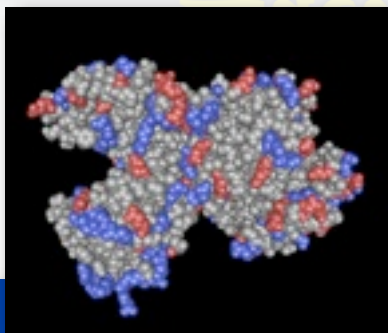


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第9号

2013年10月



巻頭言

ラクトフェリンの神秘的な機能； “母と子の絆的役割から医薬品への道”

原田 悦守

Etsumori HARADA

鳥取大学 名誉教授

1 巻頭言

- ラクトフェリンの神秘的な機能；“母と子の絆的役割”から医薬品への道
原田悦守

2 学会報告

- HFE/ifa 2013「日本ラクトフェリン学会セミナー」開催報告 村越倫明

3 セミナープロシーディング

- ウシラクトフェリンによる大腸がん予防 津田 洋幸
- ミルクタンパク質ラクトフェリンの微生物に対する多面的な作用 島崎 敬一
- ラクトフェリンと肝臓病のInterplay 田中 克明
- 骨をまもるタンパク質ラクトフェリン 高山 喜晴
- ウシラクトフェリン応用の歴史と未来 山内 恒治
- 腸溶ラクトフェリンの内蔵脂肪低減効果について 小野知二

今から三十数年前、哺乳動物新生子の発育成長に興味を持って始めたのが『ミルク含有高分子物質の腸管からの吸収機序』であった。生後未熟な新生子の腸上皮細胞は、初乳に含まれる免疫グロブリンを丸ごとエンドサイトーシスによって体内へ取り込むことが出来る〔受動免疫〕。“母と子の絆”としてミルクを眺めると、『もしかして母乳に含まれる多幸感誘起物質の働きによって、赤ちゃんは心身共に満たされて成育するのではないか？』との仮説を抱き、子ブタ、子ウシを用いて一連の研究を進めた。その結果、ウシ初乳に含まれるIgGや数種のタンパク質がM細胞や腸上皮細胞を介して体内へ取り込まれ、更にリンパ管を経由して循環血へ移行し、腸肝循環することを見出した。加えて、あるタンパク質は脈絡叢の上皮細胞から脳脊髄液にまで輸送された。そのタンパク質の一つがなんとSphrensenら(1939; 小生が生まれた年)によって発見された“赤いタンパク質；ラクトフェリン〔LF〕”であった。『脳まで輸送されたLFはどんな作用を持っているのであろうか？』。LFの持つ抗菌・抗ウイルス、免疫賦活、抗炎症、骨成長、抗酸化、がん予防作用など多様な機能に加えて、何とLFは脳内オピオイド受容体を介した制御系でNOS活性化によるNO産生促進機序によって抗不安・鎮痛効果を示すことが新生子のみならず、成動物でも明らかとなった。この効果は、ストレスの多い環境下で赤ちゃんが自ら生き抜く力を母親がミルクに託した機能とも言えよう。更に脂質代謝改善、血圧低下作用、リウマチ性関節炎など疾病の予防・治療効果の存在も実証できた。これら新規効果は、正に生活習慣病の予防・治療分野にも応用できる可能性を秘めており、より効率的な体内吸収を期した腸溶剤の開発にも関わってきた。

LFの研究は、国際LF会議、日本LF学会など広範な分野からの研究者によって益々活発となってきた。今後、これらすばらしい機能を備えたミルク由来で安心して利用できるLFについて、高齢化社会における機能性食品の素材に留まらず、医薬品としての可能性をも展開、発展される研究が大いに期待される。

HFE / ifia JAPAN 2013「日本ラクトフェリン学会セミナー」開催報告

村越 倫明

Michiaki MURAKOSHI

ライオン株式会社

生命科学研究所

2013年5月15日から17日まで、東京ビッグサイトで開催されたHFE/ifa JAPAN 2013(第18回国際食品素材/添加物展・会議:日本食品化学新聞社主催、出展企業数;400社、来場者数;32,000人)において、本学会は、「日本ラクトフェリン学会セミナー」を、5月15日に開催しました。本セミナーは隔年開催されている学術集会とは趣を変え、食品研究の専門家のみならず、一般の方にもラクトフェリンに関する知識を深めて頂き、健康づくりに役立てて頂くことを目的としました。一般の方を対象としたセミナーの開催は、本学会にとって初の試みでしたが、当日は、約120名もの聴講者にご参集頂き、セミナー会場が満席になる程の盛況ぶりでした。セミナーでは、日本のラクトフェリン研究を牽引する先生方

に、ラクトフェリンの様々な機能に関する基本的な知識と最新の研究成果について大変分かりやすく講演して頂きました。詳細については、各先生方のプロシーディングをご参照頂ければと存じます。また、HFE/ifa2013の展示ブースにおきましても、日本ラクトフェリン学会として、これまでのラクトフェリン学会学術集会のプロシーディングや、学会ニュースレターのバックナンバーの展示を行いました。本セミナーがラクトフェリンの知名度向上のきっかけになり、ラクトフェリン研究と事業の更なる活性化に繋がれば幸いです。

末筆になりますが、本セミナーの開催にあたり、講演者の先生方、スタッフの皆様の尽力に心から感謝申し上げます。



当日の講演会場の様子



セミナーの講演者とスタッフ一同

ウシラクトフェリンによる大腸がん予防

津田 洋幸

Hiroyuki TSUDA

名古屋市立大学

津田特任教授研究室

1. がん予防の必要性

日本のがん登録によれば1年間のがん罹患数は約50～60万人とされ、2015年には100万人に達すると予測されている。そのうち大腸がんは献立の西欧化とともに急速に増加しつつあり、その予防は緊急に対応を要する問題である。がん予防の重要性は、火災に対して日頃の備えと初期消火の利を考えれば明らかである。

2. がん予防物質の作用機序

今までに動物とヒトで見出されたがん予防物質の作用機序は、1)抗酸化、2)抗炎症、3)抗ホルモン、4)免疫能増強、5)薬物代謝酵素誘導の修飾、6)前がん細胞のアポトーシス誘導、7)細胞の分化誘導、8)血管新生阻害、9)細胞増殖阻害、10)がん遺伝子発現阻害、に整理される。例えばカロテノイド類、ポリフェノール類には抗酸化、抗炎症、免疫能の増強を、DHA等の不飽和脂肪酸は抗炎症とアポトーシス誘導作用を発揮する(図1, 2)。

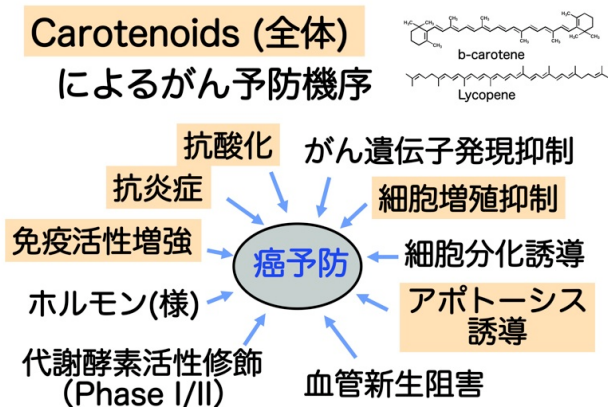


図1 カロテノイドによるがん予防機序

3. ラクトフェリンとは

ラクトフェリンは鉄結合性の分子量約8万の糖蛋白質で、初乳に最も多く含まれ、その抗菌・抗ウイルス作用・抗カビ作用と免疫能増強作用によって新生児の感染に対する防御を担うと考えられている。

4. 動物モデルにおける牛乳成分のウシラクトフェリン(bLF)のがん予防作用とその機序

化学物質による発がん過程は、DNA傷害によって自律的な増殖能力をもつ変異細胞の生まれるイニシエーション段階と、変異細胞が増殖を続けて悪性形質の発現に至るプロモーション段階の二つに分けられている。ウシラクトフェリンは主としてプロモーション段階に投与するとがん細胞の増殖進展をよく抑制する。

1)実験方法は、bLF、bLFのペプシン加水分解産物(bLFH)(胃で分解されてペプチド断片になることを想定した)およびbLFの構成ペプチドのラクトフェリシン

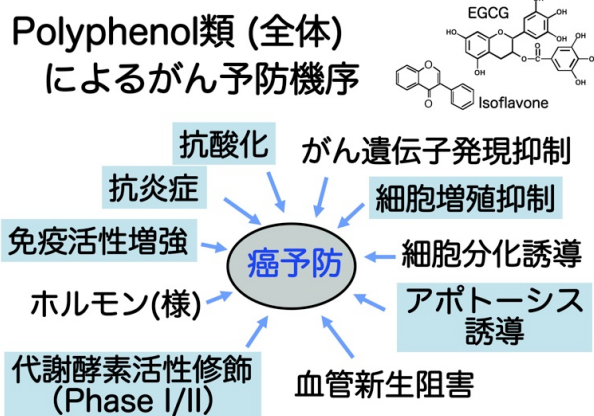


図2 ポリフェノールによるがん予防機序

(bLFCin、25アミノ酸からなる分子量3000のペプチド)はラットのプロモーション期に混餌経口摂取させると、大腸発がん物質のアゾキシメタンのみを投与した対照群と比較して、大腸腫瘍(腺腫+がん)の発生頻度と一匹当たりの個数は約1/3に減少した。bLFHとbLFCinも同様にプロモーション抑制作用を示した。これらの実験の0.2%投与用量はヒト(体重50kg)に換算すると1日10g程度であり、それ以下の0.02%でも有効であることから、ヒトで摂取可能な用量であることが分かった¹⁾。

5. 機序の解析

マウスにおいてbLF、bLFHおよびbLFCinは小腸粘膜上皮細胞内においてサイトカインIL-18、カスパーゼ、インターフェロン γ を誘導し、殺細胞性のNK細胞、CD4およびCD8陽性細胞の誘導もみられることが明らかとなった(図3)。同様に粘膜固有層および血液中のNK細胞や殺細胞性T細胞数の増加、炎症性サイトカインのIL-1 β -やTNF α の減少も観察され、抗炎症作用が観察され、発がんを抑制することが期待された(図3)^{2,3)}。

6. ヒト大腸ポリープの成長抑制の臨床試験

年齢40~75歳の直径5mm以下の大腸ポリープのある患者104人を対象に、プラセボ群(偽物質投与群すなわちウシラクトフェリン非投与)、ウシラクトフェリン1.5g/日群、およびウシラクトフェリン3.0g/日群の3群に分け、1年間摂取させた。それぞれの群は、どの群がウシラ

クトフェリンを摂取しているのか患者、医師のどちらにも分からない二重盲検法にて実施した。標的とした大腸ポリープの大きさを大腸内視鏡検査により摂取直前と摂取開始1年後に計測した。その結果、プラセボ群では大腸ポリープ直径が平均5%増加しているのに対し、ラクトフェリンの高用量群では5%縮小した($p=0.098$)。3.0g群のうち、63歳以下群ではポリープが10%縮小し(一方、プラセボ群では28%増加)、有意なポリープの成長の抑制作用が見られた($p=0.006$) (図3)。なお、ウシラクトフェリン投与に関連した有害事象(毒性)は観察されなかった4)。

7. 作用機序

大腸ポリープ径の変化量と①NK細胞活性、②血清ヒトラクトフェリン濃度、および③標的病変への多形核白血球(PMN)浸潤との相関関係を調べた。その結果、NK細胞活性の上昇と血清ヒトラクトフェリンの誘導による大腸ポリープへのPMN浸潤抑制が大腸ポリープの進展抑制に関与していることが示された(図3)。

8. 要約

ウシラクトフェリン(bLF)はラットの大腸、膀胱、肺、食道等の発がん抑制作用を示す。さらにヒトにおいても大腸ポリープの成長を抑制した。ウシラクトフェリンは動物実験で観察されたような多面的な作用によって、ポリープの進展を抑制したものと考えられた(図3)。さらに有害事象は観察されなかったことから、我が国で増加しつつある大腸がんの予防に有望と考える。

発表論文

- 1) Tsuda, H. *et al.*, Mutation Res., 462: 227, 2000.
- 2) Tsuda, H., *et al.*, Biochem. Cell. Biol., 80: 131, 2002.
- 3) Iigo, M., *et al.*, Biochimie. 91: 86, 2009.
- 4) Kozu, T., *et al.*, Cancer Prevention Res. 2: 975, 2009.

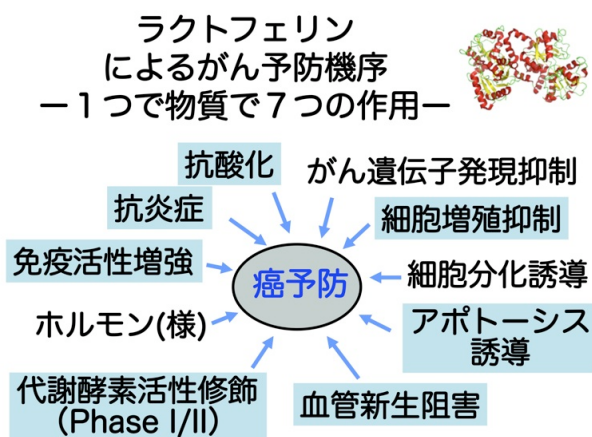


図3 ラクトフェリンによるがん予防機序

ミルクタンパク質ラクトフェリンの 微生物に対する多面的な作用

島崎 敬一

Keiichi SHIMAZAKI

北海道大学 名誉教授

ラクトフェリンは多様な生物活性を示すが、微生物に対する作用に限っても「増殖抑制」「影響なし」「増殖促進」の3通りがある。

1. 直接的抗菌活性

ラクトフェリンは静菌作用と殺菌作用を示す。キレート物質であるシデロフォアを分泌して鉄イオンを取り込む菌に対して、ラクトフェリンが鉄イオンをキレートし、増殖を抑えるのが静菌作用である。グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌類、酵母などに対して静菌作用を示す一方で、ラクトフェリンやトランスフェリンを利用して鉄イオンを取り込む細菌もある。さらにラクトフェリンの抗菌作用は以下のように幾つものパターンがある。

- ❖ 菌体表面のリポ多糖(LPS)に結合し、遊離させてダメージを与える(大腸菌、サルモネラ菌)。
- ❖ 水溶性低分子を取り込むための細胞装置(ポリン)を塞ぎ、菌体内への取り込みを阻害する(グラム陰性菌)。
- ❖ 菌を抑えるために分泌されるIgAを分解して自己防衛する菌に対し、ラクトフェリンのセリンプロテアーゼ活性が働いて分解を妨げ、感染を防ぐ(中耳炎原因菌)。
- ❖ 虫歯原因菌の表面にある物質が唾液成分に結合してう蝕を生じさせるが、ラクトフェリンはその付着を阻害する(ミュータンス菌など)。
- ❖ 口腔内で増殖する際にバイオフィルムを形成する菌の場合、その形成を阻害して増殖を阻止する(歯周病原因菌など)。

2. 間接的抗菌活性

ラクトフェリンは消化管免疫と全身免疫を活性化し、結果として抗感染能を高めている。魚類への投与では白点虫感染の予防・治癒効果や生存率の向上が観察され、体表粘液やレクチンの増加、各種ストレスへの耐性向上、免疫機能向上(顆粒球・リンパ球の増加、貪食能の増加、NK細胞活性の増加など)と関連している。また、ウシ乳房の細菌感染の部位では、好中球が細菌を貪食するとともにラクトフェリンやディフェンシンなどの抗菌性物質も分泌される。そこで、慢性乳房炎の予防・治療にラクトフェリンやその分解物の局所注入の有効性が期待されている。ラクトフェリンの直接的な抗菌作用とともに、各種免疫系の活性化による要因も大きい。

3. 抗菌ペプチド

ラクトフェリンのペプシン分解物から、殺菌活性の非常に強いペプチド「ラクトフェリシン」が見出されている。ラクトフェリンよりも広い抗菌スペクトルを示す一方で、乳酸菌やビフィズス菌の増殖は阻害しない。正の荷電を持つ両親媒性ペプチドで、菌の外膜と内膜を破壊してダメージを与える。

4. ウイルス、原虫に対する作用

ロタウイルスによる症状の緩和、ノロウイルスの発症率低減、さらにC型肝炎ウイルスに対する効果なども期待されている。また、各種原虫への増殖抑制作用も報告されている。

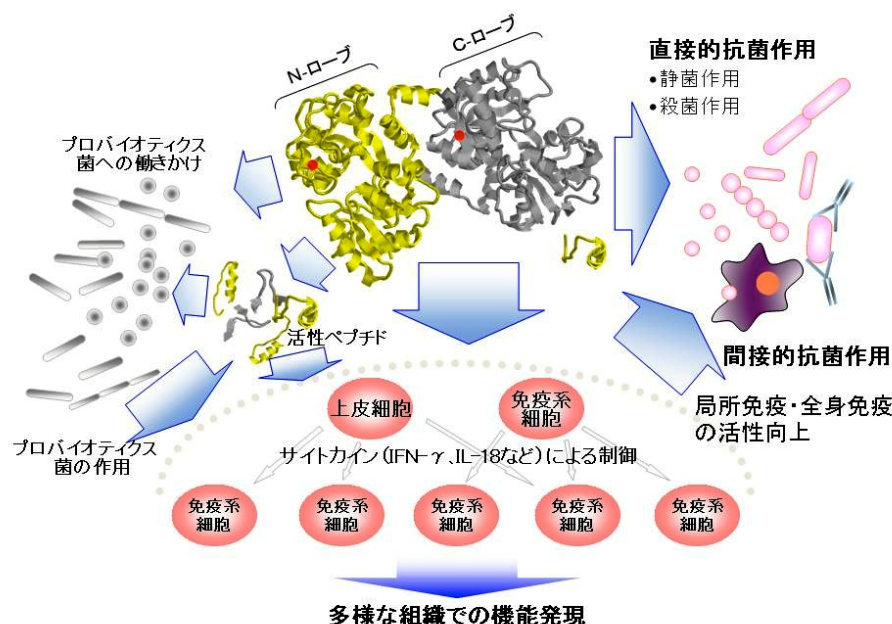


図 ラクトフェリンの多機能性を説明するモデル

5. 増殖促進作用

乳酸菌やビフィズス菌には、ラクトフェリンによって増殖が促進される株がある。ビフィズス菌増殖能を持つペプチドが分離されていることから、ラクトフェリンが消化管内で機能している可能性がある。ビフィズス菌表面のレセプターに結合して増殖シグナルが作動したり、あるいはビフィズス菌の偏性嫌気性に関連している可能性が推察されているが、詳細はまだ不明である。

6. 応用例

微生物に対する効果を期待したラクトフェリン含有製品もいろいろある。

- ❖ 整腸作用を期待(錠剤や顆粒などのサプリメント、ヨーグルト、育児用ミルクなど)
- ❖ 口腔衛生関連(錠剤、パッチ、練歯磨き)
- ❖ ピロリ菌抑制や細菌性下痢症状軽減(サプリメント、ヨーグルト、飲料)
- ❖ 風邪やウイルス性胃腸炎対策(サプリメント、ヨーグルト、飲料)
- ❖ 敗血症予防効果(未熟児・新生児の育児用ミルク)
- ❖ 食肉衛生関係(枝肉に噴霧。USAでの例)
- ❖ ウシ乳房炎の予防(平成25年3月、動物用医薬品(乳房注入剤)として承認)

7. ラクトフェリンの多機能性を説明する仮説

ラクトフェリンの他のさまざまな機能は以下の3つの仮説でおおよそ説明できる。

- ❖ 分子表面の特定部位が、それぞれ何らかの活性に関与し(十徳ナイフモデル)、断片化してもその活性を保持している場合が多い。
- ❖ 図の下方に示したように、ラクトフェリンのレセプターへの結合などによって免疫関連細胞が刺激され、各種サイトカインを分泌して他の細胞の機能をコントロールしている(玉突きモデル)。
- ❖ 生体内でのラクトフェリンは様々な物質を結合している。それらの物質の運搬、さらに協同的に作用していることで説明できる例(キャリアモデル)も増えてきた。

ラクトフェリンと肝臓病のinterplay

田中 克明

Katsuaki TANAKA

横浜市立大学附属市民総合医療センター
臨床研究推進センター

はじめに

消化器疾患に対するラクトフェリンの臨床応用を考えた場合、抗ウイルス作用を期待する疾患として「C型肝炎」、炎症作用(抗TNF- α 作用)を期待する疾患として「急性肝不全」、「炎症性腸疾患」などが挙げられてきた。しかしながら、投与経路が経口に限られていることから、経口投与されたラクトフェリンが吸収されて血液中で有効濃度に達するというエビデンスが証明されていない現状においてはその効果は限定されたものと言える。ここでは肝臓疾患を中心にラクトフェリン臨床応用の問題点を整理したい。

抗C型肝炎ウイルス作用の分子機序

1998年に国立がんセンターの池田、加藤らはヒト培養肝細胞を用いたC型肝炎ウイルス(hepatitis C virus : HCV)の感染増殖系において、ラクトフェリンはHCV粒子上のE1/E2エンベロープ蛋白質の標的細胞への吸着に必要な受容体あるいはその近傍に直接結合することでウイルスの細胞への吸着を阻害することを見出した¹⁾。その後、ラクトフェリンはHCVのE2エンベロープ蛋白質と結合し、その最小結合領域はラクトフェリンの600-632番目までの33アミノ酸であることが報告されている²⁾。この33アミノ酸を含んだ融合蛋白質はHCVの感染増殖系において濃度依存的にHCVの細胞への感染を防御することから、抗HCV薬としての可能性が期待された。

経口ラクトフェリン製剤を用いた臨床試験

ラクトフェリンとHCVの直接的相互作用を期待するならば静脈内投与が望ましいが、静脈投与可能な製剤は存在しなかったため、次善の策ではあったが既に食品として実用化されており安全性も確認されているウシラクトフェリンの経口投与試験が行われた。初期パイロットスタディでは、治療開始前の血清 HCV RNA量がアンプリコア定量法で100 Kcopies/ml以下であった4症例中3例で HCV

RNA量の低下とALT値の改善が認められたが、100 Kcopies/ml以上の高ウイルス量であった7症例では無効という結果であった³⁾。この結果を踏まえて第2相の比較用量試験が行われ、登録された45症例中9例(20%)で、血清ALT値あるいは HCV RNA量が半分以下に改善されるという成果が得られた⁴⁾。しかしながら、用量依存性がないことも明らかとなり、抗ウイルス作用以外に何らかの間接的な作用機序が介在する可能性が示唆された。2001年からは国立がんセンター中央病院を中心とした第3相のランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験が実施され、ラクトフェリン群97例、プラセボ群101例が登録されたが、両群間に有意の差を認めることができなかった⁵⁾。

急性肝不全モデルに対するラクトフェリンの肝炎抑止効果

広範肝細胞壊死を伴う急性肝不全(劇症肝炎)において、TNF- α は重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、急性肝不全の動物モデルとして広く用いられ、その発症にTNF- α が深く関与しているD-ガラクトサミン(GalN)/リポポリサッカライド(LPS)誘発急性肝不全モデ

ルを用い、ラクトフェリンが肝炎抑止効果を発揮するかどうかを検討した。対照群ではGalN/LPS投与後に致死的な肝障害がみられ、投与24時間後にほとんどのラットが死亡した。一方、ラクトフェリン投与群は全例で生存し、対照群と比較して血清ALT値、TNF- α 値は著明に抑制された。GalN/LPS誘発急性肝不全モデルにおいてラクトフェリンの肝炎抑止効果は顕著であり、臨床的にも肝炎の重症化や急性肝不全への進展を抑制する可能性が示唆された。

炎症性腸疾患モデルに対するラクトフェリンの腸炎抑止効果

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の動物モデルとされるtrinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 起因性腸炎ラットにラクトフェリンを投与したところ、対照群と比較してTNBS腸炎が軽減されることが明らかとなった⁶⁾。その機序として、ラクトフェリンは抗炎症性サイトカイン(IL-4, IL-10)産生の亢進および炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β)産生の抑制といったサイトカイン・インバランスの是正を介し、腸炎抑止効果を発揮すると考えている。

今後の展望

2011年よりHCVプロテアーゼ阻害薬であるテラプレビルが保険適応となり、ペグインターフェロンとリバビリンを組み合わせた3剤併用療法で治療効果も大幅に改善した。また、近い将来には経口2剤のみのインターフェロンフリーレジメンの登場も予定されている。しかしながら、経口剤特有の副作用や薬剤耐性の課題が残るため、ラクトフェリンのHCVエントリーインヒビター的な役割が必要とされる可能性も期待できよう。現時点では投与経路が経口に限られているが、静脈内投与が可能なラクトフェリンあるいはラクトフェリン由来の製剤が開発されれば、その強力な抗HCV作用や抗TNF- α 作用を期待する臨床応用の可能性が飛躍的に広がるものと期待できる。

参考文献

- 1) Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka T, et al. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 245:549-553, 1998.
- 2) Nozaki A, Ikeda M, Naganuma A, et al. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J Biol Chem* 278:10162-10173, 2003.
- 3) Tanaka K, Ikeda M, Nozaki A, et al. Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Jpn J Cancer Res* 90:367-371, 1999.
- 4) Okada S, Tanaka K, Sato T, et al. Dose-response trial of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Jpn J Cancer Res* 93:1063-1069, 2002.
- 5) Ueno H, Sato T, Yamamoto S, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bovine lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Cancer Sci* 97:1105-1110, 2006.
- 6) Togawa J, Nagase H, Tanaka K, et al. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Am J Physiol*, 283:G187-G195, 2002.

骨をまもるタンパク質ラクトフェリン

高山 喜晴

Yoshiharu TAKAYAMA

(独)農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

はじめに

近年の研究により、ラクトフェリンが、骨形成を担う骨芽細胞の増殖と分化を促進すると共に、破骨細胞による骨吸収を抑制する機能を持つことが明らかとなっている。本稿では、これまでに細胞レベル・実験動物レベルで明らかになった骨代謝に対するラクトフェリンの機能について紹介すると共に、骨粗鬆症など骨代謝異常が原因となる疾患の予防・治療のためのラクトフェリンの利用について紹介したい。

乳成分と骨代謝

骨の新陳代謝は、カルシウムの骨組織への沈着(骨形成)と血液中への溶出(骨吸収)により行われている。骨吸収が骨形成より過大な状態が継続すると、骨密度が減少して骨粗鬆症を引き起こし、特に高齢者において骨折や骨の変形の原因となる。牛乳はカルシウムを大量に含み、骨の健康の維持・増進に有効な食品である。疫学的な研究によると、青少年時の牛乳の摂取量と、高齢に達してからの骨量は正の相関が認められる。一方、カルシウム以外にも牛乳は生理活性物質を大量に含むことが知られている。乳清(乳から乳脂肪分とカゼインを除いた液体成分)を初代培養骨芽細胞の培養液に添加すると、増殖が促進されることが知られており、骨芽細胞に対し増殖活性を示す乳清タンパク質の同定が試みられてきた。

ラクトフェリンは、乳清に含まれる主要な鉄結合タンパク質である。強力な抗菌活性や免疫賦活能を示すことから、免疫系の未熟な新生児の生体防御に関与していると考えられてきた。2004年に、オークランド大学(ニュージーランド)のCornish教授のグループは、ラクトフェリンが血清飢餓により引き起こされる骨芽細胞のアポトーシス(細胞死)を抑制すると共に、初代培養骨芽細胞

および株化骨芽細胞の増殖を用量依存的に促進することを報告し、骨代謝を改善するタンパク質としてラクトフェリンが注目されるようになった(1・2)。さらに、骨芽細胞においてLRP1(LDL受容体関連タンパク質1)がラクトフェリン受容体として機能しており、ラクトフェリンはLRP1依存的に、ERK1/2(p42/44 MAPK)を活性化することで、骨芽細胞の増殖を促進することが明らかになった。

骨芽細胞に対する機能

ヒト骨肉腫由来の細胞株であるMG63細胞は、骨芽細胞分化のモデル系として広く用いられている。我々はMG63細胞を骨芽細胞に分化誘導する際に、培養液にウシ由来ラクトフェリンを継続して添加すると、アルカリフォスファターゼ活性が上昇すると共に、I型コラーゲン・オステオカルシン(非コラーゲン性の骨基質タンパク質)の産生や、骨基質へのカルシウム沈着が促進されることを明らかにした(3)。これらの結果は、ラクトフェリンが骨芽細胞の分化を促進することで、骨基質の形成を促進する機能を有することを示している。

破骨細胞に対する機能

破骨細胞に対するラクトフェリンの機能についても、数多くの報告がされている。Lorgetらは破骨細胞の前駆細胞の混合培養系を用い、ラクトフェリンが破骨細胞の骨

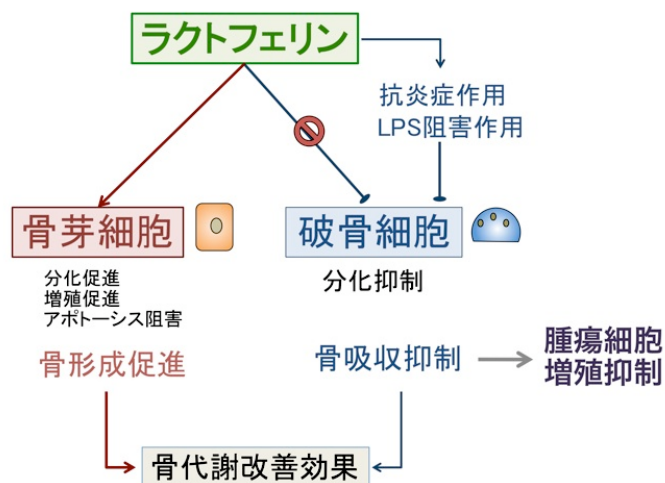


図 骨代謝に対するラクトフェリンの多面的な作用

ラクトフェリンは骨芽細胞による骨形成を促進する他に、直接的または間接的に骨吸収を抑制する。

吸収活性を阻害することを報告した(4)。ラットから単離した破骨細胞を用いた研究によると、ラクトフェリンは破骨細胞の分化を抑制するが、成熟した破骨細胞の骨吸収活性自体はラクトフェリンにより阻害されなかった。つまり、ラクトフェリンは破骨細胞の分化を阻害し、その数を減少させることで、骨吸収に抑制的に機能する可能性が高いと考えられる。

ラクトフェリンの骨吸収抑制機能には、破骨細胞に対する直接的な作用とは別に、間接的なメカニズムも想定されている(図)。LPS(リポポリサッカライド)やTNF- α などの炎症性サイトカインは破骨細胞の骨吸収活性を増大させる。ラクトフェリンはLPSと強固に結合することで、標的細胞への作用を防ぐことは良く知られている。LPS存在下で骨芽細胞と、破骨前駆細胞を混合培養すると、破骨細胞のマーカーである酒石酸耐性フォスファターゼ(TRAP)陽性細胞が誘導されるが、これはラクトフェリン処理により阻害される。

これら骨代謝を改善するラクトフェリンの効果は実験動物レベルやヒト試験でも実証されている。ラクトフェリン骨粗鬆症モデルである卵巣を摘出した実験動物(マウス・ラット)や、閉経後の女性にラクトフェリンを経口投与すると骨の吸収を抑制する効果が報告されている(5・6)。また、LPS投与により引き起こされる歯周組織の破骨細胞の誘導はラクトフェリンにより阻害される(7)。

超高齢化社会を迎え、骨粗鬆症やリウマチなど骨格系を侵襲して運動機能を阻害する疾患の予防・治療の

重要性は益々高まっている。ビスフォスフォネートなど、既存の骨代謝改善剤は破骨細胞の骨吸収活性を阻害するものが大部分であるが、ラクトフェリン骨代謝改善機能は、骨形成の促進と骨吸収の抑制を同時に行う点に特徴がある。ラクトフェリンをゼラチンハイドロゲルやコラーゲン薄膜に固相化し、標的部位に持続的に供給する技術を開発することで、培養骨芽細胞の分化を促進したり、ラット頭蓋骨の骨欠損の修復を促進する結果が報告されており、傷病などにより生じた骨欠損を再生するための因子としてラクトフェリンの利用が期待される。

参考文献

- (1) Grey A. et al., *Mol. Endocrinol.* 18, 2268-2278 (2004)
- (2) Cornish J. et al., *Endocrinology*. 145, 4366-4374 (2004)
- (3) Takayama Y. and Mizumachi K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72,226-30 (2008)
- (4) Lorget F. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 261-266 (2002)
- (5) Blais A. et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1281-E1288 (2009)
- (6) Bharadwaj S. et al., *Inflamm Res.* 59,971-978 (2010)
- (7) Yamano E. et al., *Lab Invest.* 90, 1236-1246 (2010)

ウシラクトフェリン応用の歴史と未来

山内 恒治

Koji YAMAUCHI

森永乳業株式会社 食品基盤研究所

赤ちゃんのミルクの開発においては、いかに成分を母乳に近づけることができるかが永遠の課題である。この時に、たんぱく質や脂質などの栄養的な面だけでなく、母乳の持つ感染防御機能にも配慮する必要がある。ラクトフェリン(LF)は哺乳類の中ではヒトの乳に最も多く含まれ、牛乳には人乳の10分の1程度含有される。1963年に国内初のLF研究が報告され¹⁾、今年で50年となる。赤ちゃんのミルクの研究から始まったLFの機能研究とともに、当時膜技術やクロマトグラフィー技術などによる分離技術が進展し、乳中に微量に存在する機能成分であるLFが工業的規模で製造できるようになり、1986年に世界で初めて乳児用ミルクに配合された(表1)。今回、ウシLFの機能・応用の研究内容および今後の可能性について紹介する。

LF のペプシン分解により新たな活性ペプチドが生成

LF は鉄結合能を持つたんぱく質で抗菌作用、抗酸化作用など様々な機能を持つことが知られている。LF を胃内の消化酵素であるペプシンで分解したところ、鉄結合能は消失するにもかかわらず、抗菌活性は未分解のLFに比べ約20倍高まることが分かった。さらに、ペプシン分解物のペプチド画分の抗菌活性を調べたところ、単一の抗菌ペプチドが得られ、ラクトフェリシンと命名した²⁾。な

お、ラクトフェリシンは大腸菌などのグラム陰性菌、ブドウ球菌などのグラム陽性菌、カンジダなど真菌と広いスペクトルで殺菌的な強い抗菌作用を認めた³⁾。一方、ビフィズス菌に対しては殆ど抗菌作用を示さない。さらに、最近の研究で、LF のペプシン分解物由来のラクトフェリシンとは異なるペプチドにビフィズス菌増殖効果を見出した⁴⁾(図1)。このように、LFはペプシン分解を受けると活性ペプチドが生成され、潜在化していた新たな機能が顕在化する事が示されている。

表1 LF研究・応用50年におけるトピックス

西暦	トピックス
1963	最初のLF研究論文発表(日本初)
1980年代	工業的規模でLF生産開始
1986	LF配合育児用ミルクの発売(世界初)
1992	第1回国際LF会議開催
1992	LF由来抗菌ペプチド「ラクトフェリシン」の発見
1990年代	成人での応用研究
1997~	LFヨーグルト、LFサプリメントの発売
2004	第1回LFフォーラム開催(2010年日本LF学会に)
2009	敗血症予防に関する大規模臨床試験報告
2012	消費者庁「食品の機能性評価モデル事業」で感染防御・免疫調節機能がB(肯定的な根拠あり)の評価
2013	ビフィズス菌増殖促進ペプチド「BLP」の発見

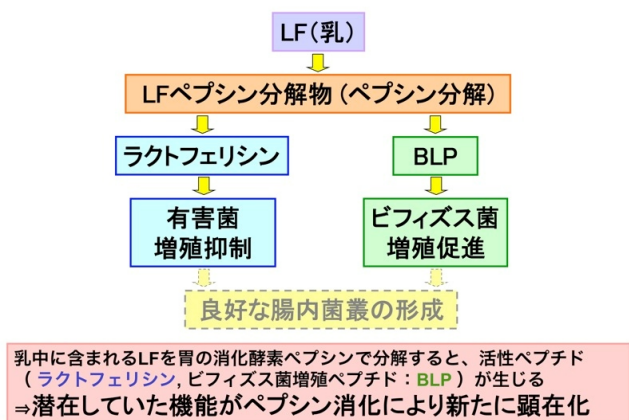


図1 LFのペプシン分解物による活性ペプチドの生成

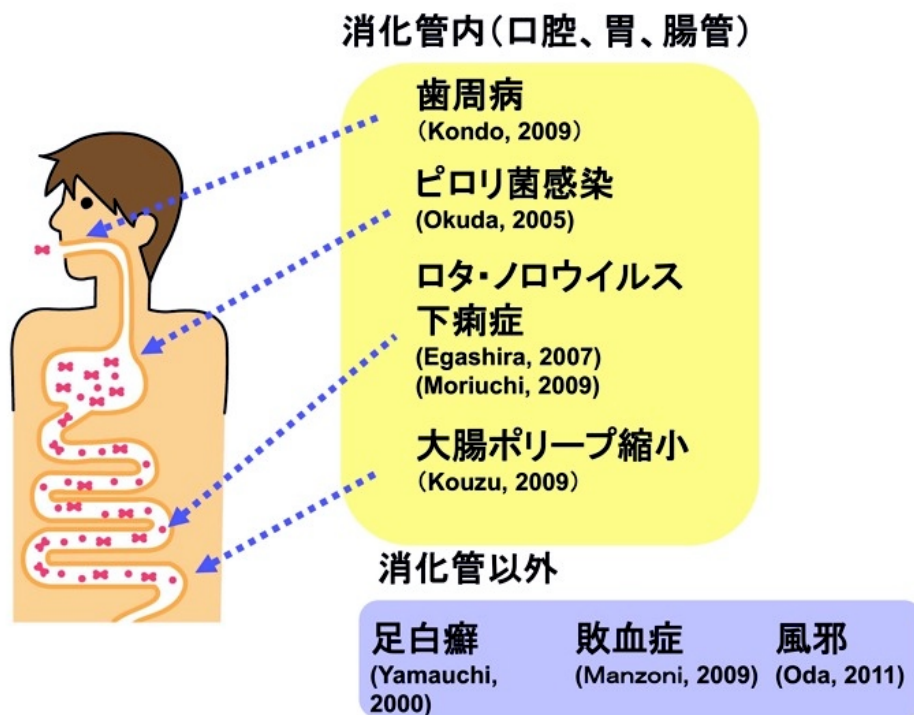


図2 LF経口摂取による主な臨床試験報告

LF 経口摂取による感染防御効果とその作用機序研究

動物実験においてカンジダ、インフルエンザなど様々な感染モデルでLFの経口摂取による感染防御効果を示した。ヒトにおいても、歯周病菌やノロウイルスなどの抑制などの口腔内や消化管内での効果とともに、敗血症に対する予防効果など全身系においてもLFの感染防御効果が示されている(図2)。LFの経口摂取による生体防御効果の作用機序はLFやその消化物の直接的な抗菌・抗ウイルス作用だけでなく、腸管免疫系を介してのナチュラルキラー(NK)細胞やTh1型免疫の活性化など間接的な作用が作用機序として考えられている⁵⁾。

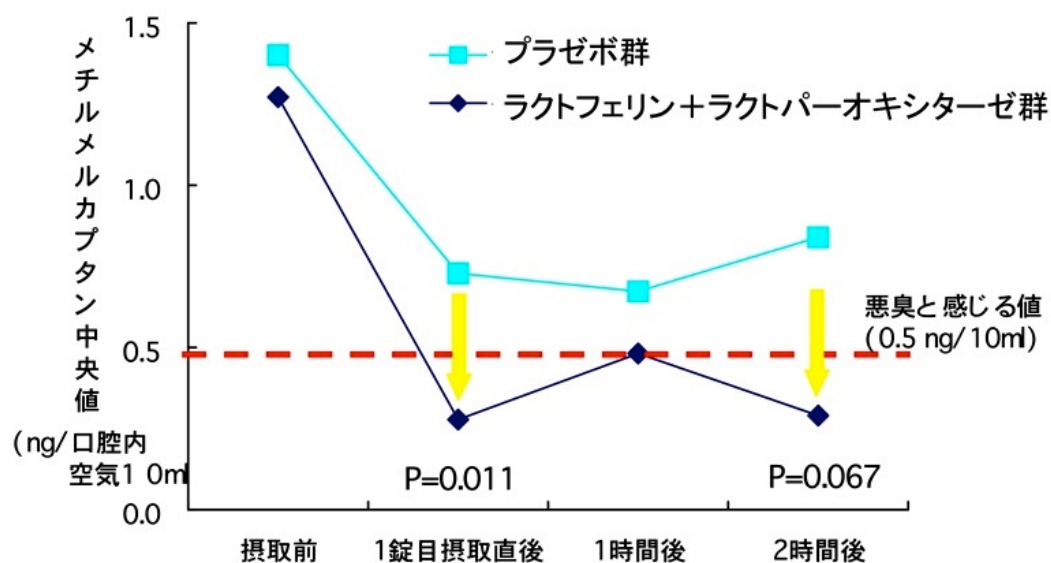
ウシLFの安全性および商品応用と今後

ウシLFは未加熱の牛乳以外に、ナチュラルチーズにも含まれており、ヒトにおいても長い食経験がある。ウシLFに関して安全性試験を実施し、ラットを用いた単回投与試験、4週間反復投与試験、13週間反復投与試験に

おいて毒性を認めず、また、復帰突然変異試験でも異常は認めなかった。さらに、これまで実施した動物実験や臨床試験でも特に副作用は認めず、食品として安全性が高いことを示した。

LFは乳児用ミルクの他、フォローアップミルク、サプリメント、ヨーグルト、飲むヨーグルト、ミルクタイプ機能性飲料などの食品のほか、ペットフード、化粧品に应用されている⁶⁾。海外でのLFの応用は、主に東南アジアで乳児用ミルク、欧米ではサプリメントで展開されてきたが、2009年にイタリアの研究グループが低出生体重児を対象とした敗血症予防に関する大規模臨床試験結果⁷⁾を報告したのをきっかけに、乳児用ミルクでの応用についてさらに注目が高まっている。

今後、LFだけでなく、あらかじめペプシン分解処理、抗菌活性やビフィズス菌増殖活性が高まったLF分解物の応用が考えられる。現在は、ペプチドをたんぱく質源とした乳児用ミルクや低出生体重児用ミルクに配合しているが、乳児用ミルク分野以外の更なる展開が考えられ



(Shin, Clin Oral Invest, 2011)

図3 LF+ラクトパーオキシターゼ錠剤の口臭抑制効果

る。また、LFは本来生体内で様々な機能性物質と共存している。例えば、唾液中にはLFのほかラクトパーオキシダーゼなどの成分が存在しており、これらの成分による口腔ケアの取り組みも行われている⁸⁾(図3)。また、母乳哺育児の大腸にはLFやLF分解物とともにビフィズス菌が共存している。今後、LFとその他の機能性物質との組み合わせによる機能研究および、その応用の進展が期待される。

- (5)消費者庁「食品の機能性評価モデル事業」の報告結果 pp64-68 (2012)
- (6)山内恒治. FFI JOURNAL 211:771-776 (2006)
- (7)Manzoni P. et al., JAMA 302:1421-1428 (2009)
- (8)Shin K. et al., Clin Oral Invest. 15:485-93 (2011)

参考文献

- (1)前野正久, 清澤功. 日本農芸化学会雑誌 37:729-723 (1963)
- (2)Bellamy W. et al., Biochim. Biophys. Acta 1121:130-136 (1992)
- (3)Wakabayashi H. et al., Curr Pharm Des. 9:1277-87 (2003)
- (4)Oda H. et al., Appl. Environ. Microbiol. 79:1843-1849 (2013)

腸溶ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果について

小野 知二

Tomoji ONO

ライオン株式会社 生命科学研究所

1. 背景 ～内臓脂肪低減効果の発見

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2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。一方、ラクトフェリン(以下LF)は、哺乳類の乳中に含まれる分子量約8万ダルトンの糖タンパク質であり、免疫調節作用、抗菌・抗ウイルス等の感染防御作用、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。

我々の研究グループにおいても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、LFに強い解毒作用があることを見出していた。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コレステロールや中性脂肪が高いこと等が報告されていた。我々は、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予めLF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出し

た。そして興味深いことに、LF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。

2. 脂肪細胞への作用と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出し、動物実験の結果を裏付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LFではその活性が消失することも明らかとなった(図1)。こうしたことから、LF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、LF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。そこで我々は、LFの腸溶加工技術を保有していた(株)NRLファーマより技術導入を行い、LFの内臓脂肪低減効果の研究を進めた。

3. 臨床試験による内臓脂肪低減効果の立証

LF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

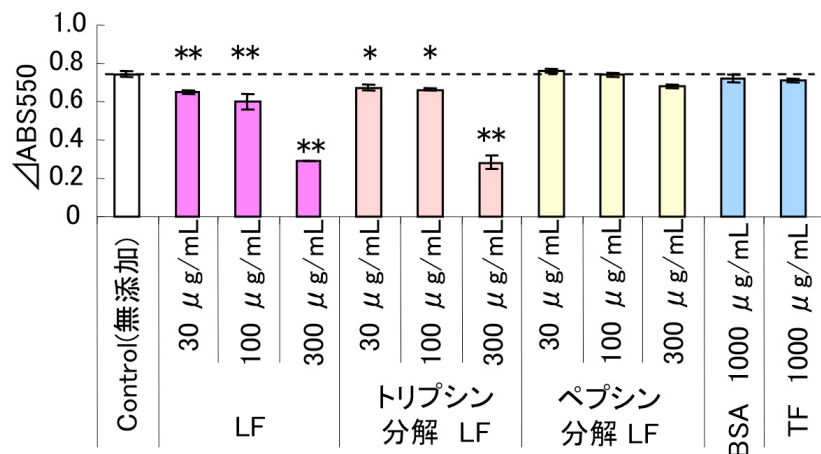


図1 LFおよびその分解物の脂肪蓄積抑制作用

LF、トリプシン・ペプシン分解LF、ウシ血清アルブミン(BSA)、トランスフェリン(TF)を前駆脂肪細胞に添加し7日間培養後、oil red Oにて染色、色素を抽出後吸光度を測定した(n=3)。*P < 0.05, ** P < 0.01 Dunnet t-test compared with control

表1 LFの内臓脂肪低減効果

項目		0週		8週		0-8週の差		P値 (repeated measures ANOVA)			P値 ANCOVA
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	time	group	time × group	
内臓脂肪面積 (cm ²)	プラセボ	116.6	49.1	114.8	46.7	1.8	11.7	0.0013	0.76	0.0087	0.0089
	LF	118.1	32.2	103.4	32.9**a	14.6	11.2				
皮下脂肪面積 (cm ²)	プラセボ	241.7	107.7	231.7	113.0	9.9	33.6	0.064	0.36	0.77	0.96
	LF	284.6	126.4	271.3	114.0	13.4	27.4				
全体脂肪面積 (cm ²)	プラセボ	358.3	133.7	346.6	132.1	11.7	36.6	0.0051	0.47	0.22	0.34
	LF	402.7	128.5	374.7	111.7**a	28.0	28.6				

^a0週との比較 (paired t test) で有意に減少** : p<0.01.

た。肥満傾向の日本人男女(内臓脂肪面積平均100cm²以上)に対して、LF腸溶錠群及びLF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300mg、8週間摂取してもらった。その結果、LF群では、プラセボ群と比較して、体重が2.5kg有意に減少し(P=0.013)、CT撮影による腹部内臓脂肪面積が12.8cm²有意に減少(P=0.0089)することを明らかにし、LF腸溶錠の内臓脂肪低減効果を科学的に立証した(表1)。また、本試験において有害事象は認められなかった。

4.作用メカニズムの解明

LFの内臓脂肪低減メカニズムとして、前述のように脂肪細胞への作用が示唆されていたので、本作用をベースに更なるメカニズム研究を進めた。まずラットを用いてLF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LF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。本結果より、LFが内臓脂肪中の脂肪細胞に作用し得ることを確認した。そこで、先に見出した脂肪細胞に対するLF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、LF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出した。一方、成熟脂肪細胞を用いて、脂肪の分解過程に対するLFの作用を検討した結果、LFが脂肪分解促進作用をも有することを新たに見出した。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

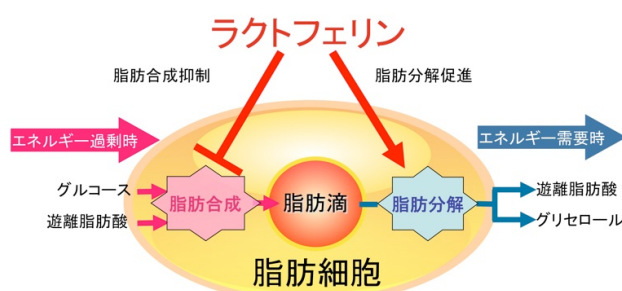


図2 LFの内臓脂肪低減効果 推定作用機序

するペリリピンの発現がLF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。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、LF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LF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(図2)。

5.謝辞

本研究は、京都府立医科大学 西野輔翼名誉教授、名古屋市立大学 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 吉田俊秀先生、北海道大学 宮下和夫教授、東京大学 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。また本研究に携わった、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。

編集後記

ラクトフェリン学会ニュースレター9号は、HFE/ifia2013の「日本ラクトフェリン学会セミナー」の開催報告とプロシーディングを中心にお届けします。ご存じのように、本学会は主にラクトフェリン研究の専門家である会員の方をターゲットに、隔年に学術集会を開催して情報発信を行っています。一方、学術集会を開催しない年度における学会の活動のあり方を理事会で討議した結果、ラクトフェリン研究者以外の広範囲の方に、ラクトフェリンの可能性を理解していただくため、今回の「日本ラクトフェリン学会セミナー」を企画しました。当日は、食品機能をテーマとした他のセミナーと時間的に競合するなか、用意された会場がほぼ満席になる盛況で、ラクトフェリン研究に対する関心の高さを実感しました。

今回のラクトフェリンセミナーの演題は、基礎から応用まで、ラクトフェリン研究の現状をよく反映していると思われましたので、セミナーの講師の先生方にプロシーディングの執筆をお願いし、本号に特集として掲載いたしました。このプロシーディングの内容はあくまでもおおまかな要旨ですので、個々のテーマについてご興味のある方は、学術集会のプロシーディングや、本ニュースレターのバックナンバーをご覧頂ければ幸いです。

最後になりましたが、お忙しいところ、字数制限の厳しい中、プロシーディングを執筆していただいた先生方に感謝申し上げます。

日本ラクトフェリン 学会ニュースレター 第9号 (2013年10月発行)

ニュースレター編集 日本ラクトフェリン学会 広報委員会

高山 喜晴

農業・食品産業技術総合研究
機構 畜産草地研究所

吉江 弘正

新潟大学大学院 医歯学総合
研究科 教授

島崎 敬一

北海道大学名誉教授

日本ラクトフェリン学会 事務局

〒232-0024

横浜市南区浦舟町4-57

横浜市立大学附属

市民総合医療センター

臨床研究推進センター

田中 克明

TEL: 045-261-5656

内線1871

FAX: 045-253-9902

E-mail:

lacto@yokohama-cu.ac.jp