

腸溶加工技術に着目した ラクトフェリン含有機能性食品の開発



① ライオン株式会社 常務取締役 杉山圭吉
 ② ライオン株式会社 生命科学研究所長 村越倫明
 ③ ライオン株式会社 生命科学研究所主任研究員 小野知二
 ④ 株式会社NRL ファーマ 取締役研究開発本部長 星野達雄

はじめに

2008年の厚生労働省の調べによると40~74歳(対象人口約5,800万人)におけるメタボリックシンドローム該当者数は約1,070万人、予備群者数は約940万人、併せて約2,010万人にも達しており、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る。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・高脂血症のうち二つ以上を合併した状態を指し、メタボリックシンドロームを予防、改善するためには、その成因基盤である内臓脂肪の蓄積を抑制することが重要であると考えられている。

ラクトフェリンは1939年に「牛乳に含まれる赤色タンパク質」として発見された、分子量約8万ダルトンで、1~2原子の鉄を配位し、糖鎖を有するタンパク質である。哺乳類の乳中、特に初乳に多く含まれていることから、免疫調節等の生体防御に重要な物質と考えられてきた。また近年の研究で、ラクトフェリンが胃で分解され、生成したラクトフェリシンなどのペプチドが、抗菌・抗ウイルス等の感染防御作用や抗酸化作用、がん予防作用等の多機能な生理活性を発揮することで注目されている。さらにラクトフェリンは母乳に含まれている成分であり、安全性が高い素材であることが特徴である。

ライオン(株)の研究開発本部では、2003年よりラクトフェリン研究を開始し、今日に至っている。ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果に注目した機能性食品「ナイスリムエッセンスラクトフェリン」の開発過程を振り返ると、①内臓脂肪低減効果の発見、②腸溶加工技術の導入、③臨床試験による有効性の立証、④作用メカニズムの解明、という4つのポイントがあったと思われる。以下、この4点に沿って、開発経緯をご説明したい。

1. 内臓脂肪低減効果の発見

ライオン(株)では、歯周病原菌が産生する内毒素LPS(リポ多糖)を不活性化する食品素材を探索し、ラクトフェリンに強い解毒作用があることを見だし、歯周病予防を目的としたラクトフェリンを含有する機能性ガムを開発・上市した。一方、歯周病が全身健康にも影響を与える可能性が示唆されており、歯周病患者は血中のLDLコレステロール(悪玉コレステロール)や中性脂肪が高く、HDLコレステロール(善玉コレステロール)が低いことが報告されていた。ライオン(株)に属する受賞者は、歯周病が全身健康に与える影響の原因因子がLPSではないかと考え、歯周病菌由来のLPSをマウスに投与した結果、血中の総コレステロール、中性脂肪が上昇するこ

とを明らかにした。さらにこれらのマウスにあらかじめラクトフェリンを摂取させておくと、前述の脂質異常が予防できることも見いだした。そして興味深いことに、ラクトフェリンを投与したマウスは、なぜか内臓脂肪の蓄積が少ないことを偶然、発見した。当時、厚生労働省より、メタボリックシンドロームのリスクを計る新しい診断基準が発表されており、メタボリックシンドローム予防の重要性が社会的に認識されつつあった。内臓脂肪を減少させる機能性食品を開発することは国民の健康増進に貢献できるものと考え、この発見を端緒としてラクトフェリン研究の新たなターゲットを「内臓脂肪低減効果を有する食品の開発」に設定した。

2. 腸溶加工技術の導入

内臓脂肪低減効果の発見を契機に、ラット腸間膜脂肪由来の前駆脂肪細胞の初代培養系を導入し、ラクトフェリンが脂肪細胞における脂肪の合成を抑制するという新しい知見を見だし、動物実験の結果を裏づ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ラクトフェリンではその活性が消失することも明らかとなった(図1)。前述のように感染防御作用等におけるラクトフェリンの活性本体は、ラクトフェリシンに代表されるペプチドであることが報告されていたことから、脂肪細胞での知見は予想外の結果であり、かつ重要なデータであった。こうしたことから、ラクトフェリン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、ラクトフェリンが胃で分解されずに腸まで届く加工技術が必要となった。

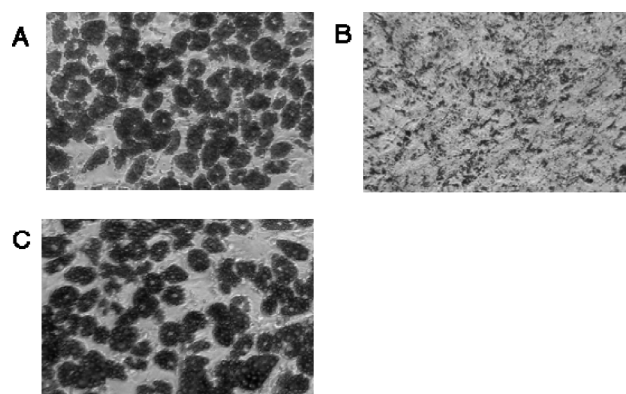


図1 脂肪細胞の脂肪蓄積に対するラクトフェリンの効果
脂肪を Oil Red O で染色

A: 無添加

B: ラクトフェリン添加 (300 µg/mL)

C: ペプシンで分解したラクトフェリン添加 (300 µg/mL)

一方、(株)NRL ファーマではラクトフェリンの腸溶加工技術の開発を行っていた。当時、ラクトフェリンを腸溶化する技術は想像以上に困難で、ラクトフェリンを乾燥状態のまま打錠、成型することは、ほとんど行われておらず、また、食品や栄養補助食品を腸溶化するという考えが一般的ではなく、当然ながら腸溶化の基剤としては医薬品用基剤しかなかった。そのような中、医薬品（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、これを用いた腸溶加工技術の検討を進めた。一般的な処方や剤型、打錠、コーティング方法では満足する結果は得られなかったが、試行錯誤を重ねた結果、日本薬局方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）ラクトフェリンを含有する腸溶錠を開発することに成功した。従来とは違い、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、ラクトフェリンが溶出される設計になっている（図2）。

以上の背景をもとに、ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果を発見したライオン(株)と、ラクトフェリンの腸溶加工技術を開

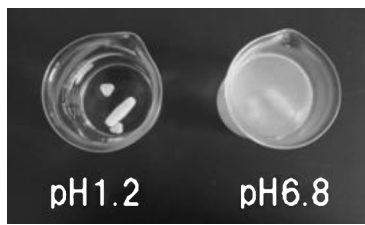


図2 日本薬局方崩壊試験の結果
ラクトフェリン腸溶錠は、酸性では2時間以上崩壊せず、中性では1時間以内に崩壊。

Effect of enteric-coated lactoferrin (300mg/day) on body fat areas of Prof. Dr. K. S.

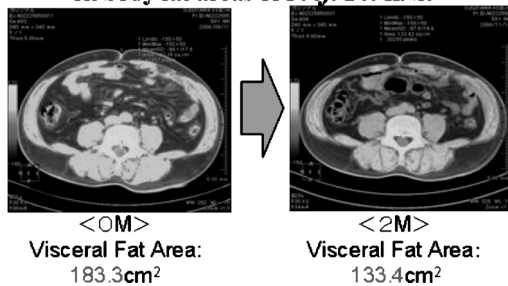


図3 ラクトフェリン腸溶錠の内臓脂肪低減効果（腹部CT画像、社内試験結果の著効例）

発した(株)NRL ファーマが、内臓脂肪低減効果を有する機能性食品の開発を共同で進めた。

3. 臨床試験による有効性の立証

こうして得られたラクトフェリン腸溶錠について、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だし、とりわけ内臓脂肪の減少が顕著であることを確認した（図3）。この結果に自信を得て、ラクトフェリン腸溶錠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（内臓脂肪面積平均100 cm²以上）に対して、ラクトフェリン腸溶錠群およ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300 mg、8週間摂取してもらった。その結果、ラクトフェリン群では、プラセボ群と比較して、体重が2.5 kg 有意に減少し（p=0.013）、CT撮影による腹部内臓脂肪面積が12.8 cm² 有意に減少（p=0.0089）することを明らかにし、ラクトフェリン腸溶錠の内臓脂肪低減効果を科学的に立証した。また、社内試験においても外部の試験においても有害事象は認められなかった。

4. 作用メカニズムの解明

ラクトフェリンの内臓脂肪低減メカニズムは、これまで全く知られておらず、これを解明することは学術的にも意義が大きいと考え、ライオン(株)に属する受賞者らは研究を進めた。まずラットを用いてラクトフェリンを強制胃内投与し、体内動態を解析した。その結果、未分解のラクトフェリンが一部小腸に到達し、血中や他の臓器に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、先に見いだ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いだした。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いだした（図4）。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。ペリリピンについては、Real time PCR法やWestern blotting法により遺伝子・タンパク質レベルでラクト

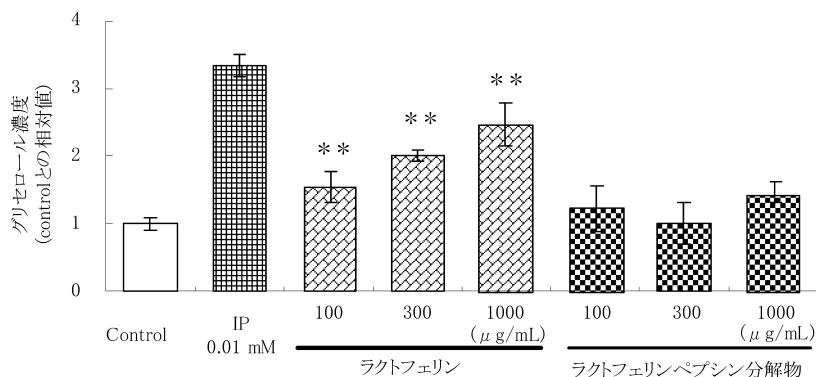


図4 ラクトフェリンの脂肪分解促進作用
Control: 無添加, IP: イソプロテレノール（陽性対象）

フェリンによる発現抑制効果を検証している。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 濃度を上昇させるという新たな知見を得ている。

以上の結果から、経口摂取したラクトフェリン腸溶錠は、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。

おわりに

「ナイスリムエッセンス ラクトフェリン」は、社内はもとより、多くの研究機関との共同研究によって生まれた成果であ

り、生活習慣病の予防・改善を通して、一人でも多くの人々の健康の維持・増進に貢献できれば、これに勝る喜びはない。

謝 辞 本開発に当たっては、京都府立医科大学の西野輔翼名誉教授、名古屋市立大学の飯郷正明先生、京都市立病院糖尿病代謝内科部長・京都府立医科大学臨床教授の吉田俊秀先生、北海道大学の宮下和夫教授、東京大学の加藤久典特任教授のご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。また本開発に携わった、ライオン(株)、(株)NRL ファーマの関係者の皆様に深謝申し上げます。