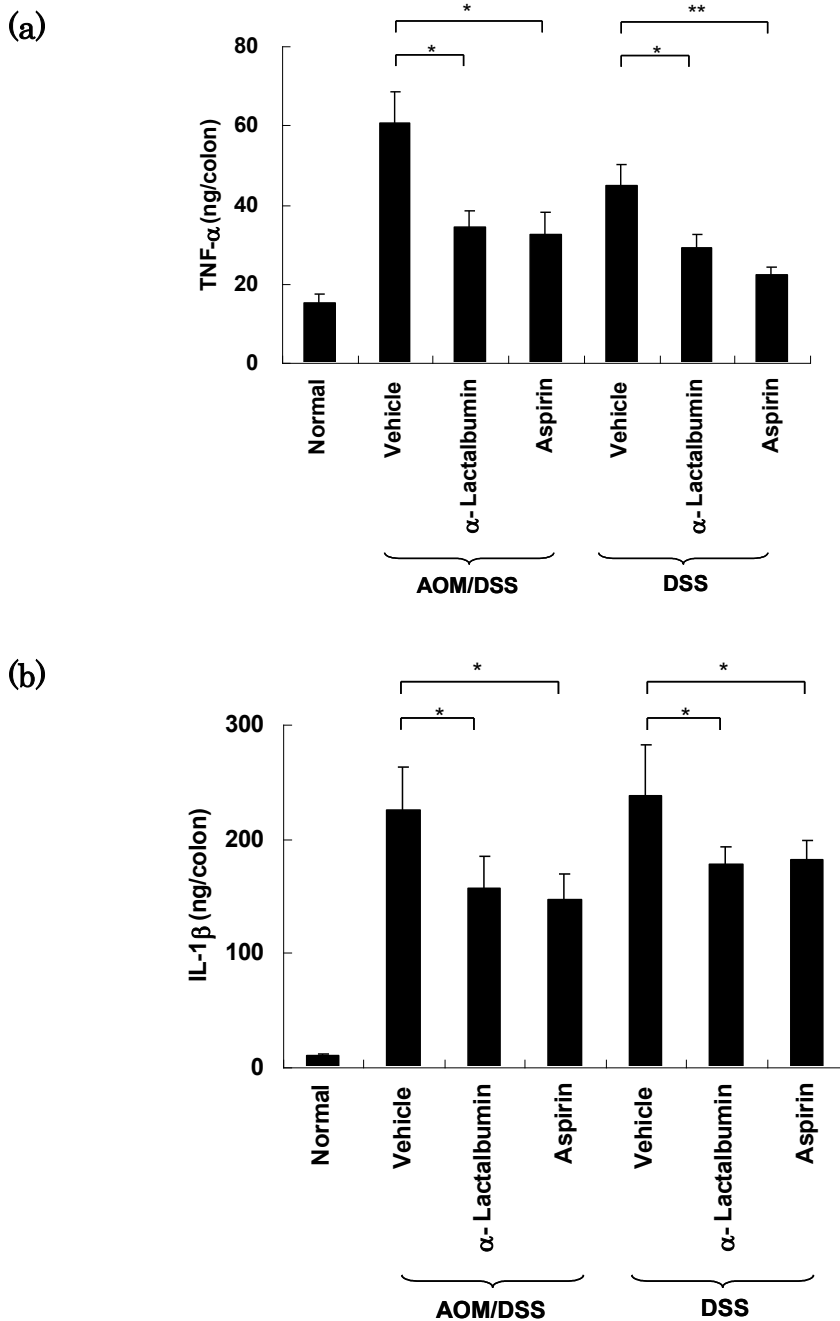


Fig. 21. The effect of α LA or aspirin on TNF- α and IL-1 β levels in the colon tissues of AOM/DSS-treated mice.

Mice were injected with AOM (10 mg/kg body weight, *i.p.*) or vehicle. One week later, they were given DSS solution as drinking water for 1 week. TNF- α (a) and IL-1 β (b) were determined at 1 week after the DSS-treatment. Colon tissues were homogenized and centrifuged to collect the supernatant, followed by measuring the cytokine levels with ELISA.

Values represent the mean \pm S.E.M. (n=10; AOM/DSS treated group, n=5; DSS only treated group).

*, ** Significant difference from the vehicle-administered group ($p < 0.05$, 0.01).

総 括

本研究では、牛乳由来 α -ラクトアルブミンの抗炎症作用に関して検討した。

第1章では、牛乳由来 α -ラクトアルブミンが鎮痛および抗炎症作用をもち、そのメカニズムとして従来の研究では報告されていないシクロオキシゲナーゼ-2阻害活性をはじめて明らかにした。

第2章では、小腸虚血再灌流障害に対する抑制効果を検討する中で、一酸化窒素を介した抗炎症作用メカニズムを見出した。また、 α -ラクトアルブミンの血清中濃度と抗炎症作用の間に正の相関があることをはじめて明らかにし、血液中に吸収された α -ラクトアルブミンおよびそのペプチドが抗炎症作用の活性本体であることを示唆する結果を得た。

第3章では、 α -ラクトアルブミンの大腸発がんに対する抑制効果を検討するなかで、大腸発がんにおけるプロモーション段階でプロスタグランジン産生を抑制することが重要であることを明らかにした。また、 α -ラクトアルブミンはがん進行段階においても炎症関連物質の抑制を通して慢性炎症を改善することも示した。

本研究で示した α -ラクトアルブミンの抗炎症作用に関する成果は、炎症に起因する症状、疾病をもつ者に対しての適応を有する、長期摂取が可能な安全で有用な機能性食品の開発における基礎的な知見を提供するものである。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御指導を賜りました日本大学生物資源科学部生命化学科栄養生理化学研究室 教授 関 泰一郎博士に深甚なる謝意を表します。本論文の作成に当たり適切なご助言を賜りました日本大学生物資源科学部応用生物科学科細胞機能調節学研究室 教授 花澤 重正博士, 食品生命学科食品生命機能学研究室 教授 細野 朗博士に感謝申し上げます。

社会人にして博士論文を作成する機会を与えていただき、多大なるご配慮、ご協力をいただいた株式会社 明治 研究本部 食機能科学研究所長 伊藤 裕之博士, 食機能科学研究所 参与 内田 勝幸博士, 食機能科学研究所 機能性評価研究一部長 山地 健人博士をはじめとする株式会社 明治の皆様には心から感謝いたします。

最後に本研究を進めるにあたり、陰ながら温かく応援してくれた両親へ感謝します。

引用文献

Arunachalam G, Chattopadhyay D, Chatterjee S, Mandal AB, Sur TK, Mandal SC, Evaluation of anti-inflammatory activity of *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC. leaf extract. *Phytomedicine.*, 9:632-635 (2002)

Attaallah W, Yılmaz AM, Erdoğan N, Yalçın AS, Aktan AO. Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. *Pathol. Oncol. Res.*, 18:817–822 (2012)

Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ, Russell AS. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology.*, 104:1832–1847 (1993)

Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B., Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 94:14930-14935 (1997)

Botting RM, Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57 Suppl 5:113-124. (2006)

Bounous G, Batist G, Gold P., Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Lett.*, 57: 91-94 (1991)

Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione *Clin. Invest. Med.*, 14:296–309 (1991)

Cawthern KM, Narayan M, Chaudhuri D, Permyakov EA, Berliner LJ. Interactions of alpha-lactalbumin with fatty acids and spin label analogs. *J. Biol. Chem.*, 272(49):30812-30816 (1997)

Chou TC, Chang LP, Li CY, Wong CS, Yang SP, The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Anesth. Analg.*, 97: 1724-1729 (2003)

Christie, WW. In developments of dairy chemistry, Vol. 2, (ed. By Fox PF) pp1 Elsevier Appried Science (1983)

Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.*, 83(6):1187-1195 (2000)

Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood.*, 80(1):235-240 (1992).

Fantini MC, Pallone F, Cytokines: from gut inflammation to colorectal cancer. *Curr. Drug Targets.*, 9:375–380 (2008)

Grimble, R. F. Nutritional modulation of immune function. *Proc. Nutr. Soc.*, 60(3):389–397 (2001)

Gupta RA, DuBois RN. Aspirin, NSAIDS, and colon cancer prevention: mechanisms? *Gastroenterology.*, 114:1095–1098 (1998)

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer*, 49:1374–1403 (2013)

Hackler LR, Hand DB, Steinkraus KH, Biren VJP. A comparison of the nutritional value of protein from several soybean fractions. *J. Nutr.*, 80:205-210 (1963)

Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Johnston JM, Badger TM. Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10:555–558 (2001)

Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Shiff SI, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 52:237–245 (1996)

Hashida S, Ishikawa E, Nakamichi N and Sekino H., Concentration of egg white lysozyme in the serum of healthy subjects after oral administration. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29(1-2):79-83 (2002)

Hayasawa H, Toida T, Shimokawa Y, Matsumoto H, *United States Patent*, 6815419 (2004)

Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E. Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285:R306-R312 (2003)

Heyland, D. K., Cook, D. J. and Guyatt, G. H. Enteral nutrition in the critically ill patient: A critical review of the evidence. *Intensive Care Medicine.*, 19(8):435–442 (1993)

Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49:546-552 (1989)

Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Takuhiro K, Yoshikawa S, Sugimotoa K. Pretreatment of sivelestat sodium hydrate improves the lung microcirculation and alveolar damage in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in hamsters. *Shock.* 26(1):95-98 (2006)

Jennes R. Development in dairy chemistry-1. (ed. By Fox, PF.) Appl. Sci. Pub., 87-114 (1982)

Ju J, Hao X, Lee MJ, Lambert JD, Lu G, Xiao H, Newmark HL, Yang CS. Cancer preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Cancer Prev. Res.*, 2:143–152 (2009)

Kampman E, Slattery ML, Caan B, Potter JD. Calcium, vitamin D, sunshine exposure, dairy products and colon cancer risk (United States). *Cancer Causes and Control.*, 11:459–466 (2000)

Kleinberg DL, Todd J, Babitsky G. Inhibition by estradiol of the lactogenic effect of prolactin in primate mammary tissue: reversal by antiestrogens LY 156758 and

tamoxifen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 80(13):4144-4148 (1983)

Kupatt, C., Weber, C., Wolf, D.A., Becker BF, Smith TW and Kelly RA. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NF- κ B, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29:2599–2609 (1997)

LinksBrown EC, DiSilvestro RA, Babaknia A, Devor ST., Soy versus whey protein bars: effects on exercise training impact on lean body mass and antioxidant status. *Nutr. J.*, 3: 22-26 (2004)

Lönnerdal B, Lien EL., Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.*, 61:295-305 (2003)

Low PP., Rutherford KJ, Gill HS, Cross ML. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int. Immunopharmacol.*,3:393-401 (2003)

Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock.*, 25(4):329-337 (2006)

Marks F, Fürstenberger G, Kownatzki E. Prostaglandin E-mediated mitogenic stimulation of mouse epidermis in vivo by divalent cation ionophore A 23187 and by tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, 41:696–702 (1981)

Marshall K, Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.*, 9:136-156 (2004).

Martín AR, Villegas I, Alarcón de la Lastra C. The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. *Inflamm. Res.*, 54:145–151 (2005)

Matthews, J. R., Botting, C. H., Panico, M., Morris, HR, and Hay, RT., Inhibition of NF-kappa B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.*, 24:2236–2242. (1996)

Miller DS, Bender AE., The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Br. J. Nutr.*, 9:382–388 (1955)

Mowat AM, Viney JL., The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. Rev.*, 156:145-166 (1997)

Murata M, Tagawa M, Watanabe S, Kimura H, Takeshita T, Morimoto K. Genotype difference of aldehyde dehydrogenase 2 gene in alcohol drinkers influences the incidence of Japanese colorectal cancer patients. *Cancer Sci.*, 90:711–719 (1999)

Neurath AR, Li YY, Strick N, Jiang S., A herpesvirus inhibitor from bovine whey. *Lancet.*, 347: 1703-1704 (1996)

Pearce RJ., Thermal separation of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Australian J.Dairy Technology.*, 38: 144-149 (1983)

Rammer P, Groth-Pedersen L, Kirkegaard T, Daugaard M, Rytter A, Szyniarowski P, Hoyer-Hansen M, Povlsen LK, Nylandsted J, Larsen JE, Jaattela M. BAMLET

activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 9:24–32 (2010)

Rivadeneira, D. E., Evoy, D., Fahey, T. J. 3rd., Lieberman MD and Daly JM., Nutritional support of the cancer patient. *CA. Cancer J. Clin.*, 48(2):69–80 (1998)

Saito T., Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Adv Exp. Med. Biol.*, 606:295-317 (2008)

Schmelzer KR, Inceoglu B, Kubala L, Kim IH, Jinks SL, Eiserich JP, Hammock BD., Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103:13646-13651 (2006)

Schmidt, DG. In association of casein and casein micelles structure, Development of dairy chemistry (ed. By Fox PF), Applied Science Pub., London and New York pp61 (1982)

Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P., Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91:12013-12017 (1994)

Shah NP., Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br. J. Nutr.*, 84 Suppl 1: S3-S10 (2000)

Shannon J, White E, Shattuck AL, Potter JD. Relationship of food groups and water

intake to colon cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5:495–502 (1996)

Smith HS. Arachidonic acid pathways in nociception. *J. Support Oncol.*,4:277-287 (2006)

Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E., Endogenous morphine. *Trends Neurosci.*, 23(9):436-442(2000)

Stefano GB, Goumon Y, Bilfinger TV, Welters ID and Cadet P. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog. Neurobiol.*, 60(6):513-530 (2000)

Sternhagen LG, Allen JC. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alpha-lactalbumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 501: 115-120 (2001)

Stichtenoth DO., The second generation of COX-2 inhibitors: clinical pharmacological point of view. *Mini Rev. Med. Chem.*, 4: 617-624 (2004)

Svensson M, Fast J, Mossberg AK, Düringer C, Gustafsson L, Hallgren O, Brooks CL, Berliner L, Linse S, Svanborg C. α -Lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci.*, 12:2794–2804 (2003)

Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C. Conversion of

α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 97:4221–4226 (2000)

Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J. Surg.*, 20(4):411-417 (1996)

Takeuchi, T., Kitagawa, H., Harada, E. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp. Physiol.*, 89(3):263–270 (2004)

Tamion F, Richard V, Lyoumi S, Daveau M, Bonmarchand G, Leroy J, Thuillez C, Lebreton JP. Gut ischemia and mesenteric synthesis of inflammatory cytokines after hemorrhagic or endotoxic shock. *Am. J. Physiol.*, 273(2 Pt 1):G314-321 (1997)

Tsujimoto H, Ono S, Ichikura T, Matsumoto Y, Yamamoto J, Hase K. Roles of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes? *Gastric Cancer.*, 13:212–221 (2010)

Ushida Y, Shimokawa Y, Toida T, Matsui H, Takase M, Bovine alpha-lactalbumin stimulates mucus metabolism in gastric mucosa. *J. Dairy Sci.*, 90:541-546 (2007)

Warne PK, Momany FA, Rumball SV, Tuttle RW and Scheraga HA., Computation of structures of homologous proteins. Alpha-lactalbumin from lysozyme. *Biochemistry.*, 13(4):768-782 (1974)

Yamaguchi M., Matsuura M., Kobayashi K., Sasaki H., Yajima T., and Kuwata T.:

Lactoferrin protects against development of hepatitis caused by sensitization of Kupffer cells by lipopolysaccharide. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8:1234-1239 (2001)

島崎敬一，ミルクのラクトフェリン，乳業技術，日本乳業技術協会，51:1-21 (2001)