

学 位 論 文 要 旨

氏名 前川 祐太

題 目 : Beneficial effects of lactoferrin on the blood glucose regulation in rats
(ラットの血糖調節機構に及ぼすラクトフェリンの有益な効果)

論文要旨 :

Lactoferrin (Lf) is a glycoprotein found in various mammalian body fluids, including blood, tears, saliva, and bile, and is especially abundant in milk. The potential of Lf has been evidenced by its physiologically pleiotropic properties, as represented by biophylactic responses such as anxiolytic and analgesic effects, which are accompanied by an increase in nitric oxide production or activation of the μ -opioid system. In recent years, interests have also been developed in the involvement of Lf in lipid metabolism, while it is still unknown whether Lf treatment can actually influence glucose tolerance in a normal individual. In addition, although the anti-stress-related effects of Lf described above are indirectly suggestive of the possibility for improvement of physical-stress-induced disorder in glucose homeostasis, the details remain largely unknown. The present study aims to investigate whether treatment with bovine Lf (bLf) induces any changes in blood glucose regulation in normal rats and those under stress condition.

Firstly, I investigated whether Lf affects glycemic regulation, including glucose absorption from the small intestine. BLf (100 mg/kg) was intraperitoneally administered to rats before intravenous glucose injection (intravenous glucose tolerance test, IVGTT) or oral glucose administration (oral glucose tolerance test, OGTT). On the other hand, glucose absorption from the small intestine was also estimated using an everted jejunum sac of the rats. In IVGTT, bLf pretreatment had no significant effect on plasma glucose or insulin. In OGTT, the bLf group tended to show lower plasma glucose at and after the 15-min peak than the control group, and significantly decreased at 180 min (bLf: 131.2 ± 3.7 mg/dL, control: 147.8 ± 2.3 mg/dL). At 30 min in OGTT, the increasing width of insulin from 0 min was significantly larger in the bLf-treated group than in the control group (bLf: 1.44 ± 0.108 ng/mL, control: 0.80 ± 0.072 ng/mL). Total plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) was significantly lowered at 60 min by the bLf treatment (bLf: 88.7 ± 16.1 pg/mL, control: 142.0 ± 16.2 pg/mL), while an immediate increase in total plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) was observed within

the bLf group undergoing OGTT. In addition, bLf was associated with a significant increase in the amount of glucose absorbed into the everted jejunum sac (bLf: 10.6 ± 1.4 mg/g tissue, control: 6.1 ± 0.9 mg/g tissue). The obtained results revealed the finding that Lf may have a potential to suppress hyperglycemia, accompanied by plasma insulin elevation via transiently accelerating GLP-1 secretion, while Lf even enhances glucose absorption from the small intestine..

Secondly, I aimed to assess the effects of Lf on glycemic regulatory responses under restraint stress (RS) in rats. BLf (100 mg/kg) was intraperitoneally administered to rats before oral saline administration or OGTT following 60 min of RS load. Glycemic or stress-related parameters were analyzed in OGTT. In case of oral saline administration, RS significantly raised plasma glucose (17.9 ± 2.0 mg/dL higher than the level before RS), but bLf did not affect the level. As for plasma corticosterone, bLf showed a significantly decreased level at 30 min after the RS load (bLf: 131.2 ± 11.6 ng/mL, control: 204.1 ± 16.9 ng/mL). Meanwhile, plasma glucose in OGTT showed overall lower transition in bLf group, and the level was significantly decreased at 0 min (bLf: 115.8 ± 2.1 mg/dL, control: 126.0 ± 2.4 mg/dL), 30 min (bLf: 188.0 ± 5.7 mg/dL, control: 233.8 ± 14.2 mg/dL) and 180 min (bLf: 129.0 ± 4.7 mg/dL, control: 147.7 ± 3.4 mg/dL). Immediate increase in plasma insulin was also seen after the oral glucose administration, but the increment value was not affected by the bLf treatment. Significant increase was observed in plasma corticosterone during RS, and bLf significantly suppressed that level at 30 min (bLf: 161.6 ± 5.4 ng/mL, control: 231.2 ± 10.6 ng/mL) and 60 min (bLf: 158.5 ± 8.5 ng/mL, control: 217.2 ± 11.4 ng/mL). However, plasma epinephrine and glucagon during RS were not changed by the bLf treatment. These results suggest that Lf suppresses the increment of plasma glucose that occurs as a result of the combination of oral glucose administration and acute RS load. The suppressive change in plasma glucose was not consistent with the changes in plasma epinephrine and glucagon, but decrease in plasma corticosterone, indicating that Lf may be involved in the hypoglycemic responses, which can be attributed to the attenuated activation of the HPA axis rather than to that of the sympathetic nervous system.

In conclusion, Lf can decrease blood glucose in relation to the enhancement of insulin secretion by the incretin effect, despite the fact that Lf promotes glucose absorption in the small intestine in normal condition. On the other hand, it was found that Lf has a potential to suppress the elevation of plasma glucose possibly accompanied by mediating HPA axis, not affecting sympathicotonia or gluconeogenesis. These findings suggest that treatment by Lf might be useful as one method of decent glycemic control.

学位論文審査の結果の要旨

| | |
|------|--|
| 氏 名 | 前川 祐太 |
| 審査委員 | 主 査：鳥取大学 教授 竹内 崇 |
| | 副 査：鹿児島大学 教授 川崎 安亮 |
| | 副 査：鳥取大学 教授 日笠 喜朗 |
| | 副 査：鳥取大学 教授 森田 剛仁 |
| | 副 査：鳥取大学 准教授 杉山 晶彦 |
| 題 目 | Beneficial effects of lactoferrin on the blood glucose regulation in rats (ラットの血糖調節機構に及ぼすラクトフェリンの有益な効果) |

審査結果の要旨：

ラクトフェリン(Lf)は、様々な体液中に含まれる鉄結合性糖タンパクであり、多くの動物の初乳中には高濃度のLfが含まれている。Lfは多機能タンパクとして知られるが、近年、血管拡張作用、抗酸化作用、脂質代謝改善作用などが報告されており、生活習慣病の予防・改善効果が期待される。さらに、インスリン抵抗性を示す人の糖尿病では、血中Lf濃度とインスリン感受性との間には正の相関が、血糖値とは負の相関が報告されており、Lfが糖代謝を修飾する可能性が示唆されている。しかしながら、糖代謝に対するLfの作用に関して基礎的な研究はなされていないのが現状である。

そこで本研究では、ラットを用いて経口ならびに静脈内投与による耐糖能試験を行い、血糖およびインスリン動態に及ぼすLfの影響について基礎的な解析を進めるとともに、インスリン分泌に対するインクレチンを介した修飾作用の解析を試みた。さらに、ストレス条件下での血糖調節機構に対するLfの作用を明らかにすることを目的とした。

第1章では、非ストレス条件下における血糖調節機構に対するLfの作用を明らかにする目的で、グルコースの静脈内あるいは経口投与時の血糖ならびに血漿インスリン動態について解析を行った。その結果、静脈内へのグルコース(1 g/kg)投与に伴う血糖値および血漿インスリン濃度の変化に対して、ウシLf(bLf) 100 mg/kgの腹腔内投与は有意な影響を及ぼさなかった。一方、グルコース(2 g/kg)の経口投与時には、bLf 100 mg/kgを腹腔内投与することで、血糖値は15分後に低下傾向を、180分後には有意な低下を示した。また、30分後の血漿インスリン濃度は一過性に有意な増加を示した。グルコース経口投与後の血漿glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)およびglucagon-like peptide-1 (GLP-1)濃度を測定したところ、60分後のTotal GIPはbLf処置によって有意に低下したが、15分後のGLP-1

は有意な増加を示した。GLP-1 の分泌亢進による血漿インスリン濃度の上昇は、所謂、インクレチン効果と呼ばれる。食物の経口摂取時においては、bLf が GLP-1 分泌促進を引き起こし、さらにインスリン分泌の促進効果によってグルコース経口投与に伴う血糖上昇を抑制することが示唆された。また、ラット空腸の反転腸管標本を作製し、小腸からの糖吸収に及ぼす bLf の影響を解析したところ、bLf 100 mg/kg を腹腔内投与したラットの小腸は対照群に比べ約 1.7 倍の糖吸収を示した。以上の結果から、bLf は小腸からの糖吸収を促進するものの、小腸からの GLP-1 分泌増強を介して膵臓からのインスリン分泌量を増加させ、過剰な血糖上昇を抑制することが明らかとなった。

第 2 章では、ストレス負荷時の血糖調節機構に対する Lf の効果を解析した。採血時のストレス負荷を最小限にするため、あらかじめラットに採血用皮下ポート埋め込み手術を施した。3 日間の回復期間の後にラットにグルコースを経口投与し、直後から 60 分間にわたりラットを拘束ケージに入れ、経時的に採血を行った。対照群として生理食塩水を経口投与し、同様にラットを拘束ケージに入れて経時的に採血を行ったところ、血糖値の上昇は平均 17.9 mg/dL とわずかであった。一方、グルコース経口投与では拘束ストレス負荷によって顕著な血糖上昇を認め、bLf 処置はこれを有意に抑制した。しかしながら、bLf は血漿インスリン濃度に対しては有意な影響を及ぼさなかった。さらに、ストレス負荷に伴って変動すると考えられる血漿コルチコステロン、エピネフリンおよびグルカゴン濃度を解析したところ、bLf 処置は血漿コルチコステロンの上昇を有意に抑制したものの、エピネフリンおよびグルカゴンに対しては影響を及ぼさなかった。これらの結果から、bLf が視床下部-下垂体-副腎皮質系に対して有意な抑制効果を有するものの、エピネフリンまたはグルカゴンを介した血糖上昇に対して bLf は影響を及ぼさないことが示唆された。

以上の結果は、bLf が小腸からの糖吸収を促進し、さらに GLP-1 を介してインスリン分泌を増強することで血糖の過剰な上昇を抑制し、糖の利用を促進すること、さらにはストレス負荷時における過剰な血糖上昇を抑制することを示しており、生体内での糖代謝において重要な作用を有すると考えられる。

以上より、本論文は博士（獣医学）の学位論文に相応しい価値があると認める。