

食用脂質と甘味刺激による
glucagon-like peptide-2 分泌の制御

さ とう しん ご
佐 藤 伸 悟

(消化器病学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 2 5 年度

目 次

第 1 章	緒言	1
第 2 章	ラットを用いた食用脂質と甘味刺激による glucagon-like peptide-2(GLP-2)分泌の検討	
第 1 節	目的	5
第 2 節	方法	6
第 3 節	結果	10
第 4 節	考察	14
第 5 節	小括	19
第 3 章	ヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株を用いた GLP-2 分泌への甘味受容体の関与の検討	
第 1 節	目的	20
第 2 節	方法	21
第 3 節	結果	23
第 4 節	考察	25
第 5 節	小括	27
第 10 章	統括的考察	28
第 11 章	結論	32

謝辭	3 3
引用文獻	3 4
圖表	4 1

第1章 緒言

Glucagon-like peptide-2(GLP-2) はプログルカゴンを構成する158のアミノ酸のうちカルボキシル基側末端の33 (126-158) のアミノ酸からなるプログルカゴン由来ペプチドである。プログルカゴンに由来するペプチドは、発現部位によって最終産物が異なり、例えば膵臓ではglucagonが生成される。GLP-2の場合、主に小腸粘膜に局在する腸管内分泌細胞 (L細胞) 内に発現したプログルカゴンがprohormone convertase1/3により切断される際、GLP-1やglicentinと共にその活性体(GLP-2¹⁻³³)を生じるとされる¹⁻³⁾(図1)。L細胞からのGLP-2分泌に関しては、腸管腔内の栄養素による直接的な刺激のほか、「神経内分泌ループ」と呼びうる伝達系を介した間接的な刺激に反応することが想定されている。後者では栄養素が腸管に達したことがシグナルとなり、口側腸管における迷走神経を介するコリン作動性刺激がgastrin-releasing peptide(GRP)を産生しL細胞からのGLP-2分泌を促進する³⁾。いずれにおいても、小腸管腔内の栄養素の存在がGLP-2分泌に大きな役割を果たす。そしてL細胞から分泌されたGLP-2は、近位小腸を中心に内分泌細胞、小腸神経線維⁴⁾、或いは上皮筋線維芽細胞⁵⁾上に発現するGタンパク結合型受容体 (GLP-2受容体) に結合することにより様々な生理活性を示し、やがて血管内皮細胞などに豊富に存在する酵素dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV)によりGLP-2³⁻³³へと不活化される (図2)。

このペプチドは当初、杯細胞の分化・増殖を刺激し腸管重量を増加させ、空腸・回腸の絨毛の成長を誘導する強力な成長因子として同定された⁶⁾が、その後、糖輸送体の発現亢進による能動輸送・促進拡散両面から糖の吸収促進、グリシンの吸収促進、apoB48リポ蛋白とカイロミクロン産生亢進による脂質吸収の促進、門脈血流の増加等の作用が報告され、単に腸管の吸収面積を広げるのみならず輸送体の発現亢進により栄養素全般の消化吸収を促進する事が示され

ている⁷⁾ (図3)。その一方で、胃酸分泌抑制作用や腸管蠕動抑制作用、摂食抑制作用やグレリン分泌の抑制作用などを有することが報告されており、GLP-2が腸管機能に負のフィードバックを与え、生体における消化吸収の全体的な恒常性を維持している可能性も示唆される。また急性膵炎⁸⁾やメタボリック症候群⁹⁾などの病態においては、小腸粘膜の透過性亢進に起因するエンドトキシン血症をしばしば認めるが、GLP-2は腸上皮細胞における細胞間接合蛋白 (ZO-1、occludin) の発現を促進して粘膜のバリア機能を維持するほか、炎症性サイトカインの抑制、上皮細胞アポトーシスの抑制、多剤耐性関連蛋白2の誘導によって小腸粘膜の保護に貢献している²⁾ (図3)。

GLP-2の有する多彩な機能、とくに小腸粘膜の増殖促進や保護作用に関しては、小腸粘膜が障害される様々な疾患に対しての臨床応用が近年期待されている。例えば短腸症候群¹⁰⁾やCrohn病¹¹⁾など、腸管実効吸収面積の減少にともなう続発性吸収不良症候群においては、身体に必要な成長・代謝に重要な消化吸収機能が高度に障害される場合があり、そのような障害に対してしばしば中心静脈栄養法が用いられる。しかし、長期間の経静脈栄養を持続することは残存小腸の廃用性萎縮をもたらし、またbacterial translocationの誘発など小腸免疫機能の低下の原因として問題視されている¹²⁾。そのため近年、消化管の機能を維持する成長因子の重要性が再認識され、小腸機能不全への治療標的としてGLP-2の可能性が強調されるようになった¹²⁻¹³⁾。すなわち、GLP-2アナログを投与する、あるいはその分泌刺激となるようなシグナルを増加させることが、このような吸収不良症候群のみならず、腸粘膜バリアの障害にもとづくと考えられる種々の疾患に対する有効な戦略として注目されるようになってきた。

GLP-2分泌は食物の摂取に反応して増加し、ヒトの場合、同じ400kcalの熱量摂取でも脂質では2.7倍、糖質では5.6倍に血中のGLP-2濃度の上昇を惹起すると

される¹⁴⁾。しかしながら、こうした食物のGLP-2分泌効果を、種々の栄養素に分けて系統的にあるいは詳細に比較検討し、分泌刺激のメカニズムについて考察した情報は乏しい。例えば同じ脂肪酸であっても、炭素数の違いにより、短鎖、中鎖、長鎖に分けられ、それぞれ代謝過程や生理作用が全く異なる事が知られる。さらに長鎖脂肪酸は、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸に分かれ、熱源としてだけでなく細胞膜の一部や調節分子の基質として振る舞うことが知られる¹⁵⁾。特にn-3系多価不飽和脂肪酸は抗炎症作用を示し、小腸上皮細胞の再生を促すことが報告されている^{16・17)}。それ故、GLP-2分泌に関する刺激という点に関しても、種々の脂肪酸が異なった分泌効果をもたらす可能性が考えられるが、脂肪酸の組成の相違の観点から詳細に検討した報告は今までにみられない。

さらに興味深いのがGLP-2の分泌刺激として推定される甘味料の効果である。近年、人工甘味料の一種スクラロースがヒト腸管内分泌細胞由来NCI-H716細胞株で甘味受容体を刺激し、GLP-2と同じプログルカゴン由来のペプチドのGLP-1分泌を増加すると報告された^{18・19)}。このスクラロースによるGLP-1分泌刺激の有無は*in vivo*における検討で異なった成績が報告されており結論が得られていないが²⁰⁻²²⁾、GLP-2がGLP-1と同じ生成過程を経る背景を考慮すると、GLP-2分泌もまた甘味受容体に調節される可能性がある。

また、食物中には糖質と脂肪成分が同時に存在することが多いが、糖質の刺激と脂質による刺激が、それぞれ独立してGLP-2分泌に作用しているのか、あるいは両者は共通の経路を介しているかなどのメカニズムに関する知見には乏しい現状である。さらに、糖質と脂質の両者が腸管腔内に存在した場合、それらのGLP-2分泌シグナルに対する影響は増幅されるのか否かなどの点に関しての知見も今まで存在しない。従って、これらの課題を明らかにすることが食用脂質と甘味の刺激によるGLP-2分泌の制御を試みる上で重要な知見となるものと考えられた。

GLP-2 を定量する際、最も大きな課題は血中半減期の短さである。GLP-2 は DPP-IV により NH₂ 末端のヒスチジン・アラニン残基を切断されて不活化する。血中半減期は 7 分とされ²³⁾、それゆえ、管腔内栄養素の GLP-2 分泌に与える影響をより正確に測定するためには、DPP-IV による不活化を回避し、検体中の GLP-2 活性体をより長期間維持できるよう工夫する必要がある。近年、腸リンパ液では GLP-1 の濃度が血中に比して高く保たれることが判明し、生理的な GLP-1 分泌の評価に有用であることが報告された^{24) 25)}が、GLP-2 についてもリンパ検体が血液検体に代わる有効な測定対象となる可能性が考えられる。

そこで本研究では、まずラットリンパ瘻モデルを作成し、回収した腸リンパ液検体で GLP-2 濃度を比較することの妥当性を検討し、続いて、管腔内に投与した脂質、糖質、甘味料の GLP-2 分泌に与える影響を検討することとした。また GLP-2 分泌のメカニズムを、既に GLP-1 研究において頻用されている NCI-H716 細胞株を用いて検討することとした。

第2章 ラットを用いた食用脂質と甘味刺激によるGLP-2分泌の検討

第1節 目的

GLP-2 分泌を制御するシステムが腸管腔内に存在する種々の栄養素を個別に認識し、反応している事が推定される。血中の GLP-2 濃度が脂質と糖質の投与により上昇したのに対し、蛋白質ではその上昇が見られなかった¹⁴⁾という既報から、腸管腔内における三大栄養素のうち、脂質と糖質に絞って検討を行うこととした。短鎖脂肪酸²⁶⁾、中鎖脂肪酸²⁷⁾、乳清²⁸⁾など個々の成分に絞った GLP-2 分泌刺激の報告はあるが、多くの脂質・糖質を比較する事でこの制御システムの実態をより詳細に把握することが期待される。従って、本章においては主に食事に含まれる組成の異なる脂質や糖質を中心に用いてラットの十二指腸から投与し、その後の GLP-2 分泌を比較検討することとした。とくに脂質においては、長鎖脂肪酸が特に腸管の維持修復に寄与する因子として注目されていることから、炭素鎖数とともに飽和度、n-3 系か n-6 系かなどを考慮に入れて、様々な脂肪酸組成を有する脂肪の間で比較した。また糖質に関しては、ブドウ糖や蔗糖ばかりでなく、GLP-1 分泌作用の有無で評価の分かれた甘味料に関しても、数種類のものを投与してその GLP-2 分泌効果について検討することとした。これらの検討により、実際に十二指腸から小腸に食事成分が流入した後に、生体内で GLP-2 分泌がどのようにもたらされるか、その際に強い刺激となる物質は何か、について明らかにできる。この情報は小腸 L 細胞からの GLP-2 分泌刺激のメカニズムを考える上で大変有用なものになると考えられる。

第2節 方法

(1) 実験動物

250g〜300g の雄性の Wistar ラット（静岡県、Japan SLC より購入）を気温 21℃、湿度 55% に設定された室内でケージ飼育した。12 時間毎に照明と消灯を交互に実施し、環境馴化のため 2 週間自由に飲水および飼料を摂取させた後にこれら動物を実験に供した。本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て施行された（承認番号 09088）。

(2) リンパ瘻並びに十二指腸瘻の作成

ペントバルビタール麻酔下、Bollman らの方法²⁹⁾によりラットの乳糜槽付近の胸管へカニューラを挿入した。カニューラには内径 0.55mm、外径 1.00mm のナイロンチューブ（テルモ社製 EPINEED、東京）を選択した。また胃壁に造設した小孔より内径 1mm、外径 2mm のプラスチックチューブ（Nalge Nunc 社製 Nalgene、Rochester、米国）を挿入し、その先端を十二指腸に留置した。術後、ラットは Bollman ケージ内に移し、1 2 時間後から投与実験を開始した。この間、十二指腸へ時間あたり 3ml の割合で生理食塩水を投与しリンパ液の流出による水分の喪失を補充した。尚、血液検体を採取する予定の個体には十二指腸瘻のみを作成した。

(3) 腸リンパ液および血液検体の採取と GLP-2 濃度の測定

GLP-2 は DPP-IV により速やかに不活化されるため、管腔内栄養素の構成の相違による分泌刺激の差をより正確に反映させるには、従来の血液検体に代わる測定法が望まれる。そこで本検討では、ラットリンパ瘻モデルを作成し、経時的に腸管由来のリンパ液を生理的条件下において採取できる条件を整え、管

腔内に投与した脂質、糖質、甘味料の GLP-2 分泌に与える影響を主に回収したリンパ液を用いて検討することとした。

リンパ液の回収は、十二指腸内へ生理食塩水を投与している状態で 2 時間回収し、これを 0 時の検体とした。0 時の検体を回収後、3ml に調整した脂質や糖質あるいは甘味料を十二指腸内へボラスで投与し、投与後 2 時間にわたりリンパ液検体を回収した。対照のラットにおいては、十二指腸瘻のみを作成し血液検体を採取した。すなわち生理食塩水を投与している初期の状態のまま、或いはシソ油を十二指腸内へ 3ml ボラス投与した 2 時間後に、ペントバルビタール麻酔下に心臓血を回収した。腸リンパ液および血液検体には、それぞれ GLP-2 の不活化を抑制するため 0.25mol/l の EDTA、0.80mg/l のアプロチニン、80u/ml のヘパリンを含む溶液を検体容量の 10%の割合で添加し、遠心分離で不純物を除去した後-80℃で冷凍保存した。

矢内原研究所（静岡）より購入した GLP-2 測定キット(ELISA 法)を使用して各検体に含まれる GLP-2 濃度を測定した。

(4) 糖質および甘味料の投与

リンパ瘻並びに十二指腸瘻を造設したラットの十二指腸内に、4 つの異なる濃度（2.5～10%; 138mM～555mM）のブドウ糖液を投与した。また、5%シヨ糖溶液（146.1mM）についても同様の検討を行った。ブドウ糖とシヨ糖は和光純薬工業（大阪）より入手した。また、経時的な糖質による GLP-2 の分泌刺激をみる目的で、5%ブドウ糖液を 3ml 投与し、2 時間毎に得られる各検体中の GLP-2 分泌量を、投与前の 2 時間に得られた GLP-2 分泌量を基準として比較した。

ブドウ糖においては浸透圧が GLP-2 分泌に影響する可能性を考慮する必要が

ある。そこで、ブドウ糖の重合体²⁵⁾であり、ブドウ糖の約 83 倍の分子量を持つデキストリン (Sigma-Aldrich、St.Louis、米国) を用いて 5% 溶液 (推定 3.4mM) および 10% 溶液 (推定 6.8mM) を投与し、ブドウ糖による GLP-2 分泌量と比較した。

また人工甘味料としてスクラロース溶液 (4%:100.6mM)、4% サッカリンナトリウム溶液 (218.4mM)、パルスweet® 溶液を投与した。パルスweet® 溶液 (Ajinomoto 社製、東京) はエリスリトール (98.98%)、アスパルテーム (0.58%)、アセスルファムカリウム (0.25%) 甘味料を含み、100ml につき熱量 5kcal 以下の水溶液製品である。エリスリトールの濃度は 77.7mM と推定され、等量のブドウ糖溶液と比較し約 4.5 倍の甘味を有する。尚、投与した各々の溶液の濃度は購入元の提示した取扱い説明書を参考に人体に影響を及ぼさないとされる範囲で高濃度に設定した。スクラロースは三栄源エフ・エフ・アイ (大阪) より提供を受け、サッカリンナトリウムは大和化成工業 (大阪) より購入した。

(4) 異なる脂肪酸組成による脂質の投与

ラットの十二指腸内に、異なる脂肪酸組成の脂質を投与して、GLP-2 分泌に対する影響を検討した。基礎的な検討として、腸粘膜への保護作用が想定されている n-3 系の長鎖脂肪酸 (linolenic acid) を多く含有するシソ油を主に実験に用いた。すなわち 4 つの異なる量 (0.1 ml・3 ml) のシソ油を生理食塩水にて 3ml に調整した上で十二指腸内に投与した。経時的なシソ油による GLP-2 の分泌刺激の検討では、シソ油を 3ml 投与し、2 時間毎に得られる各検体中の GLP-2 分泌量を、投与前の 2 時間に得られた GLP-2 分泌量を基準として比較した。

その他の脂質としてにしん由来の n-3 系多価不飽和脂肪酸を多く含む魚油、オレイン酸を主成分とするオリーブ油、n-6 系のリノール酸を多く含むヒマワリ油、中鎖脂肪のカプリリン酸で構成されるパナセート®、飽和脂肪酸を多く含有する

バターを用い、十二指腸から 3ml 投与し、投与後 2 時間リンパ検体を回収した。これら脂質に含まれる脂肪酸の構成は表 1 の記載のとおりである。シソ油は太田油脂（愛知）、パナセート®は日本油脂（東京）、バターは雪印メグミルク（北海道）より購入し、その他の脂質は Sigma-Aldrich 社より購入した。

（6）脂質と糖質あるいは甘味料の混合投与による GLP-2 分泌刺激の検討

脂質と糖質の両者が腸管腔内に存在した場合、それらが GLP-2 分泌に対してどのような影響を与えるかについても検討した。この実験では脂肪としてシソ油を用い、十二指腸内にシソ油と 5%ブドウ糖溶液・スクラロース溶液・パルスイト®溶液を計 3ml となるよう混合して投与して、投与後 2 時間にわたりリンパ検体を回収した。混合比率は、シソ油：ブドウ糖溶液またはパルスイト®溶液＝2：1、シソ油：スクラロース溶液＝1：1 とした。

（7）統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。群間差に関する統計解析は Mann-Whitney U test, Wilcoxon t-test, および Bonferroni の補正を加えた Kruskal-Wallis 一元配置分散分析(one-way ANOVA)により検定を行った。統計計算には yStat2004 ならびに Microsoft Office Excel 2007 の両ソフトウェアを使用した。P 値が 0.05 以下を有意と判断した。

第3節 結果

(1) 血中およびリンパ中の GLP-2 濃度の比較

図 4 に生理食塩水投与、およびシソ油投与 2 時間後における腸リンパ液と血液中の GLP-2 濃度を示す。生理食塩水投与後のリンパ中 GLP-2 濃度は血中のそれより有意に高く、リンパで $1.34 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$ 、血漿で $0.54 \pm 0.08 \text{ ng/ml}$ であった。シソ油投与後はリンパ中および血漿中のいずれにおいても有意な GLP-2 濃度の上昇を認めたが、リンパ中で投与後 $4.76 \pm 1.09 \text{ ng/ml}$ と約 3.55 倍、血漿中で投与後 $1.49 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$ と約 2.76 倍とリンパ中の上昇がより強くみられた。

(2) リンパ検体中の GLP-2 濃度と検体量の関連

図 5 にシソ油投与あるいはブドウ糖投与 2 時間におけるリンパ液検体中の GLP-2 濃度とリンパ液量との関連を示す。図 5A にはシソ油投与量別の GLP-2 濃度を、図 5B に時間あたりのリンパ検体量を示す。GLP-2 濃度はシソ油 0.3ml より上昇を認め、3ml を投与した際、生理食塩水を投与した対象群との間に初めて有意差を生じた ($4.41 \pm 0.88 \text{ ng/ml}$, $P < 0.05$)。検体量は全てのシソ油投与量で $2 \sim 2.5 \text{ ml/h}$ とほぼ均一であり、3ml 投与のみ対象群との間に有意差を生じた。これに対し、各種濃度のブドウ糖溶液の投与では 5%溶液の投与で有意に GLP-2 濃度の上昇を認め、7.5%溶液、10%溶液でも同様の反応が認められたが (図 5D)、シソ油投与と異なり投与するブドウ糖液の濃度の上昇に伴って得られる検体量の減少を認め (図 5E)、GLP-2 濃度を y 軸に検体量を x 軸にプロットしたところ、得られた近似曲線の傾きと相関関係の評価から両者に負の相関がある事が示された (図 5F)。従って以後の実験に於いてはリンパ検体量と GLP-2 濃度の積を「分泌量」として定義し、管腔内栄養素の影響を GLP-2 分泌量において比較評価することとした。

(3) 脂質・糖質の用量依存性の検討

図 6A および図 6B にシソ油およびグルコース溶液を投与後 2 時間におけるリンパ中への GLP-2 分泌量を示す。リンパ検体量と GLP-2 濃度の因子の積で定義された「分泌量」を用いて比較したところ、シソ油では明らかな用量依存性が示された。一方、ブドウ糖液では 5~7.5% に GLP-2 分泌量のピークを認め、10% 溶液ではむしろ分泌量は減少する傾向にあり釣り鐘状の分布を示した。これは図 5E に示す如くブドウ糖濃度の上昇に伴うリンパ検体量の減少が原因と考えられ、糖質では脂質にはみられない浸透圧の影響を考慮する必要があると考えられた。

そこで次に、ブドウ糖の重合体であり、同じ濃度パーセンテージでも極めて低い浸透圧を有するデキストリン溶液を用いて、GLP-2 分泌量に及ぼす影響を検討した。図 6C に示す如く 5% デキストリン溶液では 5% ブドウ糖溶液と同等に GLP-2 分泌量が増加し、10% デキストリン溶液では更に顕著な増加を認めた。

(4) 管腔内投与後の GLP-2 分泌の経時変化 (図 7)

前項まで糖質や脂質の投与 2 時間までの GLP-2 のリンパ液中への放出を比較してきたが、図 7 においては糖質や脂質の管腔内投与後の GLP-2 分泌の経時変化を検討した結果を示した。すなわちシソ油 3ml、5% ブドウ糖溶液 3ml、あるいは人工甘味料 4% スクラロース溶液 3ml の投与前から 2 時間毎に 8 時間まで経過を観察した。対照には生理食塩水を 3ml 投与したラットを用いた。シソ油投与後は 2 時間において急激な GLP-2 分泌量の増加を認め、その後 4 時間から 8 時間にかけて緩やかにその増加は減少するものの、8 時間後においてもシソ油投与による GLP-2 分泌量の増加は継続していた。一方、ブドウ糖溶液、スクラロース溶液においては、投与後 2 時間から 4 時間にかけて GLP-2 分泌の増加が

認められたが、6 時間以降にはその刺激効果が消失していた。GLP-2 分泌量は今回検討した 3 種類すべての物質の投与に対して投与後 2 時間に最大分泌量を示す結果となった。観察期間中、生理食塩水による GLP-2 分泌量の増加はみられなかった。

(5) 異なる脂質構成による GLP-2 分泌刺激の相違 (図 8)

シソ油のほかに、種々の脂質構成を有する 5 種類の脂質の投与をおこない、GLP-2 分泌への影響を観察した。投与された脂質の中で、n-3 系多価不飽和脂肪酸を多く含む魚油 (8.81 ± 1.54 ng/h)、オレイン酸を多く含むオリーブ油 (8.80 ± 2.88 ng/h)、カプリリン酸で構成されるパナセート® (5.14 ± 0.51 ng/h)、及びリノレン酸とオレイン酸を多く含むヒマワリ油 (4.99 ± 1.09 ng/h) の投与において、それぞれ GLP-2 分泌量の有意な増加が認められた。また魚油とオリーブ油による分泌量はパナセート®とヒマワリ油よる分泌量を上回った ($P < 0.05$)。主に飽和脂肪酸とオレイン酸を含むバターも GLP-2 の分泌を増加させた (3.92 ± 0.76 ng/h) が、対照群 (1.51 ± 0.45 ng/h) との比較で有意差はみられなかった。

(6) 異なる糖質・甘味料の構成による GLP-2 分泌刺激の相違(図 9)

ブドウ糖やデキストリン溶液のほかに、食事中的糖質として重要なショ糖について、あるいはスクラロースの他の 2 種類の甘味料の投与をおこない、GLP-2 分泌への影響を観察した。糖質および甘味料はそれぞれ十二指腸内に 3ml ボールラス投与した。5 %ショ糖溶液の投与により同濃度の 5%ブドウ糖溶液と同等の GLP-2 分泌量の増加が認められた (5.75 ± 1.73 ng/h)。同濃度の 5%デキストリン溶液 (4.76 ± 0.92 ng/h) よりもやや高い値であったが、有意差は見られなかった。またスクラロース以外に、4 %サッカリンナトリウム溶液とパルスイー

ト®溶液で分泌刺激を検討したところ、後者で GLP-2 分泌の増加を認めた (4.01 ± 0.83 ng/h)。サッカリン溶液のみ、生理食塩水との間に有意差が見られなかった (2.52 ± 0.76 ng/h)。

(7) 脂質と糖質、脂質と甘味料の混合投与による GLP-2 分泌刺激 (図 10)

最後に、十二指腸内にシソ油とブドウ糖溶液あるいは人工甘味料を計 3ml と
なるよう混合して投与し、両者を混合して投与することによるリンパ液中への
GLP-2 分泌への影響について、投与後 2 時間にわたり回収したリンパ液検体で
検討した。シソ油と 5 %ブドウ糖溶液の混合液 (9.28 ± 0.84 ng/h) によってシ
ソ油単体(9.02 ± 1.27 ng/h)と同等の分泌刺激を認めた。また、シソ油と 4 %スク
ラロース溶液との混合液(13.22 ± 1.35 ng/h)は、シソ油単体(9.02 ± 1.27 ng/h)、
スクラロース溶液単体 (6.33 ± 0.56 ng/h) と比して有意に GLP-2 分泌量を増加
させた。さらに、同様の効果がパルスイト®溶液との混合液 (20.02 ± 5.16 ng/h)
でも観察され、シソ油単体、パルスイト®溶液単体 (4.01 ± 0.83 ng/h) より
はるかに顕著な分泌量の増加が観察された。

第4節 考察

GLP-2 濃度をリンパ液中で測定する背景は D'Alessio らの報告²⁴⁾による。彼らはラットのリンパ液中の DPP-IV 活性が血中に比して低い事を発見し、DPP-IV に不活化されるペプチドのリンパ検体による測定法の有用性を報告した。それによれば、同じく DPP-IV により不活化される GLP-1 のリンパ液中濃度が、空腹時で門脈血中濃度の 2.4 倍、栄養素投与後には 5 倍以上に上昇したとされ、本検討においても、シソ油投与の前後において、血中に比してリンパ液中で約 3 倍の高濃度の GLP-2 を検出することができた。本研究では DPP-IV の活性は比較しなかったものの、これらの結果から、リンパ検体中の GLP-2 濃度を測定する事で、管腔内栄養素の GLP-2 分泌に与える影響をより鋭敏に比較できる可能性が示唆された。

管腔内栄養素が GLP-2 分泌に与える影響を比較する際、得られるリンパ流量（＝検体量）が一定ならば GLP-2 濃度を測定する事で十分な検討が行えるはずである。しかし、管腔内栄養素の GLP-1 分泌に与える影響を検討した Lu らの報告では²⁵⁾、脂質・糖質投与 2 時間後まで GLP-1 濃度の上昇が認められたが、以降 6 時間まで経時的に低下したとされる。また投与後に得られたリンパ液検体の量が脂質と糖質で異なる推移を示したため、彼らは GLP-1 濃度と単位時間の検体量の積を「GLP-1 分泌量」と定め、それを比較している。我々の本研究における検討においても、とくにブドウ糖投与においては得られた検体の量と GLP-2 濃度の間に負の相関が存在したため、管腔内栄養素の影響をより正確に反映させるには GLP-2 濃度のみならず検体量を考慮する必要があることが示された。リンパ瘻モデルによる検討では、小腸で産生されたばかりのリンパ液を乳糜槽付近の胸管から採取できる利点を持ち、検体量と GLP-2 濃度の積を「分泌量」と定義して評価する事で、管腔内栄養素の影響をより正確に評価する事

ができたと考えられた。

本研究においてシソ油による GLP-2 分泌の用量依存性が明瞭に示された事は、脂質が GLP-1 分泌を用量依存性に刺激したとする既報と同様である³⁰⁾。一方、ブドウ糖液による糖質の用量依存性の検証では、高濃度のブドウ糖溶液を投与すると分泌量の減少を認め、GLP-2 の分泌の評価が浸透圧により影響を受けた可能性も考えられる。即ち、ブドウ糖の浸透圧により腸リンパ液を構成する水分が管腔側へ引き寄せられリンパ流量が減少した結果、得られる検体量が減っただけでなく、L 細胞から分泌された GLP-2 がカテーテルを留置した胸管まで十分に移動しなかったため、予想された GLP-2 濃度の上昇も観測されなかったのかも知れない。前述のようにデキストリンはブドウ糖の約 83 倍の分子量を持つブドウ糖の重合体であり、浸透圧の影響を大幅に軽減できる糖質として GLP-1 分泌の研究でも用いられている²⁵⁾。我々の成績では、5%ブドウ糖液と等しい重量／容量パーセントの 5%デキストリンがブドウ糖液のおよそ 86 分の 1 の浸透圧でブドウ糖液と同等の GLP-2 分泌刺激を示し、10%濃度（つまり 5%ブドウ糖液の浸透圧の 43 分の 1）ではグルコースの 5 倍の GLP-2 分泌を示していた。確かに、ブドウ糖液において 2.5%濃度と 5%濃度では後者で有意な分泌量の増加を認めており、浸透圧が GLP-2 分泌を誘導する可能性について完全には否定できないものの、デキストリン溶液の結果から糖質による GLP-2 分泌刺激も脂質と同様に主として用量に依存するものと考えられた。

本研究において、主に投与後 2 時間でのリンパ検体を回収して比較した根拠は既報の GLP-1 研究に基づいたものである^{25,30)}。しかし、既報の GLP-1 では、デキストリンおよび脂肪製剤の投与 2 時間後以降分泌量が減少し生理食塩水に対する反応と差が生じなくなったのに対し、本研究で行った経時的解析において、シソ油で 8 時間後まで、ブドウ糖液やスクラロース溶液で 4 時間後まで GLP-2 分泌量の増大が遷延した。この相違は、投与された脂質・糖質の質・量

の違いに起因するものと考えられる。しかし一方、GLP-1 と同様に投与後 2 時間の回収検体において、いずれの管腔内物質刺激によっても GLP-2 分泌量が最大となった事は、投与後 2 時間の検体を用いる妥当性を支持する結果であった。

甘味料による GLP-1 分泌刺激の有無については従来意見が分かれるところであった。すなわちスクラロースの投与はラットにおける *in vivo* 実験で分泌刺激が認められず²²⁾、*in vitro* では分泌刺激が認められた¹⁸⁾として解釈が分かれていた。しかし、分泌刺激を認めないとするラットの GLP-1 の検討においては投与後 10 分に回収された血漿検体による評価で結論付けられており、投与後数時間の GLP-1 の変動は検討されていない。実際、経時的に GLP-2 分泌を追跡した本研究では投与後 2 時間から 4 時間の回収検体において GLP-2 分泌量の増大を認めている。さらにラットで GLP-1 分泌刺激がないと結論された他の甘味料についても、投与後短期間に回収された血漿検体による評価であり、今後 GLP-2 分泌のみならず GLP-1 分泌の増大も実証される可能性があると考えられた。

食用脂質により誘導される GLP-2 分泌はその構成の違いによって影響を受けた。本研究では、n-3 系不飽和多価脂肪酸や一価不飽和脂肪酸を含む脂質が顕著に GLP-2 分泌量を増加する傾向が観察された。対照的に多くの飽和脂肪酸を含むバターでは有意な増加が得られなかった。類似する傾向は同じプログルカゴン由来ペプチド (PGDPs) または GLP-1 においても観察されている^{31, 32)}。Rocca ら³³⁾は 14 以上の炭素鎖を伴う単不飽和 (monounsaturated) 脂肪酸がヒトで PGDPs を増加させたと報告し、一方、Beglinger³⁴⁾もヒトでオリーブ油とオレイン酸ナトリウムが血中 GLP-1 濃度を増加させたと報告している。予想外であったのは、ほぼカプリリン酸 (C8:0) で構成されるパナセートもまた GLP-2 分泌量を増加させた事であり、中鎖脂肪酸もまた GLP-2 分泌の強力な刺激因子である事が示された。また n-3 系不飽和多価脂肪酸や一価不飽和脂肪酸を多く含む脂質が GLP-2 分泌を増大させた事で、これら長鎖不飽和脂肪酸の腸管の維持修

復作用¹⁷⁾の一つに GLP-2 が関連しているメカニズムも存在する可能性も示唆された。

糖質・甘味料の影響は同じモル濃度で比較する方法も選択肢にあった。しかしながら本検討では、日常の摂取量を論じる際にモル濃度よりも重量／容量パーセント濃度が頻用されている事に鑑み、後者を基準として検討した。また甘味料については刺激の有無そのものを検討するため、重量／容量パーセント濃度についても統一はせず、添付文書に基づいて安全に投与できるとされる最大量を以て比較する事とした。

ショ糖はブドウ糖と果糖からなる二糖体であり、腸管内で *sucrase* または *saccharase* により加水分解された後吸収される。一方、デキストリンはブドウ糖の重合体であり、*amylase* により麦芽糖に分解された後、更に *maltase* によりブドウ糖へ分解される。5%の重量／容量パーセント濃度でブドウ糖、ショ糖、デキストリンのモル濃度は各々276 mM、146.1mM、6.8mM（推定）と著しく異なるが、3者で近似した分泌量が測定されたことは、いずれの糖質であっても同じ質量を投与すれば、投与後 2 時間の消化吸収の過程を経て、最終的にはブドウ糖と同じ刺激が得られる可能性を示している。一方、甘味料はその組成の違いによって分泌刺激に差を認め、サッカリンナトリウム溶液では分泌量の増大が認められなかった。モル濃度で比較するならば、サッカリンナトリウム溶液の濃度は 277.5mM とスクラロース溶液 (100.6mM)、パルスweet溶液 (エリスリトール換算で 77.7mM) に比して明らかに大きく、濃度の大小では説明がつかない。それゆえ甘味料では組成の違いにより分泌刺激に差を生じることが示唆された。

シソ油 2ml と 5%ブドウ糖液 1ml の混合投与によってシソ油 3ml 単体とほぼ同様の分泌量を得た事は、熱量がシソ油単体の約 3 分の 2 にも関わらず同等の分泌量を得たことを意味する。勿論この結果だけでは、実はシソ油 2ml で分泌

量が最大量に達しており、3ml 単体投与との間に差が生じなかった可能性も否定できないのかもしれない。しかし、その他に使用した 2 種類の甘味料との混合でシソ油 3ml 以上の分泌量を得た事は、明らかに熱量を有しない甘味料の寄与に由来するものであり、GLP-1 と同様に^{25、35)}「相加・相乗効果」と呼ばれる現象が存在する可能性があると考えられた。

第5節 小括

ラットのリンパ検体を用いて、管腔内栄養素が GLP-2 分泌に与える影響を比較した。リンパ検体は GLP-2 濃度が血中より高く、GLP-2 分泌をより鋭敏に反映していると考えられた。しかし、GLP-2 濃度とリンパ検体量の間に負の相関が認められる場合があり、濃度と検体量の積を時間当たりの「分泌量」と定義し評価材料とした。

脂質・糖質の投与により、用量依存性・濃度依存性に GLP-2 を惹起することが示されたが糖質では高濃度で低下する可能性も示された。いずれにせよ、脂質・糖質ともに投与 2 時後の検体で GLP-2 分泌量の最大値を得た。

各々数種類の異なる脂質・糖質・甘味料で GLP-2 分泌量を評価した。脂質では n-3 系多価不飽和脂肪酸、オレイン酸、中鎖脂肪酸カプリリン酸を多く含む脂質で顕著な分泌の増大が認められたが、飽和脂肪酸を多く含む脂質では有意な増大が見られなかった。また糖質ではいずれも GLP-2 分泌刺激に類似性を認めたが、甘味料では組成の違いによって分泌刺激に顕著な差を生じた。

脂質と糖質、脂質と甘味料を混合投与したところ、双方ともその熱量から推定される以上の分泌量を観測し、「相加・相乗効果」と呼びうる現象が起こる可能性が考えられた。

第3章 ヒト腸管内分泌細胞由来NCI-H716細胞株によるGLP-2分泌への甘味受容体の関与の検討

第1節 目的

前章までの検討で、①脂質・糖質が用量依存性に GLP-2 分泌を刺激する、② GLP-2 分泌を刺激する甘味料が存在する、③脂質と糖質・脂質と甘味料の組み合わせで GLP-2 分泌の「相加・相乗効果」が認められる事を示唆したが、背景にある刺激メカニズムをラットモデルにおいて検討することには限界がある。

GLP-1 と GLP-2 は同じ小腸の L 細胞から分泌されるが、この細胞の単離・培養は困難であり、GLP-1 研究では数種類の細胞株が実験モデルとして提案されている。ヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株は、ヒト虫垂の低分化管状腺癌に由来し¹⁹⁾、これまで脂肪酸受容体 (GPR119、GPR120) を介した脂質投与による GLP-1 分泌刺激³⁶⁾や、甘味受容体 (T1R3) を介した糖質・甘味料による GLP-1 分泌刺激¹⁸⁾の研究材料として報告されてきた。しかしながら、この細胞による GLP-2 分泌刺激についての検証はなく、また GLP-1 についても前章で示したような「相加・相乗効果」については検討されていない。

脂肪酸受容体を介した刺激は投与された脂肪酸の濃度、すなわち熱量に依存するが、甘味受容体を介した甘味刺激は必ずしも熱量に依存しない。そこで「相加・相乗効果」が熱量非依存性であった事に鑑み、この細胞株を用いて、GLP-2 分泌への甘味受容体の関与の有無と、脂肪および糖質の管腔内刺激による GLP-2 分泌に対する「相加・相乗効果」のメカニズムについて検討を行った。

第2節 方法

(1) 脂肪酸・糖質・甘味料の添加による GLP-2 分泌試験

ヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株(American Type Culture Collection、Manassas、米国)を購入し、5%ウシ胎児血清、100IU/ml ペニシリン、および 100g/ml ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培養液中で培養した。次に、浮遊する一定量の細胞を培養液とともに取り出し、poly-L-lysine でコーティングされた 96 ウェルプレートに 1×10^5 個/ウェルの割合で細胞を播種し、プレート上で更に 48 時間培養した。各ウェル内の培養液を 50 μ l の HEPES 溶液で 1 時間置換した後、この HEPES 溶液を取り除き、各種の脂肪酸・糖質・甘味料溶液 50 μ l を各ウェルに添加して 1 時間反応させた。脂肪酸・糖質・甘味料成分としては、 α リノレン酸 (10-100 μ M)、ブドウ糖溶液 (10-100 μ M)、スクラロース溶液 (10-100 μ M)、パルスイト®溶液(0.001-0.04%)、およびエリスリトール溶液(30-300 μ M)を使用した。一部の検体ではラクチゾール溶液 (50 μ M-3 mM) を用いて、それぞれを単独添加もしくは共添加した。 α リノレン酸はシソ油の主成分であり、ラクチゾールとは甘味受容体 T1R3 の拮抗阻害剤である³⁷⁾。その後、ウェル内の上澄みを回収し、それぞれの検体に GLP-2 の不活化を抑制するため *in vivo* で使用されたものと同様の蛋白分解酵素阻害薬を 50 μ M 添加した。エリスリトールは三菱化学フーズ(東京)より提供を受け、 α リノレン酸、ラクチゾールは Sigma-Aldrich 社より購入した。

前章と同様に矢内原研究所製のキット(ELISA 法)を用いて各検体に含まれる GLP-2 濃度を測定し、HEPES 溶液で得られた濃度を対照とした際の相対値で各々の試薬による分泌刺激を評価した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、群間差に関する統計解析は Bonferroni の補正を加えた Kruskal-Wallis 一元配置分散分析(one-way ANOVA)により検定を行い、P 値が 0.05 以下を有意と判断した。

(2) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
試験

各ウェルの生細胞数の違いによって GLP-2 分泌刺激の評価が修飾されていないかを確認するため、MTT cell growth assay kit (Chemicon International, Temecula, 米国) を使用し、各種の脂肪酸・糖質・甘味料溶液添加後の細胞 viability を評価した。測定方法は取扱い説明書に従ったが、この kit では 570 nm および 630 nm の 2 波長を照射した際の吸光度が細胞の viability と正の相関を示すとされる。結果は HEPES 溶液添加後の viability を 100 として相対化し、平均値±標準誤差で表記した。群間差に関する統計解析は Bonferroni の補正を加えた Kruskal-Wallis 一元配置分散分析(one-way ANOVA)により検定を行い、P 値が 0.05 以下を有意と判断した。

第3節 結果

(1) 脂肪酸・糖質・甘味料による GLP-2 分泌刺激

ヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株にシソ油の主要な成分である α リノレン酸と、ブドウ糖液、スクラロース溶液を添加した際の GLP-2 分泌量を図 11A に示す。添加前を基準とした場合、各成分 $50 \mu\text{M}$ の添加で得られた GLP-2 濃度の相対値は、 α リノレン酸 1.56 ± 0.05 、ブドウ糖液 1.50 ± 0.05 、スクラロース溶液 1.31 ± 0.05 と、3 者いずれも濃度依存性に GLP-2 分泌を増加させた。しかし、それぞれ $50 \mu\text{M}$ と $100 \mu\text{M}$ との間に差は認められなかった (図省略)。また、これらの試料の中でブドウ糖溶液、スクラロース溶液による GLP-2 分泌量の増加は $500 \mu\text{M}$ の甘味受容体 T1R3 の拮抗阻害剤ラクチゾールの添加によって阻害された。一方、 α リノレン酸だけはラクチゾールの添加による影響を受けなかった。

ラクチゾールの添加による GLP-2 分泌阻害はパルスweet®溶液及びその主成分であるエリスリトール溶液を用いた場合においても認められ、図 11B の如く、 0.04% パルスweet®溶液 (推定エリスリトール $30 \mu\text{M}$ 相当)、 $300 \mu\text{M}$ エリスリトール溶液で得られた GLP-2 分泌の増大 (各々 1.26 ± 0.05 、 1.48 ± 0.03) が 3mM のラクチゾールによってコントロールと同じ水準まで低下した。またラクチゾール単独による影響をブドウ糖液やスクラロース溶液の刺激を阻害した $500 \mu\text{M}$ までの濃度で検討したが、コントロールとの間に差は見られなかった (図 11C)。

(2) 試薬添加後の細胞 viability

図 12 に MTT 試験で得られた吸光度の相対値を示す。ラクチゾールは $500 \mu\text{M}$ までの濃度でコントロールとの間に差を認めず、単独では細胞の viability に影

響を与えない事が示された。 α リノレン酸とスクラロース溶液も、単独またはラクチゾールの添加によって細胞の **viability** に変化は認めなかった。ブドウ糖液、パルスイト®溶液、エリスリトール溶液では高濃度のラクチゾール添加によってコントロールよりむしろ高い細胞 **viability** が得られる結果となり、いずれの脂肪酸・糖質・甘味料の投与によっても細胞傷害が生じることは無いことが示された。

(3) 脂肪酸と糖質・甘味料の共添加による GLP-2 分泌刺激

α リノレン酸とブドウ糖液・スクラロース溶液の共添加による GLP-2 分泌を図 13 に示す。50 μ Mの α リノレン酸の添加によってブドウ糖液・スクラロース溶液単体の投与に比較して有意に GLP-2 分泌の増大が認められた (図 13A)。パルスイト®溶液でも同様の現象が認められ、 α リノレン酸の添加によって GLP-2 分泌がさらに増大した (図 13B)。一方、同濃度の 50 μ Mのラクチゾールが加わると、 α リノレン酸とブドウ糖液・スクラロース溶液の共添加による GLP-2 分泌は、 α リノレン酸の存在にもかかわらず糖質・甘味料単体の水準にまで分泌量が減少した (図 13A)。パルスイト®溶液でも同様の結果が認められ、 α リノレン酸とパルスイト®溶液の共添加による GLP-2 分泌は、ラクチゾールが加わることによりパルスイト®溶液単体と同程度のレベルまで分泌量が低下した (図 13B)。

第4節 考察

細胞を用いた検討においても、投与した α リノレン酸・ブドウ糖液のいずれも一定の濃度範囲において濃度依存性に GLP-2 分泌を増加させたことから、*in vivo* と同様な分泌刺激の伝達経路の存在が示唆された。脂肪酸とブドウ糖液の刺激経路が重なる可能性があるため双方にラクチゾールを添加したところ、ブドウ糖溶液による GLP-2 分泌量の増加が阻害されたのに対して、 α リノレン酸による GLP-2 分泌刺激はラクチゾールの影響を受けず、脂肪酸とブドウ糖液の伝達経路が別個であることが示唆された。また、熱量を持たないスクラロース溶液の添加によってもブドウ糖液と同等の結果を得たことは、甘味受容体の GLP-1 分泌への関与を示した既報の結果に一致し¹⁸⁾、甘味受容体が人工甘味料スクラロースの GLP-2 分泌にも大きく関与している事が明らかとされた。一方、本研究の *in vivo* 実験において投与後の GLP-2 分泌増加を認めたパルスイト®溶液については参照する既報がなく、10 万分の 1 希釈から濃度を漸増したところ 0.04% でコントロールとの間に有意差を得た。これはエリスリトールならば 30 μ M に推定される濃度であったが、エリスリトール溶液では実際には 300 μ M まで明らかな分泌増大はなかった。この差は甘味受容体のアゴニストとしての力価が異なることが考えられたが、微量ながらパルスイト®溶液に含まれるアスパルテーム、アセスルファムカリウムなど他の甘味料の影響による可能性も考えられた。また、エリスリトール溶液による刺激が、約 10 倍の濃度のラクチゾールで阻害されたことはブドウ糖液、スクラロース溶液の結果に一致し、甘味料エリスリトールもまたこの受容体を介して GLP-2 分泌を刺激する可能性が示唆された。

ラクチゾールによる阻害実験における GLP-2 分泌の減少の原因が、細胞死による分泌細胞数の減少である懸念があったため次に MTT 試験を行ったところ、

ラクチゾール単体ではコントロールとの間に差はなく、GLP-2 分泌が著しく減少したブドウ糖液、パルスイト®溶液、エリスリトール溶液ではむしろ高濃度のラクチゾールの添加によって細胞の **viability** が増加した。有意差は無かったがスクラロース溶液でもラクチゾールの添加により **viability** が増加する傾向を認め、ラクチゾール添加による甘味刺激物由来の GLP-2 分泌の減少は、細胞 **viability** の低下によるものではなく、個々の細胞における甘味受容体を介するシグナルの阻害自体による可能性が示唆された。

また、ブドウ糖単独或いは α リノレン酸による最大刺激効果は $50 \mu\text{M}$ でピークを迎えており、両者の共添加で GLP-2 分泌が更に増加したことは、甘味刺激とは別経路による脂肪酸刺激の上乗せ効果と呼びうる所見と考えられた。更に α リノレン酸と甘味刺激物を共添加したものにラクチゾールを加えたところ、 α リノレン酸が存在するにも関わらず GLP-2 分泌が顕著に減少したことから、共添加による GLP-2 分泌刺激が脂肪酸刺激を介する経路よりも甘味刺激を介する経路により大きく依存している可能性が示唆されているのではないかと考えられた。

第5節 小活

NCI-H716 細胞株を用いて、GLP-2 分泌への甘味受容体の関与と「相加・相乗効果」のメカニズムについて検討を行った。(1) 甘味受容体の関与が示唆されたのみならず、(2) 甘味刺激とは異なる脂肪酸刺激を伝える伝達経路が存在すること、(3) 脂質と糖質・脂質と甘味料の共添加による「相加・相乗効果」がみられ、そのメカニズムが甘味受容体を介する経路に大きく依存している可能性が示唆された。

第4章 統括的考察

本研究では脂質・糖質・甘味料による GLP-2 分泌刺激の影響を、ラットリンパ瘻モデルから得られたリンパ検体とヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株を用いて検討した。GLP-2 分泌は管腔内栄養素により刺激され、それら栄養素の一部、例えば短鎖脂肪酸²⁶⁾や乳清²⁸⁾などは既に小腸の成長や切除後の機能適応を調節するものとして知られている。しかしながら、GLP-1 と比較して GLP-2 分泌に関するメカニズムは未だ示されていない。理論的には、GLP-2 はプログルカゴンより prohormone convertase 1/3 の作用を受けて^{38,39)}、GLP-1 と等しい割合で共分泌される事になっているが、いくつかの *in vivo* 試験で GLP-1 と GLP-2 分泌の相違が報告されている^{1,28)}。この相違の原因の一つはプロテアーゼ DPP-IV に対する反応性の違いであると想定され、これによって両者の半減期に差が生じたものと考えられる¹⁾。このように GLP-1 と GLP-2 が異なる代謝動態を示すため³⁹⁾、管腔内栄養素の刺激による両者の共分泌は十分には実証されておらず、それ故、GLP-2 の分泌メカニズムに焦点を当てる事が重要と考えられた。

本研究は管腔内容物、とりわけ長鎖脂肪酸と人工甘味料による GLP-2 分泌への影響をラットのリンパ検体およびヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株を用いて実証した最初の報告である。リンパ検体を用いた評価では、ヒトで糖質の投与 45 分後に血中 GLP-2 濃度がピークに達したという報告⁴⁰⁾や、ラットでリンパ中の GLP-1 濃度が投与 60 分後にピークに達したという報告²⁵⁾があり、回収期間を短縮し、かつ、連続的に得られた GLP-2 分泌量の総和で管腔内容物の分泌刺激に与える影響を評価する方法も検討したが、①このラットの実験モデルで安定した検体量を得るには最低 2 時間必要であること、②投与 8 時間後までの 2 時間おきの検討で、GLP-2 分泌量のピークが投与後最初の 2 時間に得

られた検体に認められていること、からこの「最初の 2 時間に得られる検体中の GLP-2 分泌量」が栄養素の違いによる分泌刺激の差を評価する上で一つの指標になるものと考えられた。また、本研究では *in vivo* 試験において GLP-2 分泌刺激に関する管腔内栄養素の用量依存性が観察されたが、これは正確に単位時間あたりの GLP-2 分泌を GLP-2 濃度とリンパ検体量から計算できた結果であると考えられる。

食用脂質により誘導される GLP-2 分泌はその構成脂質の違いによって異なった影響を受けた。本研究では、脂質に含まれる脂肪酸が GLP-2 分泌の刺激する際のメカニズムを十分に検討できていないが、複数の報告から標的細胞上の脂肪酸受容体の GLP-2 分泌への関与が示唆される。Hirasawa ら³⁴⁾は G 蛋白結合受容体の一種、即ち長鎖脂肪酸と結合する GPR120 が、 α リノレン酸による GLP-1 分泌を調節している事を初めて発見した。GPR120 を介した GLP-1 分泌がカルシウム依存性伝達経路により調節されている事が STC-1 細胞、NCI-H716 細胞¹⁹⁾で確認されおり、GLP-2 についても同様に脂肪酸受容体の関与が示唆される。Gpr120 mRNA はラットの小腸やヒトに豊富に発現している。加えて、Lauffer ら³⁶⁾は NCI-H716 細胞に GPR120 のほか GPR40 や GPR119 が発現している事を実証した。これらの受容体は長鎖脂肪酸と結合する受容体であり、ラットの小腸にもその発現が観察されている^{41, 42)}。GPR120 と GPR40 は中鎖脂肪酸によっても活性化される^{43, 44)}。

本研究では、甘味料の GLP-2 分泌への役割も示された。スクラロースとパルスweet®は *in vivo* 試験、*in vitro* 試験の双方で GLP-2 分泌を増加させた。スクラロースはラットへの投与実験で投与 10 分以内に GLP-1 分泌を増加させなかったと報告されている²²⁾。これらの反応の相違はカロリー依存性の経路とカロリー非依存性の経路が存在し、それによって効果発現に時間差が生じた可能性が考えられる。即ち、GLP-1・GLP-2 の両者について、カロリーを有さない

甘味料刺激の伝達速度がカロリーを有する糖質など栄養素刺激の伝達より遅く、投与から検体回収までの時間が短いと前者による GLP-2 分泌を拾い上げられないという可能性である。この説明は、GLUTag 細胞にスクラロースと共に 1 時間培養した際 GLP-1 が増加したという報告⁴⁵⁾にも一致する。仮に長時間小腸に留まるよう調整できるのならば、ある種の甘味料はブドウ糖の代わりに GLP-2 分泌を誘導させる代替物になりうる可能性がある。また、NCI-H716 細胞株で甘味刺激物に誘導された GLP-2 分泌がラクチゾールに阻害されたことからこれらの甘味刺激が甘味受容体 T1R3 のシグナルを介している事が示唆された。本来、糖質や人工甘味料による GLP-2 分泌刺激を *in vivo* のモデルにおいても再現できれば、T1R3 のシグナルの関与をより明確に示すことが出来たかも知れない。しかしながら、霊長類とは異なる膜受容体の構造からラットなど齧歯類の甘味受容体はラクチゾールによる阻害効果を受けないとされ³⁷⁾、本検討でのラットへの投与は実施しなかった。齧歯類の GLP への甘味受容体の検討については、現在、マウスノックアウトモデルによる研究⁴⁶⁾が報告されており、将来このようなマウスモデルを用いての検討が必要となるであろう。

一方今回の成績で、甘味度⁴⁷⁾と GLP-2 分泌への影響は殆ど関連が見られなかった。スクラロースはショ糖の 600 倍、ブドウ糖の 750 倍の甘味を有するとされる⁴⁸⁾。しかし、NCI-H716 細胞株でブドウ糖とスクラロースが用量依存的に GLP-1 を増加させたとする Jang らの報告¹⁸⁾と同様に、*in vitro* 試験で、ブドウ糖溶液と等濃度のスクラロース溶液はブドウ糖溶液以上に GLP-2 分泌を増加させなかった。更に *in vivo* 試験においても 4%スクラロース溶液に誘導された GLP-2 分泌量は 5%ブドウ糖溶液による分泌量を上回らなかった。

シソ油とブドウ糖、またはシソ油と甘味料の混合投与によって、シソ油単体よりカロリーが低いにも関わらずシソ油単体と同等、或いはシソ油単体以上に GLP-2 分泌量が増加した知見は興味深い。即ち、シソ油 2ml と 5%ブドウ糖溶

液 1ml の混合液に含まれるカロリーが、シソ油 3ml の 3 分の 2 に過ぎないにも関わらず、この混合液がシソ油 3ml と同等に GLP-2 の分泌量を増加させたという事である。これは、脂質と糖質の混合投与が等カロリーの脂質単体より GLP-1 分泌を増加させたとする先般の報告^{25, 35)}に一致する。加えて、本研究ではスクラロースやパルスイト®との混合投与がシソ油単体より有意に GLP-2 分泌量を増加させ、これらの結果から甘味刺激に反応する受容体が、脂質に反応する他の受容体に対し「相加的」或いは「相乗的」に作用している可能性が示唆された。この作用は NCI-H716 細胞株でも α リノレン酸と甘味刺激物の共添加で再現された。特筆すべきは、この共添加の刺激がラクチゾールによってほぼ完全に無効化された事である。*in vivo* 試験で得られた結果も踏まえると、甘味受容体を介する伝達経路が α リノレン酸による GLP-2 の刺激伝達経路を修飾し、これを増強または減弱させる事が推定された。

GLP-2 分泌に関連する系統的な報告はいまだ少なく、脂肪酸や甘味刺激以外の調節因子の検討や、期待される薬理学的有効性を得るための GLP-2 分泌量の指標の設定など、引き続き多くの課題が残るが、本研究は日常摂取する食餌の成分によって計画的に内因性の GLP-2 分泌を制御し、GLP-2 を介した小腸機能の改善を図る試みに、臨床的に重要な情報を与えたものと考えられた。

第5章 結論

1. ラットリンパ検体を用いた GLP-2 分泌量の検討から、脂質・糖質による用量依存的な GLP-2 分泌が示唆された。また脂質と甘味料では成分の違いが GLP-2 分泌刺激に影響を及ぼす一方、糖質では同じ用量であれば成分に左右されない可能性があることが示唆された。
2. ヒト腸管内分泌細胞由来 NCI-H716 細胞株の検討から、甘味受容体が介在し、これが脂質による分泌刺激とは異なる経路を介して糖質や甘味料による GLP-2 分泌をもたらす事が示唆された。
3. ラットリンパ検体および NCI-H716 細胞株の両方で脂質と糖質・脂質と甘味料の混合投与による GLP-2 分泌の「相加・相乗効果」を認めた。NCI-H716 細胞株では甘味受容体の阻害によって共添加による刺激が著しく阻害されたことから、甘味受容体が、糖質のみならず GLP-2 分泌の脂質による GLP-2 分泌刺激を修飾している可能性が示唆された

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座 穂苅量太教授 および防衛医科大学校長 三浦総一郎博士に衷心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

また本研究の一部は防衛医科大学校振興会および厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝いたします。

本研究の主旨は第 41 回日本消化吸収学会総会（2010 年 10 月、横浜）、米国消化器病学会（2010 年 5 月、ニューオーリンズ）、同じく（2011 年 5 月、シカゴ）、同じく（2012 年 5 月、サンディエゴ）において発表した。

引用文献

1. Drucker DJ. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology*. 2001; 142(2): 521-7.
2. Drucker DJ. Glucagon-like peptide-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(4): 1759-64.
3. 佐藤伸悟, 三浦総一郎. Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) と小腸の消化・吸収日消誌. 2011; 108: 564-57.
4. Guan X, Karpen HE, Stephens J, Bukowski JT, Niu S, Zhang G, *et al*. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology*. 2006; 130(3): 1019-21.
5. Ørskov C, Hartmann B, Poulsen SS, Thulesen J, Hare KJ, Holst JJ. GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept*. 2005; 124(1-3): 105-12.
6. Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 7911-7916.
7. Dube PE, Brubaker PL. Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293: E460-E465.
8. Kouris GJ, Liu Q, Rossi H, Djuricin G, Gattuso P, Nathan C, *et al*. The effect of glucagon-like peptide 2 on intestinal permeability and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis. *Am J Surg*. 2001; 181: 571-575.

9. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, *et al*. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009; 58: 1091-1103.
10. Wallis K, Walters JR, Gabe S. Short bowel syndrome: the role of GLP-2 on improving outcome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009; 12(5):526-32.
11. Buchanan AL, Katz S, Fang JC, Bernstein CN, Abou-Assi SG; Teduglutide Study Group. Teduglutide, a novel mucosally active analog of glucagon-like peptide-2 (GLP-2) for the treatment of moderate to severe Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16: 962-973.
12. DiBaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA. Intestinal rehabilitation and the short bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99: 1386-1395.
13. Yazbeck R, Abbott CA, Howarth GS. The use of GLP-2 related growth factors in intestinal diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010; 11:440-446.
14. Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ, Brubaker PL. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide-2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology*. 1999; 117: 99-105.
15. Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R, Ishii H. Modulation of intestinal immune system by dietary fat intake: relevance to Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13: 1183-1190.

16. Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1557-1560.
17. Ruthig DJ, Meckling-Gill KA. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Nutr.* 1999; 129: 1791-1798.
18. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, *et al.* Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 15069-15074.
19. Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Metral V, Ruegg UT, Mace K. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology.* 2001; 142: 4522-4528.
20. Brown RJ, Walter M, Rother KI. Ingestion of diet soda before a glucose load augments glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes Care.* 2009; 32: 2184-2186.
21. Ford HE, Peters V, Martin NM, Ghatei MA, Frost GS, Bloom SR. Effects of oral ingestion of sucralose on gut hormone response and appetite in healthy normal-weight subjects. *Eur J Clin Nutr.* 2011; 65: 508-513.
22. Fujita Y, Wideman RD, Speck M, Asadi A, King DS, Webber TD, *et al.* Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E473-E479.
23. Hartmann B, Harr MB, Jeppesen PB, Wojdemann M, Deacon CF, Mortensen PB, *et al.* In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 2884-2888.

24. D'Alessio D, Lu W, Sun W, Zheng S, Yang Q, Seeley R, *et al.* Fasting and postprandial concentrations of GLP-1 in intestinal lymph and portal plasma: evidence for selective release of GLP-1 in the lymph system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: 2163-2169.
25. Lu WJ, Yang Q, Sun W, Woods SC, D'Alessio D, Tso P. The regulation of the lymphatic secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by intestinal absorption of fat and carbohydrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G963-G971.
26. Tappenden A, Albin M, Bartholome AL, Mangian HF. Glucagon-like peptide-2 and acids: a short-chain fatty acids: a new twist to an old story. *J Nutr.* 2003; 133: 3717-3720.
27. Feltrin KL, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR, Meyer JH, Horowitz M, *et al.* Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides.* 2000; 27: 1638-1643.
28. Izumi H, Ishizuka S, Inafune A, Hira T, Ozawa K, Shimizu T, *et al.* alpha-Lactalbumin hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-2 secretion and small intestinal growth in suckling rats. *J Nutr.* 2009; 139: 1322-1327.
29. Bollman JL, Cain JC, Grindlay JH. Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct of the rat. *J Lab Clin Med.* 1948; 33: 1349-1352.
30. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297: 299-305.

31. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, *et al*. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005; 11: 90-94.
32. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, Whiteside CI, Brubaker PL. Protein kinase C ζ is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*. 2007; 148: 1089-1098.
33. Rocca AS, Brubaker PL. Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon-derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology*. 1995; 136: 5593-5599.
34. Beglinger S, Drewe J, Schirra J, Göke B, D'Amato M, Beglinger C. Role of fat hydrolysis in regulating glucagon-like Peptide-1 secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 879-886..
35. Kindel TL, Yang Q, Yoder SM, Tso P. Nutrient-driven incretin secretion into intestinal lymph is different between diabetic Goto-Kakizaki rats and Wistar rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296:168-174.
36. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009; 58: 1058-66.
37. Jiang P, Cui M, Zhao B, Liu Z, Snyder LA, Benard LM, *et al*. Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem*. 2005; 280(15):15238-46.
38. Dhanvantari S, Seidah NG, Brubaker PL. Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucago. *Mol Endocrinol*. 1996; 10: 342-55.

39. Orskov C, Holst JJ. Radio-immunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2 (GLP-1 and GLP-2). *Scand J Clin Lab Invest.* 1987; 47: 165-74.
40. Xiao Q, Boushey RP, Cino M, Drucker DJ, Brubaker PL. Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278: 1057-1063.
41. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fuihi R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 2003; 422: 173-176.
42. Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008; 377: 515-522.
43. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes.* 2008; 57: 2280-2287.
44. Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorate insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32: 543-50.
45. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 15075-15080.

46. Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF. T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1170:91-4.
47. Schiffman SS, Sattely-Miller EA, Graham BG, Bennett JL, Booth BJ, Desai N, *et al.* Effect of temperature, pH, and ions on sweet taste. *Physiol Behav.* 2000; 68: 469-481.
48. Knight I. The development and applications of sucralose, a new high-intensity sweetener. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994; 72: 435-439.
49. Sato S, Hokari R, Kurihara C, Sato H, Narimatsu K, Hozumi H, *et al.* Dietary lipids and sweeteners regulate glucagon-like peptide-2 secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013; 304: G708-G714.

図 表

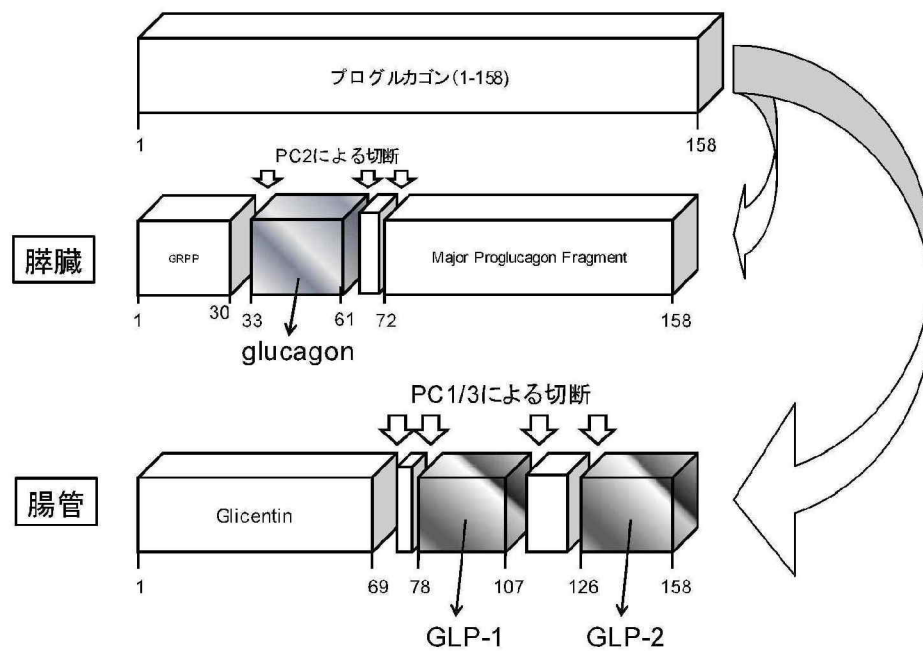


図1. プログルカゴンに由来する GLP-2 (2、3 より改変)

GLP-2 は主に小腸粘膜に局在する腸管内分泌細胞 (L 細胞) 内に発現したプログルカゴンが prohormone convertase1/3 により切断される際、GLP-1 や glicentin と共にその活性体(GLP-2¹⁻³³)を生じる。一方、膵臓に発現したプログルカゴンは glucagon へ切断される。

PC; prohormone convertase,

GRPP; glicentin-related pancreatic polypeptide

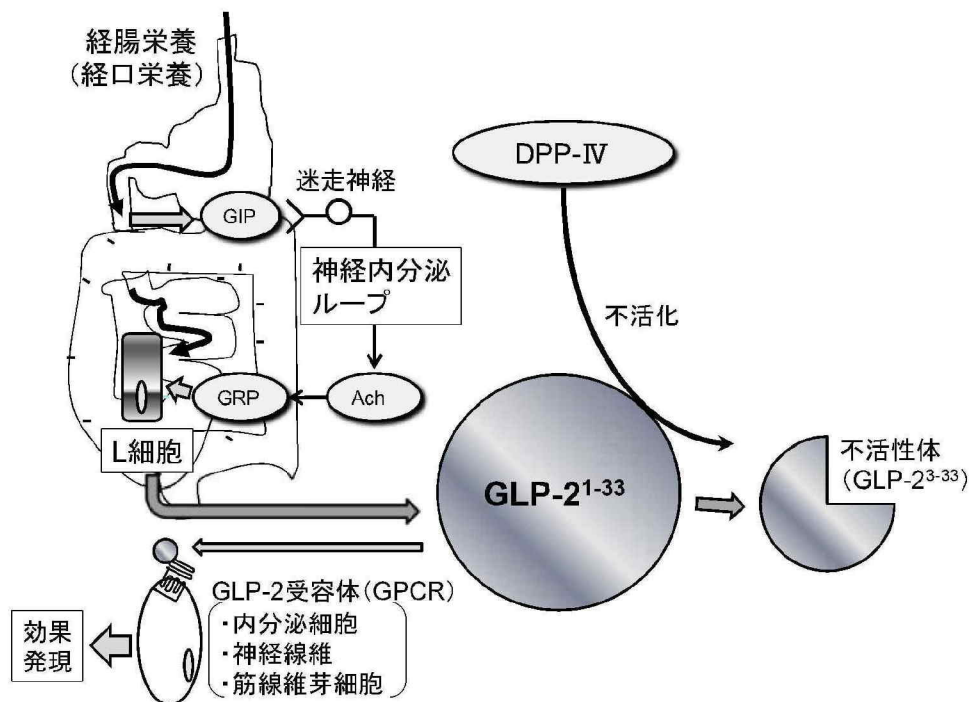


図 2. GLP-2 の生成と分泌(3 より改変)

L 細胞からの分泌は、腸管管腔内の栄養素による直接的な刺激のほか、「神経内分泌ループ」と呼びうる伝達系を介した間接的な刺激に反応して起ることが想定されている。分泌された活性体は、近位小腸を中心に内分泌細胞、小腸神経線維、或いは上皮下筋線維芽細胞上に発現する GLP-2 受容体に結合することにより様々な生理活性を示し、やがて血管内皮細胞などに存在する酵素 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV)により不活化される。

GIP ; glucose-dependent insulintropic peptide

Ach ; acetylcholine, GRP ; gastrin-releasing peptide

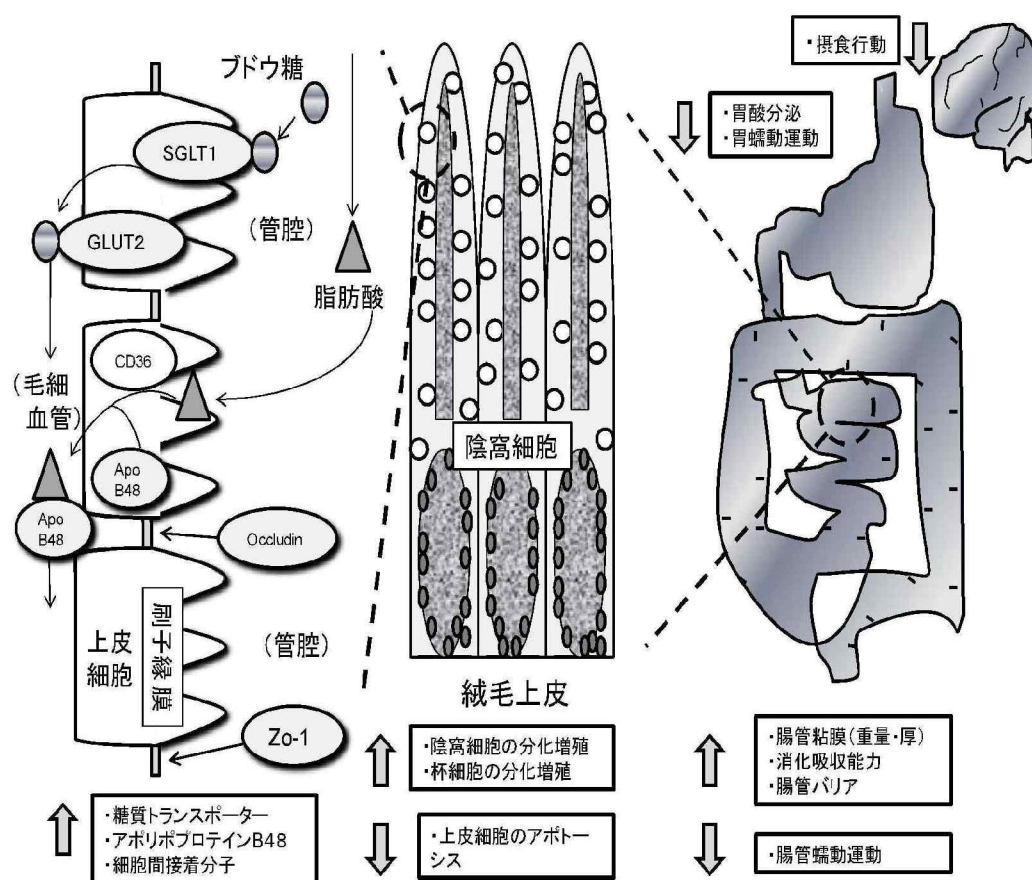


図 3. GLP-2 の生理作用(3 より改変)

GLP-2 は、腸管粘膜の増加、消化吸収能力の充進、腸管バリア機能（細胞間結合）の維持、消化管蠕動運動の抑制、摂食抑制に作用し、小腸の形態・消化吸収の恒常性の維持に寄与する。図の左から右にかけて上皮細胞→絨毛上皮→腸管の順にシェーマを提示した。

SGLT : sodium glucose transporter (Na^+ 依存性糖輸送体)

GLUT ; glucose transporter (糖輸送体),

ApoB48 ; apolipoprotein B48 (アポリポ蛋白 B48).

脂肪酸		シソ油	魚油	オリーブ油	パナセート	バター	ヒマワリ油
ブタン酸	(4:0)					4.3	
カプロン酸	(6:0)					2.7	
カプリリン酸	(8:0)				99.1	1.6	
カプリン酸	(10:0)					3.4	
ラウリン酸	(12:0)					3.4	
ミリスチン酸	(14:0)		9.3	0.6		10.0	
パルミチン酸	(16:0)	7	25.1	13.2		29.2	4.5
ステアリン酸	(18:0)	2.1	4.4	2.8		13.4	3.5
パルミトレイン酸	(16:1)		14.9			1.2	
オレイン酸	(18:1)	13.2	13.9	74.5		26.4	26.3
リノール酸	(18:2)	14.1	2.4			3.6	63.2
リノレン酸	(18:3)	62.5	1.2	8.5		0.4	
エイコサペンタエン酸	(20:5)		16.6				
ドコサヘキサエン酸	(22:6)		9.8				
その他		1.1	2.4	0.4	0.9	0.4	2.5

表 1 : 各脂質の脂肪酸組成

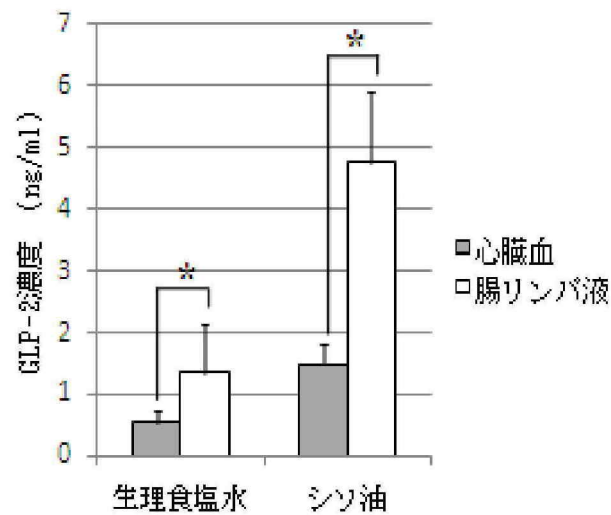


図 4. 血中とリンパ中の GLP-2 濃度の比較 (49 を改変転載)

生理食塩水およびシソ油を十二指腸内に投与し、投与後 2 時間に得られたリンパ検体中に含まれる GLP-2 濃度 (n=10) と、投与 2 時間後のラットの心臓血に含まれる GLP-2 濃度 (n=5) を比較した。

*; $P < 0.05$

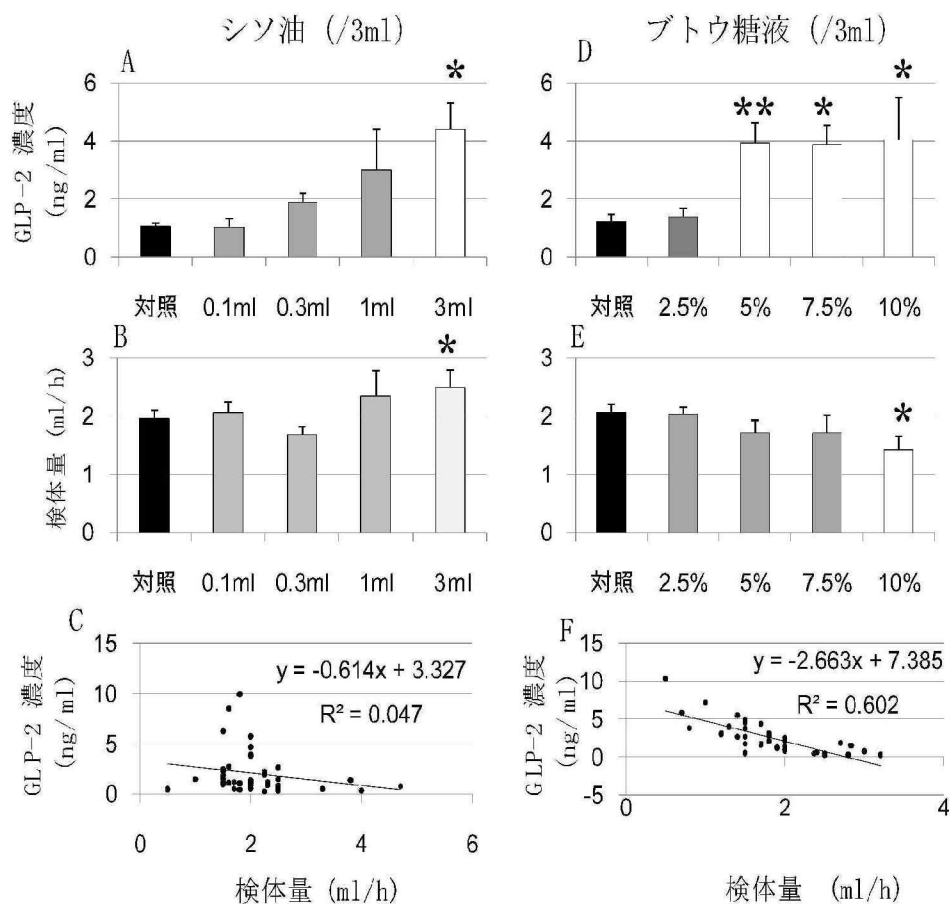


図 5. ラットリンパ検体の GLP-2 濃度と検体量の関連 (49 より改変)

シソ油とブドウ糖液をそれぞれ複数の濃度で十二指腸内へ 3ml ボーラス投与し、投与後 2 時間リンパを回収した(n=4-5)。

上段 (A、D) : 投与 2 時間後の検体に含まれる GLP-2 濃度

中段 (B、E) : 投与 2 時間に回収されたリンパ検体量

下段 (C、F) : GLP-2 濃度とリンパ検体量の相関

左列 (A ~C) : シソ油投与

右列 (D~F) : ブドウ糖液投与

*, P<0.05, **, P<0.01 対 生理食塩水による対照群

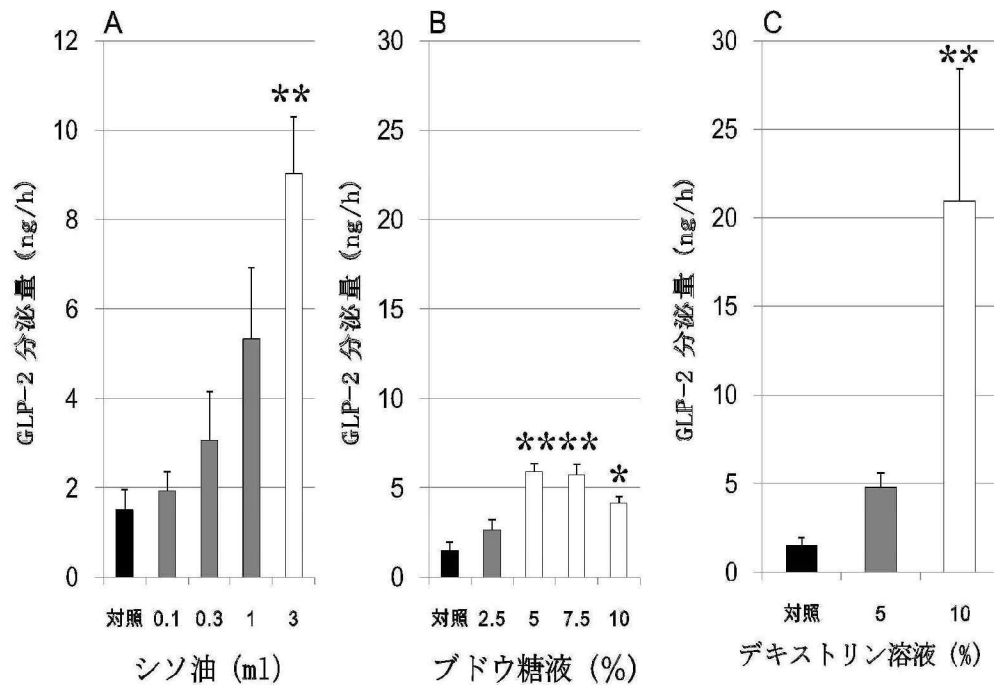


図 6. 脂質・糖質による GLP-2 分泌刺激の用量依存性 (49 より転載)

シソ油 (A)、ブドウ糖溶液 (B)、デキストリン溶液 (C) を十二指腸内へ 3ml ボーラス投与し、投与後 2 時間にわたりリンパを回収した(n=5-10)。リンパ検体中の GLP-2 濃度と検体量を積算し、時間あたりの「分泌量」として評価した。

*P<0.05、 **; P<0.01 対 生理食塩水による対照群

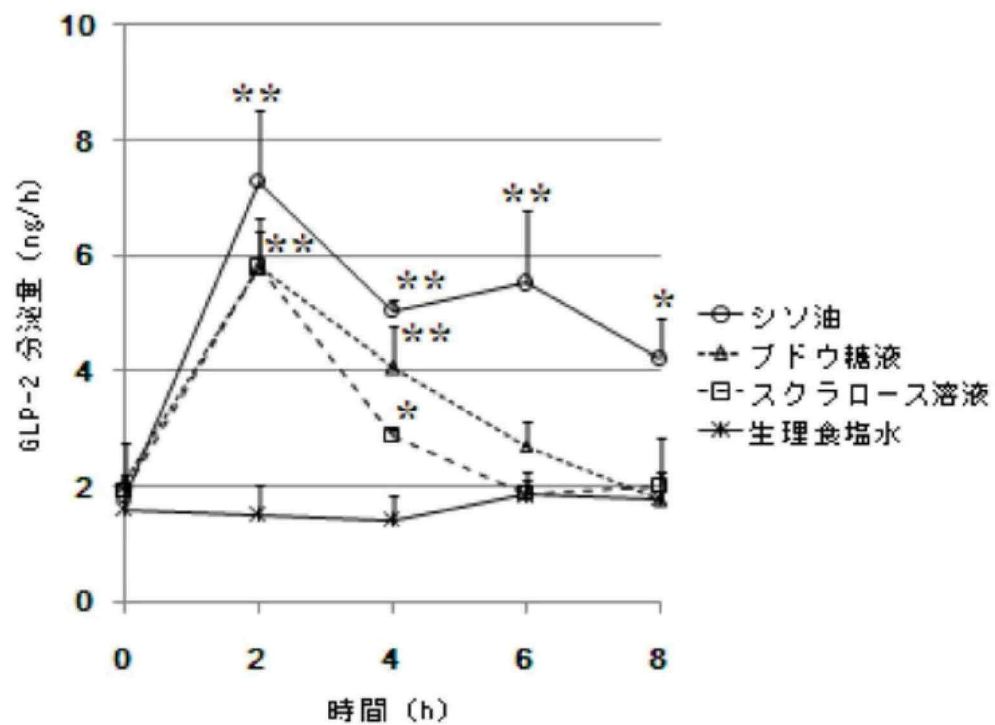


図 7. GLP-2 分泌量の経時変化 (49 より転載)

シソ油、5%ブドウ糖溶液、4%スクラロース溶液、生理食塩水を十二指腸内へ 3ml ボーラス投与し、2 時間毎に投与後 8 時間までリンパを回収した(n=3・5)。リンパ検体中の GLP-2 濃度と検体量を積算し、時間あたりの「分泌量」として評価した。

*, P<0.05, **; P<0.01 対 生理食塩水による対照群

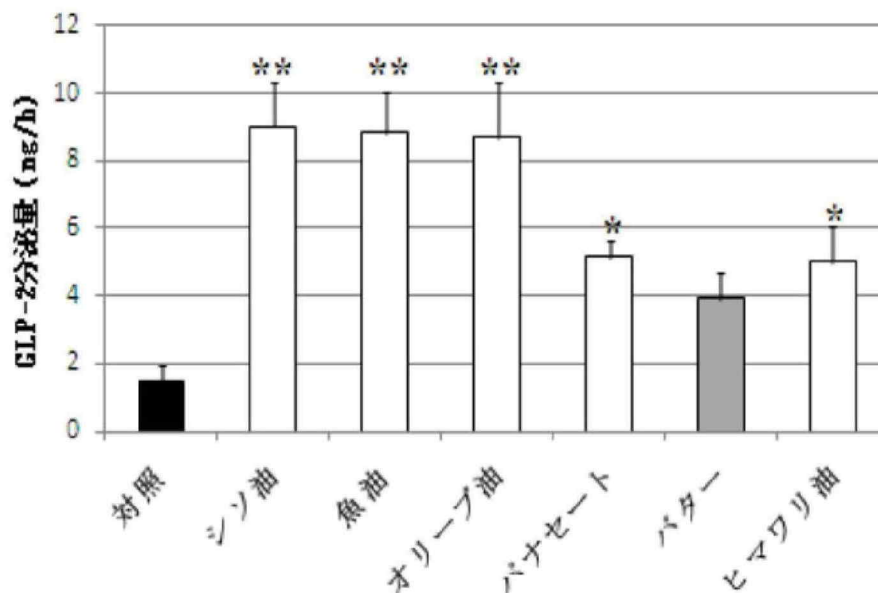


図 8. 6 種類の脂質投与に誘導された GLP-2 分泌量の比較(49 より転載)

シソ油、魚油、オリーブ油、パナセート®、バター、ヒマワリ油を十二指腸内へ 3ml ボーラス投与し、投与後 2 時間リンパを回収した(n=4-7)。リンパ検体中の GLP-2 濃度と検体量を積算し、時間あたりの「分泌量」として評価した。

*, P<0.05, **; P<0.01 対 生理食塩水による対照群

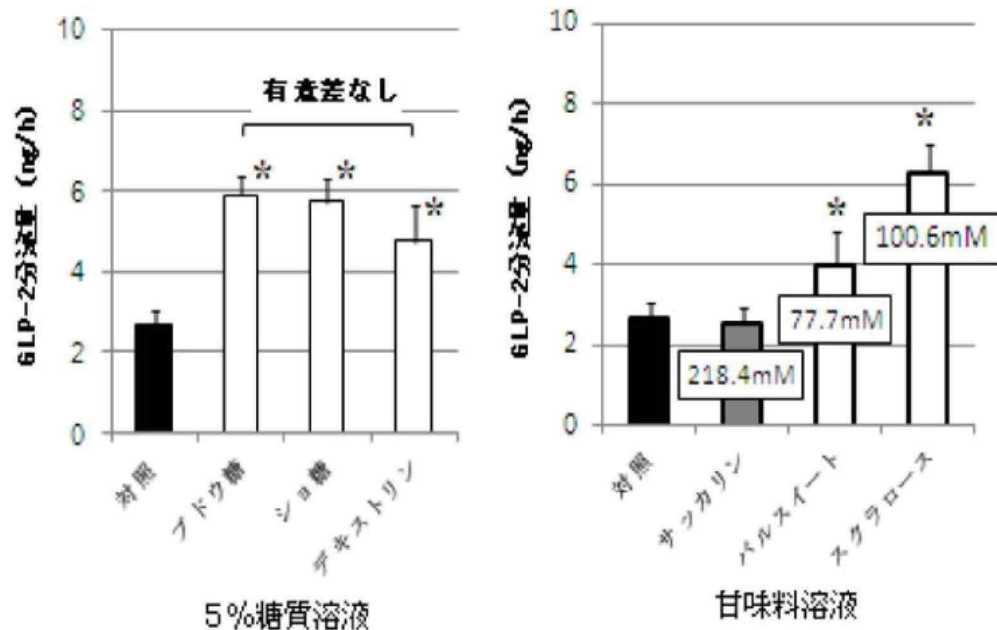


図 9. 糖質または甘味料に誘導された GLP-2 分泌量の比較 (49 より改変)

4%サッカリン溶液、パルスweet®溶液、4%スクラローズ溶液、5%ブドウ糖液、5%ショ糖溶液、5%デキストリン糖液の各水溶液を十二指腸内へ 3ml ポーラス投与し、投与後 2 時間リンパを回収した(n=4-5)。リンパ検体中の GLP-2 濃度と検体量を積算し、時間あたりの「分泌量」として評価した。

*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$ 対 生理食塩水による対照群

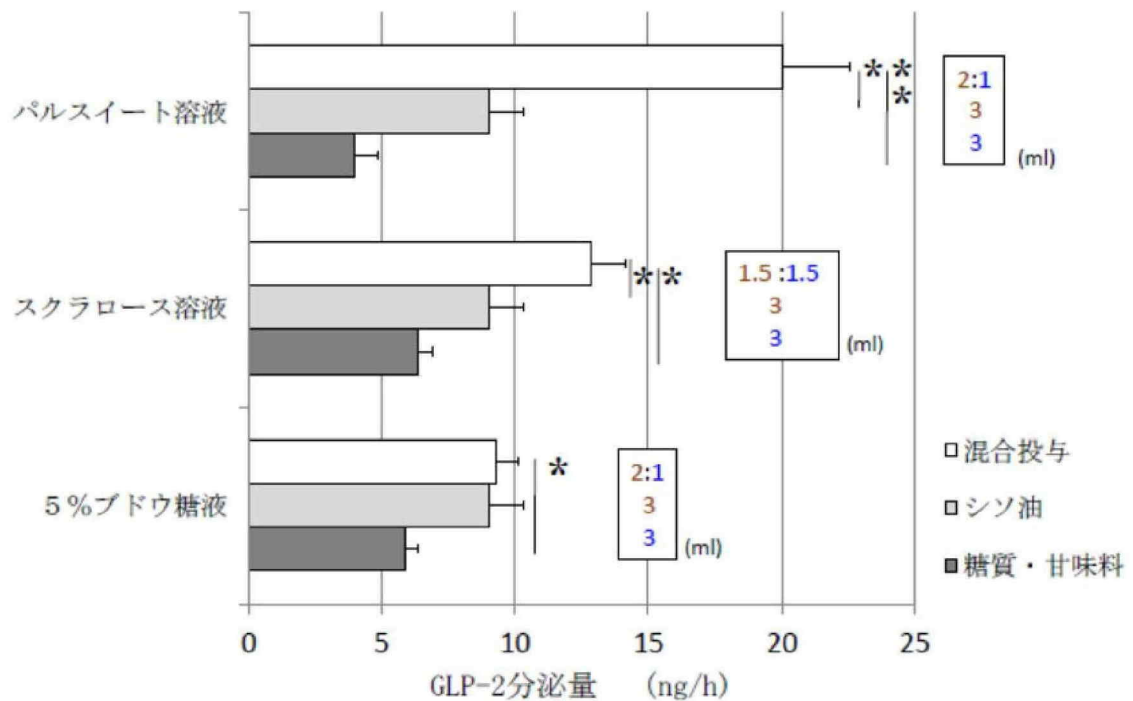


図 10. 混合投与による GLP-2 分泌量への相加的効果 (49 より転載)

シソ油に 5%ブドウ糖溶液、4%スクラロース溶液、パルスweet®溶液のいずれかを計 3ml となるよう混合し、投与後 2 時間リンパを回収した(n=3-5)。検体中の GLP-2 濃度と検体量を積算し、時間あたりの「分泌量」として評価した。

混合投与の比率：

シソ油：ブドウ糖溶液＝2:1

シソ油：スクラロース溶液＝1:1

シソ油：パルスweet®＝2:1

*, P<0.05、**, P<0.01

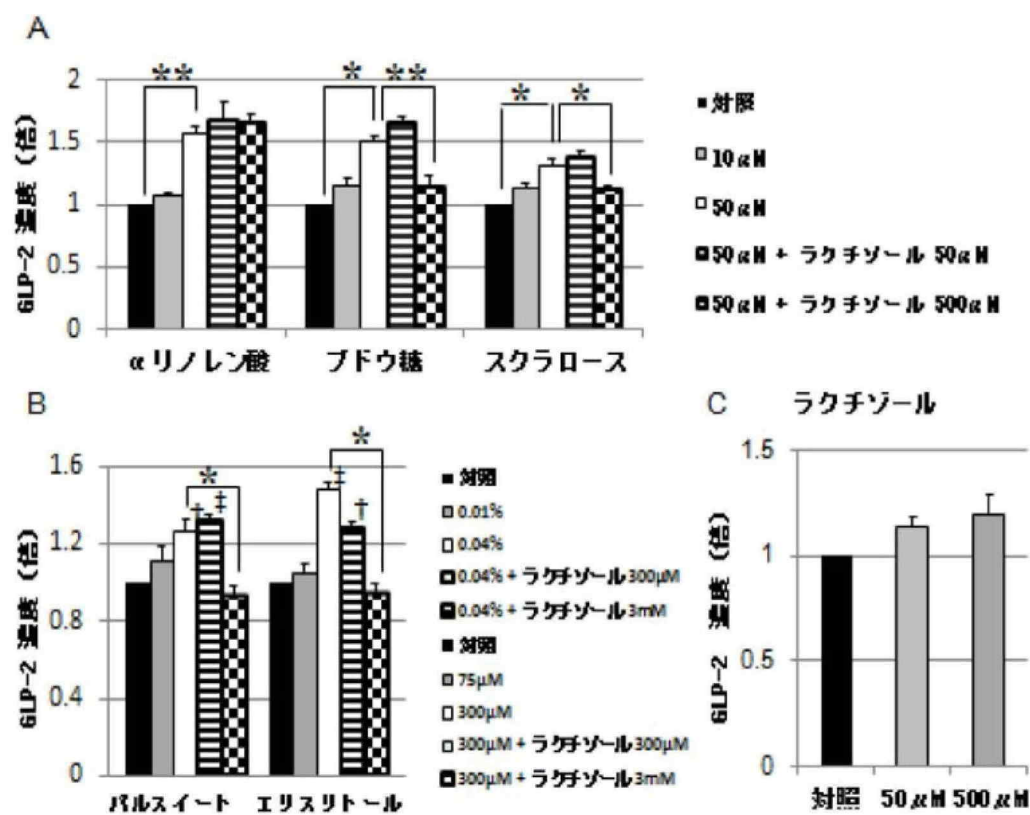


図 11. NCI-H716 細胞を用いた脂肪酸・糖質・甘味料による GLP-2 分泌刺激の検討 (49 より改変)

A. αリノレン酸、ブドウ糖液、スクラロース溶液添加による評価

B. パルスイート®溶液、エリスリトール溶液による評価

C. ラクチゾール単体の評価

†; $P < 0.05$, ‡; $P < 0.01$ 対 HEPES 溶液による対照群

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$

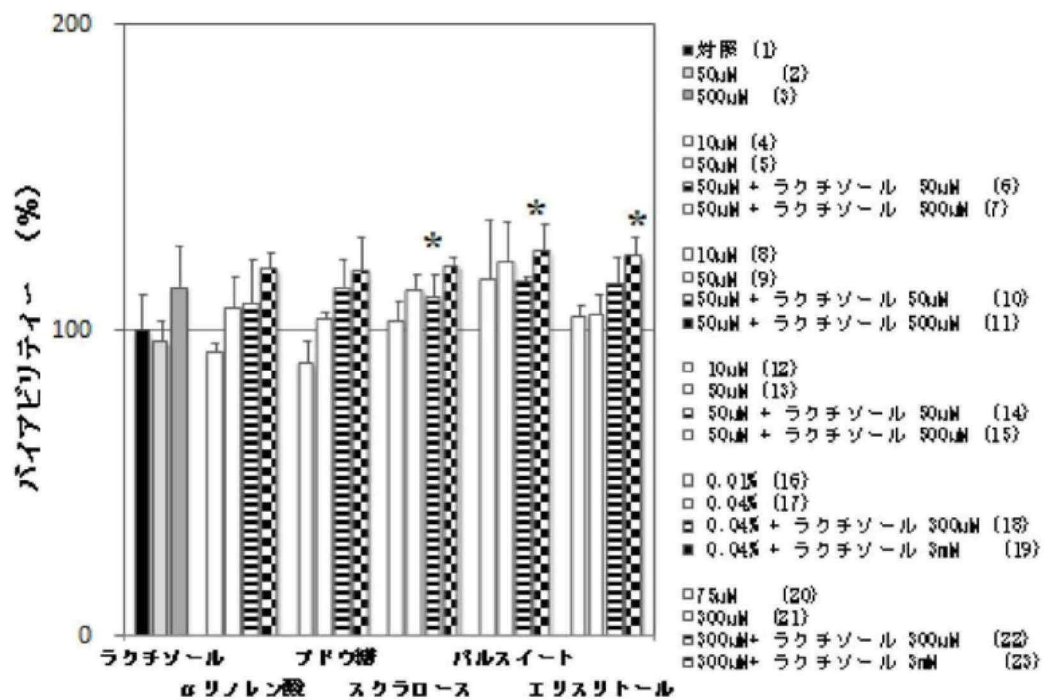


図 12. MTT 試験による試薬添加後の細胞のバイアビリティの評価(49 より改変)

結果は HEPES 溶液添加後の細胞を 100 として相対化した。

*; $P < 0.05$ 対 HEPES 溶液による対照群

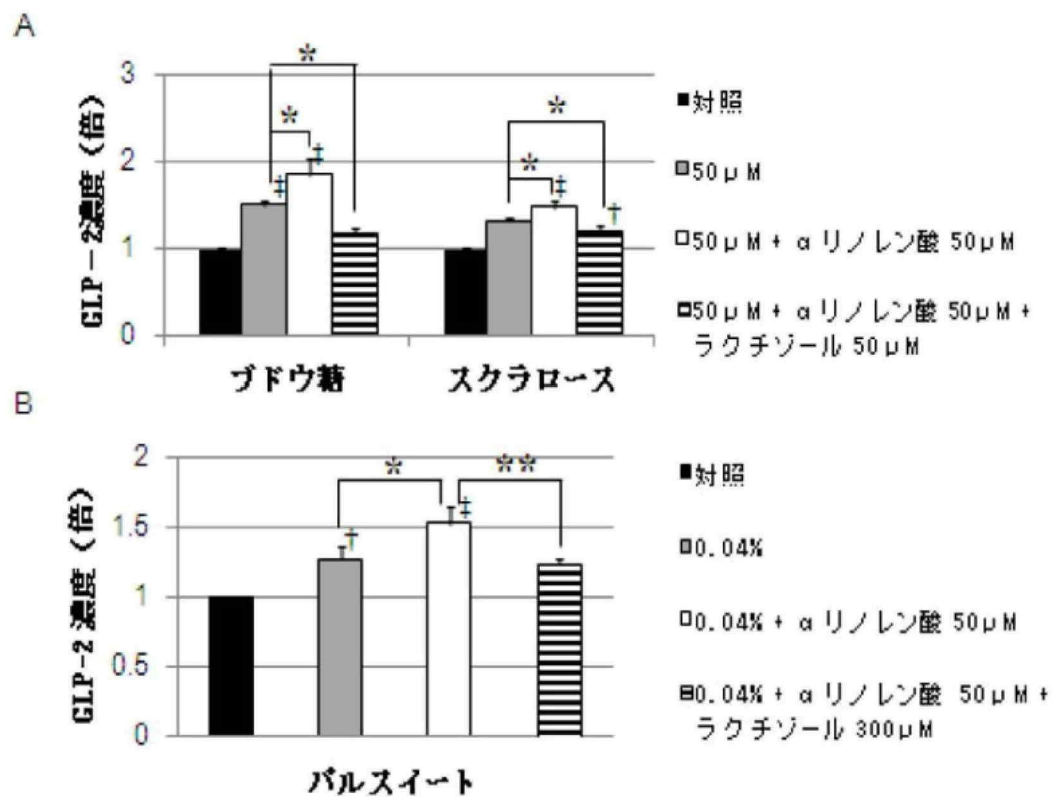


図 13. 脂肪酸と糖質・甘味料の共添加による GLP-2 分泌刺激(49 より改変)

A. α リノレン酸とブドウ糖、スクラロースの共添加

B. α リノレン酸とパルスイト®溶液の共添加

†; $P < 0.05$ 、‡; $P < 0.01$ 対 HEPES 溶液による対照群

**; $P < 0.01$ 、*; $P < 0.05$

参 考 論 文

- 1 Dietary lipids and sweeteners regulate glucagon-like peptide-2 secretion.
(食用脂質と甘味刺激による glucagon-like peptide-2 分泌の制御) (基礎論文 1)

さ とう しん ご
佐 藤 伸 悟

(消化器病学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 25 年度