

平成22年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380177
 研究課題名（和文） ミルク由来ラクトフェリンによる疼痛管理を介した動物のQOL向上
 研究課題名（英文） QOL improvement through the pain control by the milk-derived lactoferrin in the animals
 研究代表者
 竹内 崇 (TAKEUCHI TAKASHI)
 鳥取大学・農学部・教授
 研究者番号：20216849

研究成果の概要（和文）：高齢化に伴って動物の腫瘍疾患や神経系疾患が増加傾向にある。これら疾患は完全に治癒することが困難な場合が多く、慢性的な疼痛を伴うことから、動物のQOLは著しく損なわれている。本研究では、食品由来で安全性の高いラクトフェリンが特に慢性痛の神経伝達を抑制すること、関節痛などの慢性的な炎症と痛みを顕著に和らげること、そしてストレスに伴う交感神経の緊張を和らげることを明らかにし、総合的に動物のQOLを改善するという知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Neoplastic or neurological diseases are in a tendency to increase in aged animals. Because a lot of cases that it is difficult for these disorders to completely heal are accompanied with chronically pain, it is failed to be remarkable as for the animal's QOL. In this project, we used lactoferrin which is safety and food origin, to depress chronic inflammation and pain such as the arthritis. Lactoferrin had suppressing effects on neural transmission of the chronic pain and sympathetic hyper activity in stressful condition. Finally, it is suggested that lactoferrin is one of the useful supplements to improve animal's QOL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：獣医臨床検査学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：ラクトフェリン、疼痛管理、ストレス

1. 研究開始当初の背景

動物臨床の現場においては、末期癌をはじめ、椎間板ヘルニア、変形性脊椎症、あるいは一部の術後疼痛など、激しい疼痛に苦しむ動物をしばしば目にする。また、激痛に悩まされている動物はもとより、飼い主の苦悩も想像を絶するものがあり、終末医療を含めた疼痛管理は早急に解決すべき課題である。人医療においても国家的な取り組みが進められている重要課題である。近年、動物臨床においても種々の疼痛管理法が確立されてきたが、飼い主が自宅で行える疼痛管理は限られており、鎮痛薬による副作用も大きいのが現状である。疼痛とストレスを軽減することによって動物のQOLを向上させるには、既存の鎮痛薬以外にもさまざまな取り組みがなされるべきである。

2. 研究の目的

本研究は、我々がこれまでに明らかにしたミルク由来ラクtofフェリンの鎮痛ならびにストレス軽減効果を臨床応用し、動物のQOL向上に貢献することを目的とし、そのために、ラクtofフェリンの腸管吸収、脳への移行、痛みの種類に対するラクtofフェリンの有効性の違い、心拍変動解析によるストレスの客観的評価、臨床例に対する効果を明らかにしようと試みたものである。

3. 研究の方法

(1) ラクtofフェリンに対する血液・脳脊髄液関門の透過性に関する解析

ラクtofフェリンが脳に対して鎮痛効果や抗ストレス効果を発揮するためには、ラクtofフェリンが血液-脳関門あるいは血液-脳脊髄液関門を通過して、脳実質へ到達しなければならない。そこで、以下の2つの実験を行った。

① 8週齢のWistar系雄ラットを用い、ウレタン(1 g/kg, SC)麻酔下にて、尾静脈から牛乳由来ラクtofフェリン(bLF, 10 mg/kg)を投与した。投与10分後、ラットをPLP固定液にて灌流固定を行い、脳を取り出した。脳をスライスし、PLP固定液で一晩固定した後、液体窒素で凍結し、凍結切片を作成した。切片をPBSで洗浄後、ウシガエル血清でブロッキングし、HRP標識した抗-bLFヤギ抗体と反応させ、DABにて発色、封入し鏡検した。

② 8週齢のWistar系雄ラットを保定箱に入れ、覚醒状態にて尾静脈からbLF(10, 30 mg/kg)を投与し、30分後、1時間後、2

時間後に、26G注射針を装着したシリンジを大槽へ刺入し、脳脊髄液を0.2 ml採取した。脳脊髄液を1,500 g, 4°Cで遠心分離し、上清中のbLF濃度をELISAにて測定した。尚、ELISAの測定感度は2 ng/mlである。

(2) ビーグル犬の腸管からのラクtofフェリン吸収動態の解析

ラクtofフェリンを動物臨床に応用するためには、犬の腸管からのラクtofフェリン吸収動態を明らかにする必要がある。そこで、1晩絶食した健康なビーグル犬5頭(1才♂4頭、10才♀1頭)にbLF(1 g/kg)を経口投与し、投与前、投与後30分、1, 2, 4, 6時間後に橈側皮静脈から採血した。血液を遠心分離し、血漿中のbLF濃度をELISA法にて測定した。

(3) 疼痛の種類に対するラクtofフェリンの鎮痛効果の違い

侵害受容器から求心性に情報伝達する神経線維としてA β 線維、A δ 線維、C線維が知られ、そのうち、A δ 線維は刺すような鋭い痛みを、C線維は悶えるような持続的な痛みを伝達する。そこで、8週齢のWistar系雄ラットを使用し、覚醒状態で専用の保定台に保定し、大腿神経をアイソレーテッド刺激装置にて周波数の異なる電気刺激を与えることによって種類の異なる疼痛を再現した。

電気刺激周波数は、2,000 Hz(A β 線維)、250 Hz(A δ 線維)および5 Hz(C線維)とし、金メッキしたボタン型電極を介して大腿神経に刺激を与えた。

対照群にはsaline(ip)を、陽性対照群にはモルヒネ(3 mg/kg, 5 mg/kg, ip)を、試験群にはbLF(100 mg/kg, ip)を投与し、30分後に電気刺激に対する域値を求めた。

(4) 犬の心拍変動解析による客観的ストレス評価

慢性疼痛を伴う動物は、強いストレス状態にあると考えられるが、高次脳機能が発達している犬のストレスレベルを客観的に評価することは容易ではない。そこで本実験では、ホルター心電計を用いて心電図を連続記録し、OFF-Lineでの心拍変動解析から、交感神経ならびに副交感神経の緊張度をストレスの指標とした。

ストレス状態を再現するため、片道1時間の自家用車での移動をストレス負荷刺

激とし、bLF 投与によるストレス軽減効果を解析した。

心電図記録用電極を、記録前日に装着し、犬用ジャケット内に収納したホルター心電計（フクダ・エム・イー、QR2100）にて移動開始1時間前から移動終了後1時間まで心電図を記録した。移動開始30分前に対照群には Saline を、被検群には腸溶性 bLF (30 mg/kg) をそれぞれ経口投与した。また、往路と復路の間には20分の休憩時間を設定した。

心拍変動解析の指標として、心拍数、High frequency power (HF power) および Low frequency power (LF power) を算出し、HF power を副交感神経活動の指標、LF/HF 比を交感神経活動の指標とした。

(5) 自然発生による慢性疼痛症例に対するラクトフェリンの鎮痛効果

自然発生の慢性疼痛症例として、リンパ腫による腹部疼痛、腰椎の椎間板ヘルニアによる後躯疼痛、循環不全による後肢疼痛、進行性の骨軟骨異形成症による慢性関節炎の症例について、腸溶性 bLF を 20-30 mg/kg (bid) の用量で使用した。これらはいずれも、NSAIDs の鎮痛効果が十分に得られなかった症例である。bLF による鎮痛効果の判定は、投薬前と比較し、著効、ある程度有効の2者を効果ありと判断した。

4. 研究成果

(1) ラクトフェリンに対する血液・脳脊髄液関門の透過性に関する解析

① bLF (10 mg/kg) 投与後10分の前頭葉毛細血管内皮細胞には、抗-bLF 陽性を示す小胞を認めた (図 1-a)。また、脈絡叢上皮細胞は広範囲において抗-bLF 陽性を示し (図 1-b)、特に、上皮細胞の細胞質内にはおびただしい数の抗-bLF 陽性顆粒を認めた (図 1-c)。

これらの結果は、血管内に投与した bLF が血液-脳関門あるいは血液-脳脊髄液関門を通過することを示しており、通過後は脳実質へ拡散するものと考えられる。

② ラットの静脈内に bLF 10 mg/kg あるいは 30 mg/kg を投与し、投与後2時間までの脳脊髄液中の bLF 濃度を比較すると、10 mg/kg 投与群では、投与1時間後から緩やかに濃度が上昇し、2時間目に約 400 ng/ml に達した。一方、30 mg/kg 投与群では、投与後1時間でピーク (約 650 ng/ml) に到達し、その後緩やかに減少した (図 2)。この結果は、血管内の bLF が血液-脳脊髄液関門を通過し、脳脊髄液中に拡散していることを示唆している。ラクトフェリンは分子量約 80kDa の高分子タンパクであり、脈絡叢上皮細胞膜には高親和性のラクトフェリン受容体が発

現していることが明らかにされており、脳脊髄液へ移行するラクトフェリンは、この特異的受容体に結合して上皮細胞内へとりこまれた後に、脳脊髄液中へ放出されると考えられる。

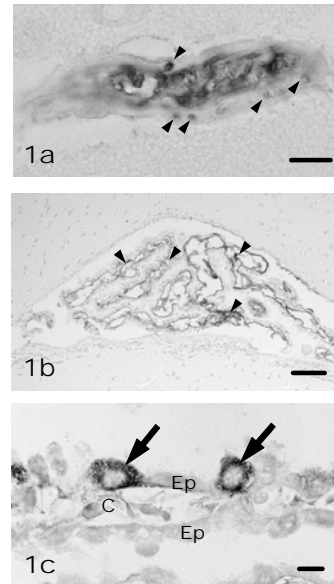


図 1 ラット脳の毛細血管(a)および脈絡叢(b,c)における抗-bLF 陽性像

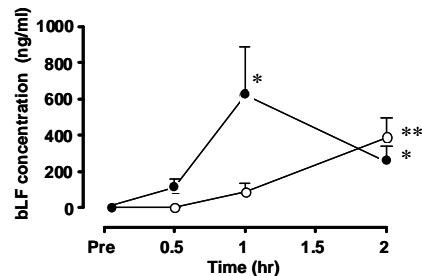


図 2 ラット脳脊髄液中 bLF 濃度の経時変化. Mean ± SE (n=5), *P<0.05, **P<0.01 vs Pre. ○ bLF 10mg/kg, ● bLF 30mg/kg.

(2) ビーグル犬の腸管からのラクトフェリン吸収動態の解析

ラクトフェリンを動物臨床に応用するためには経口投与が望ましいため、腸管からのラクトフェリン吸収動態について解析した。その結果、ビーグル犬に bLF (1 g/kg) を経口投与すると、投与後2時間で血漿中 bLF 濃度が約 100 ng/ml まで上昇し、4時間まで比較的高い濃度を維持した後、緩

やかに減少した（図3）。この結果は、経口投与後約2時間で最大効果が期待されることを示唆している。

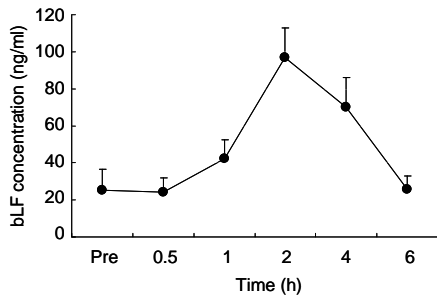


図3 ビーグル犬における bLF の腸管からの吸収動態. Mean±SE (n=5).

(3) 疼痛の種類に対するラクトフェリンの鎮痛効果の違い

ラット大腿神経の電気刺激によってC線維およびA δ 線維をそれぞれ興奮させ、その域値の変化を解析した結果、モルヒネ(5 mg/kg, ip)投与では、C線維およびA δ 線維ともに有意に閾値が上昇した（図4）。

一方、bLF(100 mg/kg, ip)はC線維の閾値を有意に上昇させたが、A δ 線維に対しては影響を及ぼさなかった（図4）。この結果は、bLFは持続的な痛みに対して、より高い有効性を有することを示唆しており、慢性疼痛のコントロールに適していると考えられる。

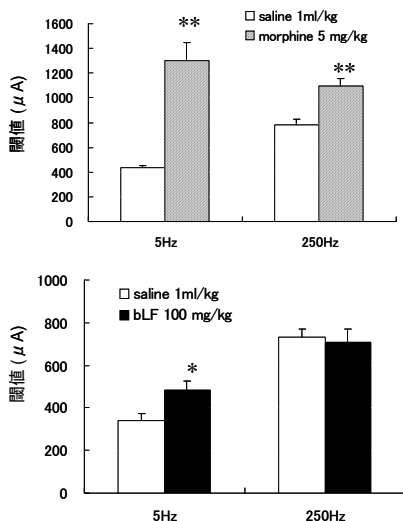


図4 ラット大腿神経におけるC線維(5 Hz)およびA δ 線維(250 Hz)の閾値に対するラクトフェリンの効果. Mean±SE (n=6), *P<0.05, **P<0.01

(4) 犬の心拍変動解析による客観的ストレス評価

動物のQOLは、疼痛のみではなく、疼痛に伴うストレス、不安状態によって大きく左右される。そこで、ビーグル犬のストレスモデルとして、自家用車による移動をストレス負荷条件とし、ラクトフェリンによる軽減効果を客観的に解析した。

① 自家用車による移動ストレスが心拍数に及ぼす影響

自家用車の移動によるストレス負荷は、往路、復路、移動終了後のいずれにおいても、ビーグル犬の心拍数を有意に増加させたが、bLF(30 mg/kg, po)投与によっても、増加した心拍数には変化がみられなかった（図5）。

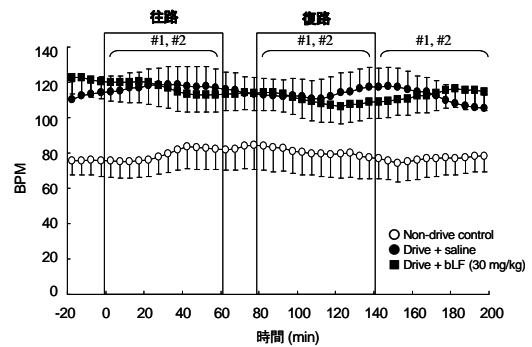


図5 自家用車の移動に伴うビーグル犬の心拍数変動に対するbLFの効果. Mean±SE (n=4). #1;P<.01 between drive+saline and non-drive control, #2;P<0.01 between drive+bLF and non-drive control.

① 自家用車による移動ストレスが副交感神経緊張に及ぼす影響

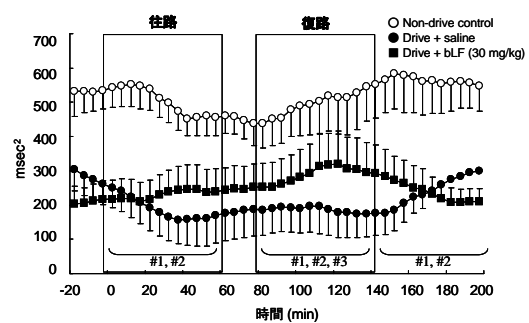


図6 自家用車の移動に伴うビーグル犬の副交感神経活動に対するbLFの効果. Mean±SE (n=4). #1;P<.01 between drive+saline and non-drive control, #2;P<0.01 between drive+bLF and non-drive control, #3;P<0.01 between drive+saline and drive+bLF).

心拍変動解析から得られた副交感神経活動は、往路、復路、移動終了後のいずれにお

いても、移動に伴って有意に低下したが、bLF (30 mg/kg, po) 投与によって復路の副交感神経活動は有意に改善された (図6)。

③自家用車による移動ストレスが交感神経緊張に及ぼす影響

心拍変動解析から得られた交感神経活動は、往路、復路、移動終了後のいずれにおいても、移動に伴って有意に増大したが、bLF (30 mg/kg, po) 投与によって往路と復路の交感神経緊張は有意に改善された (図7)。

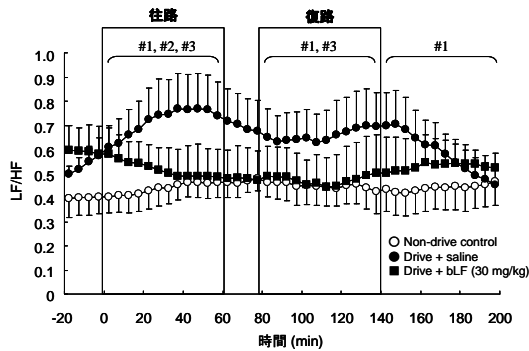


図7 自家用車の移動に伴うビーグル犬の交感神経活動に対するbLFの効果. Mean \pm SE (n=4). #1; P<.01 between drive+saline and non-drive control, #2; P<0.01 between drive+bLF and non-drive control, #3; P<0.01 between drive+saline and drive+bLF).

(5) 自然発生による慢性疼痛症例に対するラクトフェリンの鎮痛効果

リンパ腫による腹部疼痛、椎間板ヘルニアによる腰痛、血行障害による後肢疼痛、などの症例においても腸溶性bLFはある程度有効であったが、特に劇的な効果を示した骨軟骨異形成症による慢性関節炎症例について詳細に述べる。

症例は、スコティッシュ・ホールド、雌の6ヶ月齢で、1ヶ月前から後肢の疼痛を訴えるようになった。初診のX線検査では、すでに両後肢に足根骨、中足骨、趾骨領域における骨の形状異常、滑膜の肥厚、骨増生を認め、踵骨尾側に外骨腫を認めた。また、肢端の疼痛が激しく、歩行は困難であった。その後のX線検査では、骨増生は急速に悪化し、第52病日には足関節の広範な領域に及んでいた。一方、bLF投与を開始後4週間が経過した第119病日のX線では、増生していた骨は縮小傾向を示し、関節周囲の腫脹も軽減した (図8)。

「動物の痛み研究会」の評価基準に従い、触診による疼痛レベルの評価は以下の通りとした。レベル0：触診しているのも気づかない。レベル1：触られているのをちょっと見る。嫌がらない。レベル2：触られている

のを見て、舐めるか、少し嫌な素振りをみせる。レベル3：逃げようとする、嫌がる、ちょっと鳴く、過剰に舐める、気にする。レベル4：顕著に嫌がる。噛んだり、舐めたり、擦ったり、その部位を保護する。

図9に示すように、ステロイドを処方していた2週目までは比較的疼痛は軽減されていたが、NSAIDsに変更した6週目以降は徐々に疼痛が激しくなり、8週目では体のどの部位を触っても持続的な疼痛を示す状態となった。そこで、8週目から腸溶性bLFを25 mg/kg (bid) で投与開始したところ、約2週間後から疼痛レベルは4から2へと段階的に低下し、15週目以降は、四肢を触診しても疼痛を示すことがなくなり、さらに起立歩行が可能となった。同時に、疼痛に伴うストレスも軽減されたと考えられる。

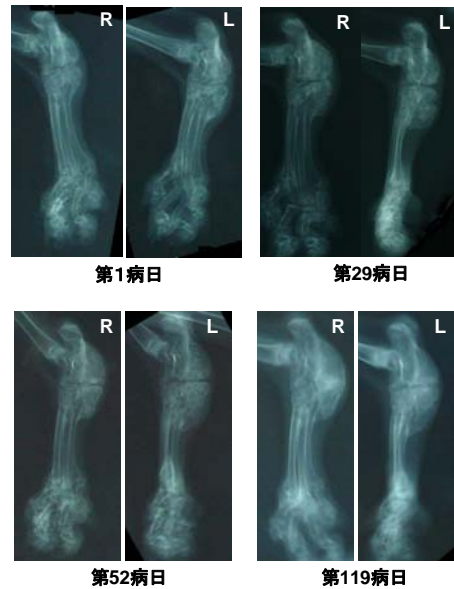


図8 スコティッシュ・ホールドの骨軟骨異形成症に対する腸溶性bLFの効果 (左右後肢のX線像)

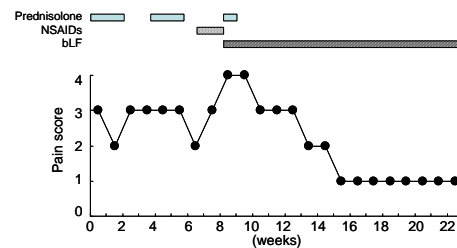


図9 痛みスコアと腸溶性bLFの効果

以上のように、ラクトフェリンは動物の疼痛のうち、特に慢性疼痛に対して軽減効果を発揮することが確認された。その作用は、C線維を介する痛みの伝達を低下させることによって引き起こされるものと考えられ、さ

らに、ストレス軽減効果も確認されたことから、動物のQOLは総合的に改善される可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1)Kamemori N, Takeuchi T, Sugiyama A, Miyabayashi M, Kitagawa H, Shimizu H, Ando K and Harada H. Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats. J. Vet. Med. Sci., 70 : 313-315, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

(1)石川まりこ:体内寿命延長に伴うPEG化ラクトフェリンの鎮痛増強効果. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月26日. とりぎん文化会館(鳥取)

(2)杉山晶彦:ポリエチレングリコール修飾ラクトフェリンの肝保護作用および肝細胞における取り込みに関する検討. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月26日. とりぎん文化会館(鳥取)

(3)土岐志保:犬の自律神経系に及ぼすラベンダーオイルの影響. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月26日. とりぎん文化会館(鳥取).

(4)竹内 崇:植物由来長期熟成濾過液(HP-1)が中枢神経系に及ぼす効果. 第63回日本栄養・食糧学会大会. 2009年5月22日. 長崎ブリックホール(長崎)

(5)竹内 崇. 中枢神経系に対するラクトフェリンの新規作用. 第32回日本鉄バイオ学会. 2008年9月14日. ホテル アラスカ(青森)

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 崇 (TAKEUCHI TAKASHI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号: 20216849

(2)研究分担者

日笠 喜朗 (HIKASA YOSHIAKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号: 30165071

(H20→H21: 連携研究者)

岡本 芳晴 (OKAMOTO YOSHIHARU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号: 50194410

(H20→H21: 連携研究者)

杉山 晶彦 (SUGIYAMA AKIHIKO)

鳥取大学・農学部・助教

研究者番号: 00432609

(H20→H21: 連携研究者)