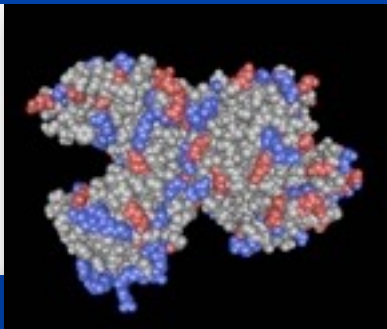


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第18号

2016年11月



巻頭言

母から子への贈り物

竹内 崇

Takashi TAKEUCHI

鳥取大学農学部 獣医臨床検査学教室

1. 巻頭言

母から子への贈り物 竹内 崇

2. 学会イベント報告

HFE / ifia JAPAN 2016

第4回「日本ラクトフェリン学会セミナー」開催報告 村越 倫明

3. ラクトフェリンセミナープロシーディング

- ラクトフェリンとそのペプチドの抗ノロウイルス作用 織田 浩嗣
- ラクトフェリンの皮膚への影響 野上 明日香
- 腸溶性マイクロカプセル化技術 (eMC)によるNASH予防ラクトフェリン飲料の開発 桑田 英文
- 腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果とその作用メカニズムについて 森下 聡

私とラクトフェリンとの出会いは今から20年ほど前に遡ります。当時、鳥取大学に着任された原田悦守先生は、新生子の消化管機能の生後発達について精力的にご研究されておりました。それからさらに6年ほど遡った平成元年当時、助手に採用されて間もない私は、動物の脳機能に興味を抱き、電気生理学的手法で脳機能の生後発達を解析しておりました。動物の種類によって在胎期間はかなり異なり、脳機能が未熟な状態で生まれるものや、生後数時間以内に起立して走り回る早熟なものもあります。牛は後者に属しますが、生まれて間もない子牛は母牛に母乳を要求し、母牛は子牛の体を舐めて愛情を注ぎます。このような情景を見ると、出生時の成熟度に関わらず、母乳と母親の愛情は子が順調に生育するために必須のものと考えておりました。原田先生が着任された後、“母乳”は消化管と脳の生後発達を支えるキーワードとして、原田先生と私の研究テーマの接点となりました。やがて、新生子の消化管から吸収される母乳成分の中からラクトフェリンに着目し、その機能解析を目標として研究を進めてきました。ラクトフェリンによる新規作用の発見という当時の目標は現在でも継続しており、20年が経過した今でも興味の尽きることはありません。

もう1つのキーワードである“母親の愛情”を客観的に評価することは困難ですが、子が健全に生育するためには重要な因子と考えられ、子の精神活動を解析することで、“母親の愛情”がどのような形で子に付与されるのかを今後も明らかにしていきたいと思います。授乳という行為は母親から子への栄養と愛情の供給であると同時に、子は母親への慈しみを哺乳という行動でお返ししていると考えれば、母親の愛情はますます深まり、子の成育にとって最良の環境が構築されるのではないのでしょうか。子からみると自己防衛、母からみると子育てによってもたらされる幸福感。全く逆のようにも思いますが、両者にとって相互に有益であると考えても差し支えないでしょう。この巧妙なしくみを成立させるため、ラクトフェリンは母と子の双方に影響を及ぼしつつ、母子の強い絆を結ぶ一助になっていると私は信じています。

HFE / ifia JAPAN 2016

第4回「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 所長

本学会は、東京ビッグサイトで開催されたHFE/ifa JAPAN 2016(第21回国際食品素材/添加物展・会議、日本食品化学新聞社主宰、来場者数;31,110人)に出展すると共に、初日の5月18日(水)に第4回「日本ラクトフェリン学会セミナー」を開催致しました。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に開催致しております。お陰様で今年も100名を超える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。

今回のセミナーでは、冒頭に本会理事長の島崎敬一先生より、基調講演として「ラクトフェリンの構造から機能を考える」と題して、ラクトフェリンの多機能性を説明するための作業仮説と、3Dプリンターを用いたラクトフェリンの立体構造模型についてわかりやすく解説していただきました。また、2015年11月2日(月)から6日(金)

まで名古屋市のウェスティンナゴヤキャッスルで開催されました第12回国際ラクトフェリン会議(<http://www.lactoferrin-conference.com/>)の大会長を務められました津田洋幸先生より、会議の概要について、ご報告いただきました。その後、国際会議のワークショップにて口頭発表された若手企業研究者に、ラクトフェリンの様々な機能に関する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。詳細につきましては、各講演者のプロシーディングをご参照頂ければと存じます。

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、大変ありがたいことであると存じます。

末筆となりますが、本セミナー開催にあたり、講演者の方々、スタッフの皆様の尽力に心から感謝申し上げます。



セミナー会場の様子



日本ラクトフェリン学会の展示ブース

ラクトフェリンとそのペプチドの抗ノロウイルス作用

織田 浩嗣

Hirotsugu ODA

森永乳業株式会社 素材応用研究所

1. ラクトフェリン摂取によるノロウイルス感染の抑制

ヒトノロウイルス(HuNoV)は感染性胃腸炎の主要な病原体で、発症すると腹痛、嘔吐、下痢などの症状が見られる。ラクトフェリン(LF)は幅広く病原性微生物に対して感染防御作用を示すことが知られ、LF摂取によるノロウイルス感染の抑制も報告されている。4歳以下の保育園児がLF配合食品(400mg/日)を16週間摂取した結果、期間中の便中ノロウイルス陽性率がLF群で対照群と比較して有意に低かった¹⁾(図1)。また、2012/13シーズンにLF(100mg)配合食品を日常的に摂取していた人では、摂取頻度が高い人ほど、医師からノロウイルス胃腸炎の疑いまたは確定と診断された人の割合が低かった²⁾(図2)。

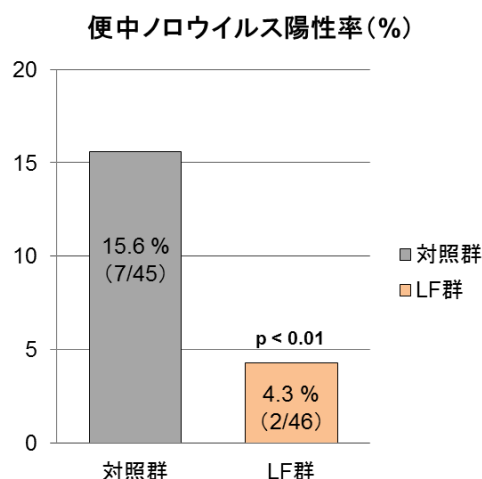


図1 LF配合食品摂取による便中ノロウイルス陽性率の低下

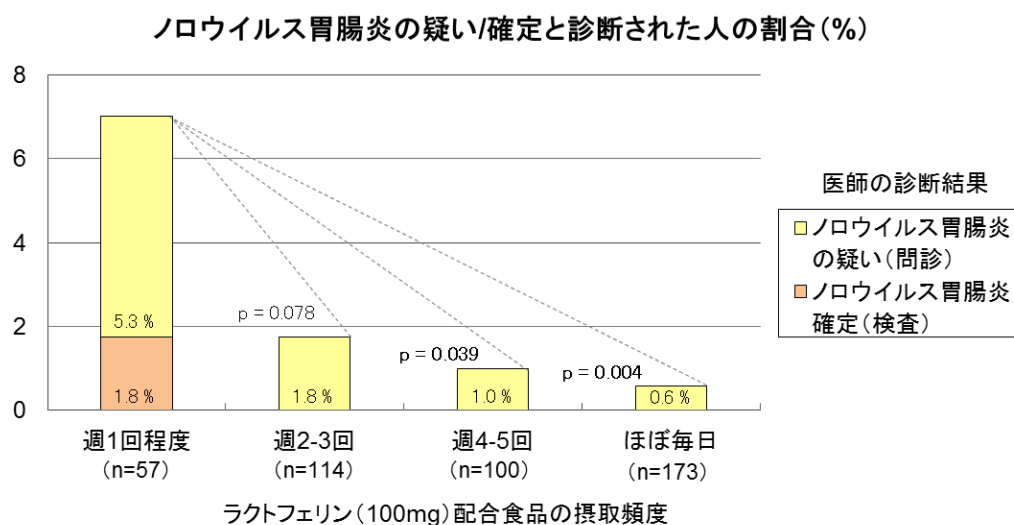


図2 LF配合食品の摂取頻度とノロウイルス胃腸炎の罹患率

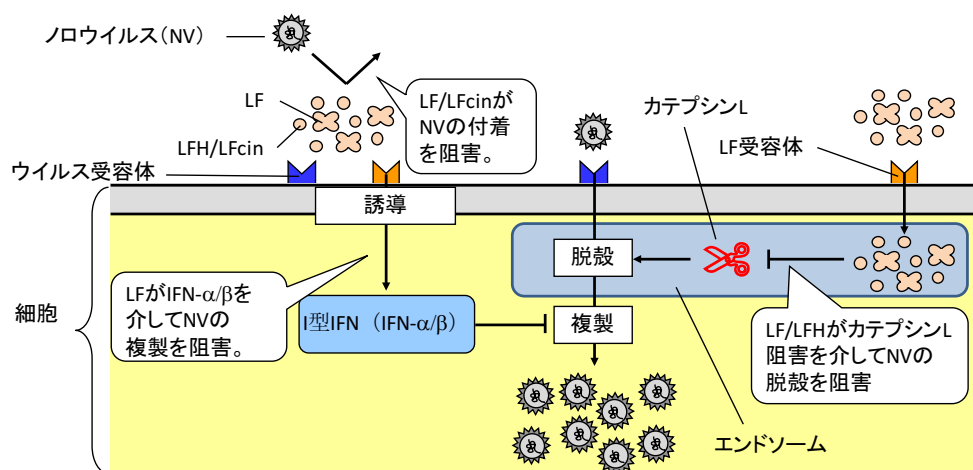


図3 LFとそのペプチドの推定ノロウイルス感染抑制メカニズム

2. ラクトフェリンとそのペプチドのノロウイルス感染抑制メカニズム

口から入ったノロウイルスは小腸に到達し、M細胞でトランスサイトーシスされ、パイエル板や粘膜固有層の免疫細胞に感染すると考えられている³⁾。一方、摂取したLFもまた、一部が胃で分解され、LFとそのペプチドの混合物が小腸に到達し、ウイルスまたはその標的細胞に作用し、感染を抑制すると考えられている。*In vitro*研究では、HuNoVを培養細胞に感染させることは技術的に難しいため、同じカリシウイルス科のネコカリシウイルス(FCV)や同じノロウイルス属のマウスノロウイルス(MNV)が代替ウイルスとして研究されている。McCannらの研究では、LFは標的細胞、LFをペプシン(胃内消化酵素)で分解して生じるペプチドのラクトフェリシン(LFcin)はFCVに付着し、FCVの標的細胞への付着を阻害することが示唆されている⁴⁾。また、石川、藤野らの研究では、LFがMNVの標的細胞への付着を阻害すること、LFとLFペプシン分解物(LFH)がMNVの複製を阻害することが示唆され、複製阻害のメカニズムとして、LFが抗ウイルス性サイトカインのI型インターフェロン(IFN- α/β)の産生を亢進すること、LFとLFHがエンドソームでのMNVの脱殻を触媒するカテプシンLを阻害することが示唆されて

いる^{5, 6)}。*In vivo*研究では、健康マウスにLFを経口投与すると、ノロウイルスの感染部位と考えられている小腸パイエル板でIFN- α/β の産生が亢進することが報告されている⁷⁾。

以上の知見から、LFを摂取すると付着阻害、複製阻害などによりノロウイルス感染を抑制することが示唆された(図3)。今後はHuNoVを用いて詳細を検討していきたい。

参考文献

- 1) 森内ら, 第50回日本臨床ウイルス学会, 2009.
- 2) Wakabayashi et. al., J Infect Chemother 20(11):666-71, 2014.
- 3) Karst et. al., PLoS Pathog 11(2):e1004626, 2015.
- 4) McCann et. al., J Appl Microbiol 95(5): 1026-33, 2003.
- 5) Ishikawa et. al., Biochem Biophys Res Commun 434(4):791-6, 2013.
- 6) Fujino et. al., XIIth Int Conf on Lactoferrin, 2015.
- 7) Kuhara et. al., J Interferon Cytokine Res 26(7):489-99, 2006.

ラクトフェリンの皮膚への影響

野上 明日香

Asuka Nogami

サラヤ株式会社 バイオケミカル研究所

皮膚は、表皮と真皮から構成されており、表皮中には表皮細胞が、真皮中には線維芽細胞と細胞外マトリックスが含まれている。ラクトフェリン(Lf)の皮膚への作用は表皮細胞や、線維芽細胞を用いた研究で示されており、外用剤としての有効性が注目されているが、実用化された例はこれまでなかった。本稿ではヒト正常皮膚由来の表皮細胞や線維芽細胞へのLfの作用と、Lfを配合した化粧品のシワ改善効果を評価した結果を紹介する。

1. Lfの皮膚への作用

まず、0.001%の濃度でLfを作用させると表皮細胞のヒアルロン酸産生量が上昇することを確認した。ヒアルロン酸は表皮において保水効果を有することから、Lfは皮膚の乾燥を改善すると予想された。次に、Lfの線維芽細胞への作用として、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリックス構成成分のmRNA発現を促進するこ

とを見出した。特にエラスチンの前駆体であるトロポエラスチン(tropoelastin)のmRNA発現が顕著に増加した(図1)。真皮の細胞外マトリックス成分は、肌のハリや弾力を保つのに重要であり、紫外線や酸化的ストレスによってダメージを受けると、シワやたるみを生じてしまう。したがって、細胞外マトリックスのmRNA発現促進により、シワやたるみを改善する効果が期待される。

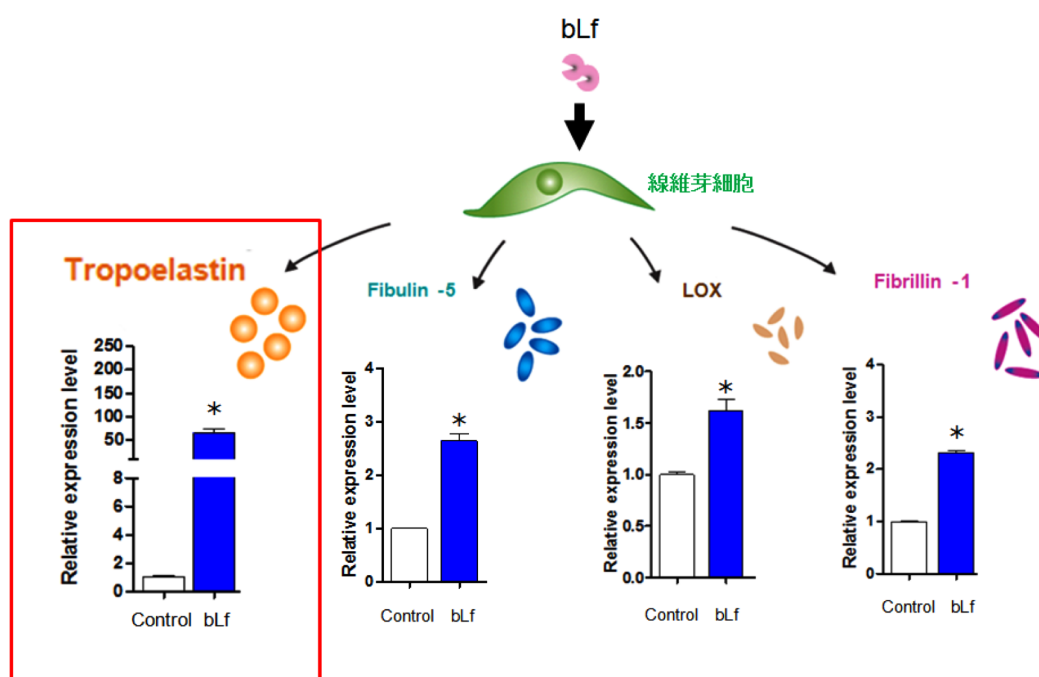


図1 Lfの皮膚への作用

*Tropoelastin、Fibulin-5、LOX、Fibrillin-1はいずれもエラスチン構成成分。文献1より(一部改変)

目尻のしわの変化

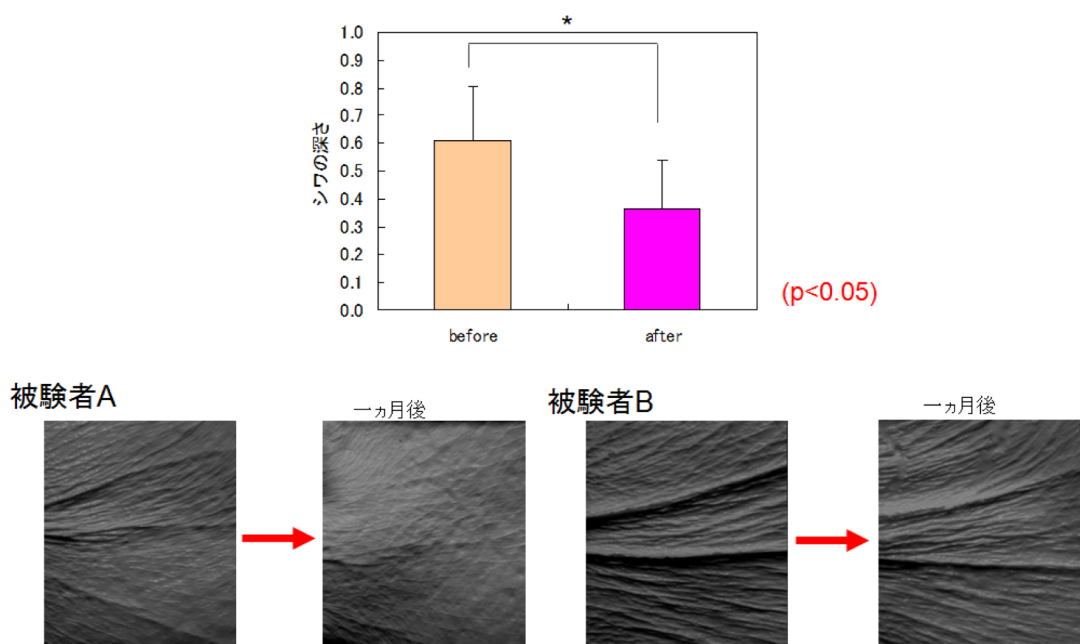


図2 Lf配合化粧品の皮膚への作用

2. Lf配合化粧品の効果

化粧水からクリームまでの機能を兼ね備えた化粧品に、シワやたるみ改善が期待できるLfを配合することで美容の機能も付加させたオールインワン化粧品(Lf配合化粧品)を開発した。このLf配合化粧品の効果を検証するために、11名の女性被験者に1カ月間連続使用してもらい、その使用前後の顔面皮膚状態を評価した。その結果、使用前と比較して1カ月使用後の皮膚水分量が上昇し、角層バリア機能の指標である経皮水分蒸散量(TEWL)が抑制されたことから、保湿効果とバリア機能改善効果が認められた。

一方、目尻は紫外線などによって小じわが生じやすいことが知られている。そこで、Lf配合化粧品のシワ改善効果を検証するために、目尻のシワも評価した。その結果、Lf配合化粧品の使用によって、使用前と比べてシワの深さが有意に改善された(図2)。このように、Lfを配合した化粧品はシワ改善効果も有することが示された。

3. まとめ

Lfの皮膚への作用について評価した結果、表皮についてはヒアルロン酸の合成を促進し、真皮については細胞外マトリックス構成成分のmRNA発現を促進することを見出した。また、Lf配合化粧品の1か月間使用すると、使用前と比べて目尻のシワが顕著に浅くなったことから、皮膚状態を改善する効果が実証された。

参考文献

- 1) Ishii N, Kobayashi T, Matsumiya K, Ryu M, Hirata Y, Matsumura Y, Suzuki YA : Transdermal administration of Lactoferrin with sophorolipid. Biochem Cell Biol 90 : 504-512, 2012.

腸溶性マイクロカプセル化技術(eMC)による NASH予防ラクトフェリン飲料の開発

桑田 英文

Hidefumi KUWATA

株式会社NRLファーマ

ラクトフェリン(LF)を分解させずにレセプターの存在する小腸まで届けるため、pH応答性の素材で被覆した腸溶性錠剤(eLF錠剤)が市販されている。この技術をより広範囲な剤形へも適用すべく、腸溶性マイクロカプセル化(eMC)技術を新たに開発した。ここでは、eMC技術を応用した非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)予防飲料の製品開発事例について、その概要を紹介したい。

1. 背景と目的

国内で100–300万人が罹患しているといわれるNASHは今後肝細胞がんの主要原因の一つになるといわれており、有効な予防治療法の開発が待たれている。eLF錠剤を用い高齢者の免疫応答の増強や脂質代謝改善作用に関するランダム化比較試験が行われ、比較的低用量(300mg/d)での有効性が確認されている。

このような効果に加え長期投与しても副作用がほとんどないことから、NASHを予防する候補薬剤としてLFを考え、新たな剤形を開発し効果を確認することにした。患者や予備群が多い疾患に用いることを想定した場合、錠剤だけでなく日常的に摂取する液剤や一般食品へもLFを添加できる技術が望まれる。しかしながら、分解や変性しやすいタンパク質を経口投与後にも保護する技術は錠剤やハードカプセルといった剤型への適用に限られ、液剤等に適用することは困難があった。

2. 技術課題

分解・変性しやすい生理活性物質をカプセル被覆材を用いて微細なカプセル中に閉じ込め保護することで(マイクロカプセル化)、製品中や胃腸管内での安定性を付与することが、古くから考えられてきた。小さなカプセル

を作成すれば、カプセルは水に浮遊でき、LFを保護したまま飲料等に添加できる。しかしながら、カプセルの粒径を小さくするに従い粒子単位体積あたりの表面積が増大し、被覆材と生理活性物質の実用的な比率では生理活性物質を保護することが難しかった。マイクロカプセルの形成には液相でのリボソーム化や物質の結合といった反応が行われるが、乾燥した粒子を得るには別に乾燥工程を設ける必要もあり、特にコスト面での課題があった。

3. 腸溶性マイクロカプセル化技術 (eMC技術)

我々は被覆する為の結合反応と乾燥工程を連続的に行う新規な方法を開発した。これは、それぞれ結合しゲル化する被覆材(例えば、アルギン酸とカルシウム、キトサンとフィチン酸等)を含む溶液を別々の流路から噴霧し、空間で衝突させ液滴を形成させると同時に乾燥を開始する方法である。人工イクラのような巨大なカプセルを作る方法に液中硬化法があるが、この反応を気相の小さな液滴中で行う方法でもある(図1)。

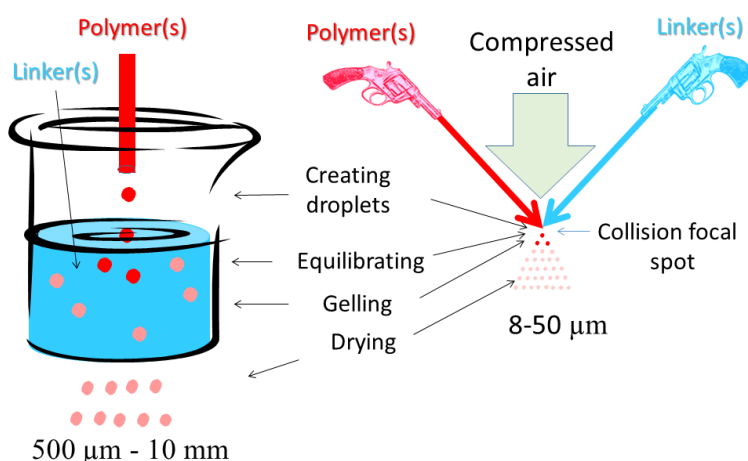


図1 液中硬化法とeMC法の比較

人工イクラ等で使われる液中硬化法(左)とeMC法(右)を模した。高分子のポリマー(赤色)と低分子のリンカー(青色)の結合によりゲル化(薄紅色)が起きる。液中硬化法では乾燥した粒子を得るためには、更に別工程が必要になる。

液体衝突に用いる圧搾空気圧を変えることでマイクロカプセルは8-50 μmの範囲で平均粒径を調整可能であり、流動性の高い粒子や水溶液中で沈殿せずに浮遊しやすい粒子を作ることができた。装置メーカーが保有する別の特許により設計されるものであるが、円筒外周に沿って配置された専用の多流体ノズルと噴霧乾燥機を用いれば、乾燥体として年間10-100トンの生産も可能である。

4.eMC-LFの効果とNASH予防飲料の開発事例

前述の一般的な被覆材を組み合わせた流路にLFを加え微粒子を作成し回収した。粒子は局方の溶出試験液中で腸溶性を示した(以下、eMC-LF)。対照である通常のLFがペプシンで完全に酵素消化される条件下において、eMC-LF中のLFはほとんど消化されず、カプセル化により酵素消化耐性が付与されたことが分かった。ラットにeMC-LFを経口投与した場合にも、酵素消化耐性が観察された。NASHモデルマウスにeMC-LFを投与したところ、肝臓繊維化のマーカーであるM2BPGiが対照群に比べ低下した(図2)。

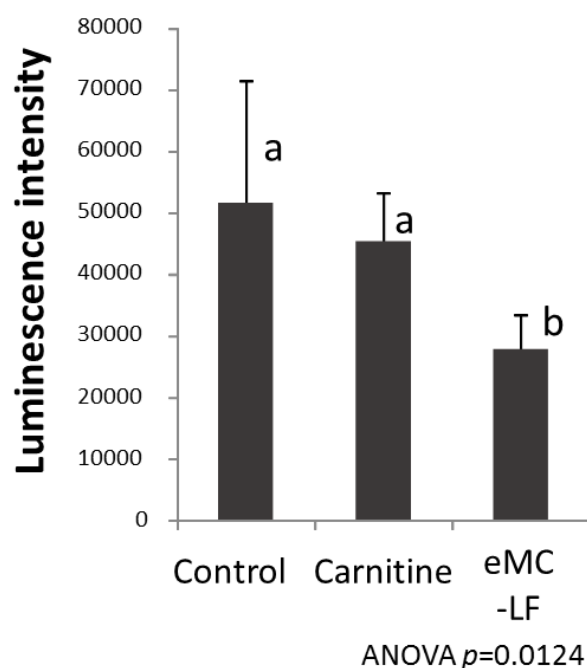


図2 NASHモデルマウス中の血中M2BPGi濃度

NASHモデルマウス(STAMマウス)各群5匹に4週齢より高脂肪食を与え、カルニチン(250 mg/kg)又はeMC-LF(300 mg/kg ラクトフェリンとして)を5週齢より投与した。肝臓の線維化が顕著になる9週齢に血中M2BPGi濃度を測定した。カルニチンは脂肪燃焼を促進しNASHを予防するポジティブコントロールとして投与した。

eMC-LFを含む粉末飲料を水に懸濁した後に、胃模倣液に続いて腸模倣液でインキュベーションしたところ、飲料液中と胃模倣液中にLFはほとんど溶出されず、腸模倣液にのみ溶出され、eMC-LFの腸溶性が飲料へ添加後も保たれていた。顆粒製造時の加熱や錠剤の打錠圧といった一般的な製剤加工でもeMC-LFの腸溶性は影響を受けなかった。メタボリックシンドロームが疑われる患者へeMC-LFを含む飲料またはプラセボ飲料を6ヶ月投与する予備的な試験を行い、内臓脂肪や血液中の中性脂肪等の低減を確認した。腸溶性試験と酵素消化耐性試験法はキット化し、サプリメントや食品に添加した後にも各製品の開発者がeMC-LFの品質を評価できるようにした。加熱耐性の付与や大腸送達等の溶出特性のバラエティ付与がeMC技術の今後の課題である。

5. まとめ・謝辞

eMC技術によりLFは活性を保ったまま腸溶性マイクロカプセル化でき、一部のサプリメントや食品への添加が可能となった。eMC技術は剤型を多様化するだけでなく、例えばLFと胃で溶解分解されなければならないカルシウムやコラーゲンといったサプリメント素材と組み合わせる製品開発をも容易にする。今後、eMC技術を始めとした技術革新によってLFの需要が更に高まり、LFに関する多くの基礎・臨床研究が行われることを期待したい。

本研究は、NEDOのイノベーション実用化開発費助成金により、研究費の一部の助成を受けたものである。本研究開発を進めるにあたりご指導を頂いた新潟大学田中眞人名誉教授及び田口佳成准教授、並びに装置運用に関する助言を頂いた藤崎電機株式会社及び顆粒剤を製作頂いたアリメント工業株式会社に感謝いたします。

STAMIはSMCラボラトリーズ株式会社の登録商標です。eMC、eLF及びイーエルエフは株式会社NRLファーマの登録商標です。

腸溶性ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果とその作用メカニズムについて

森下 聡

Satoru MORISHITA

ライオン株式会社 生命科学研究所

1. 腸溶ラクトフェリンの内臓脂肪低減作用について

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満に加え、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、動脈硬化性疾患の発症リスクを高めるリスクファクターとして重要視されている。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。当社では、腸溶ラクトフェリン（以下、LF）の内臓脂肪低減作用に関して研究を進めている。これまでに、肥満傾向の日本人男女（内臓脂肪面積平均100cm²以上）を対象とした二重盲検群間比較試験を行い、腸溶LF（LFとして1日に300mg）を8週間継続摂取することにより、有意に内臓脂肪面積が低減することを明らかにしている（図1）¹⁾。また、本試験において有害事象は認められなかった。

2. LFの脂肪細胞に対する作用

上記結果を得て、我々は腸溶LFの作用機序を明らかにするため、げっ歯類を用いて、経口摂取したLFの体内動態を解析した。その結果、LFは血中や他の臓器ではほぼ検出されず、内臓脂肪の一種である腸間膜脂肪において主に局在することを明らかにした²⁾。

本結果を受け、腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞まで分化させ、本細胞を用いて脂肪分解に対するLFの作用を詳細に解析した。その結果、LFの添加により、脂肪細胞を培養している培地中のグリセロール濃度が有意に上昇したことから、LFが脂肪分解促進作用をも有することを見出した³⁾。

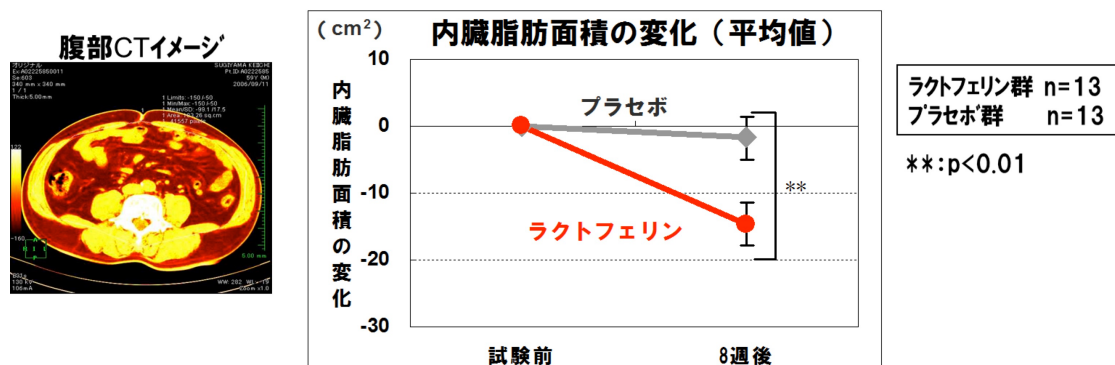


図1 腸溶LF摂取による内臓脂肪低減作用

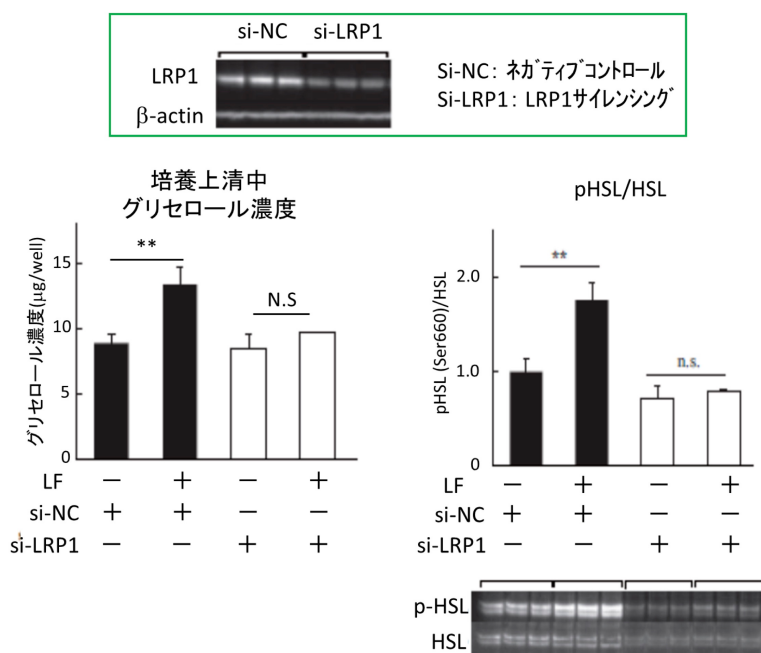


図2 LFの脂肪分解促進作用に対するLRP1受容体の関与

次に、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へのLFの作用の詳細を明らかにするため、シグナル伝達に重要な各タンパク質の活性化を解析した。その結果、脂肪分解の実行因子であるホルモン感受性リパーゼ(HSL)のリン酸化亢進やHSLリン酸化の誘導因子であるPKAのキナーゼ活性の増加を見出した。更に、LFの受容体として知られるLow density lipoprotein receptor Related Protein 1 (LRP1) 受容体の下流シグナル経路も活性化していることに着目し、脂肪分解促進作用にはLRP1受容体が関与しているとの仮説を構築した。LRP1受容体のサイレンシング(発現抑制)処理による仮説検証の結果、LFによる培養上清中のグリセロール濃度の増加効果が消失し、LFの脂肪分解促進作用が認められなくなった(図2)⁴⁾。この時、HSLのリン酸化増強効果も消失していることも確認した。このことから、LFの脂肪分解促進作用には、LRP1受容体が関与していることが明らかとなった。

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、医療法人親友会島原病院 糖尿病内科部長 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、横浜市立大学 平野久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。

参考文献

- 1) Ono, T *et al.* Br J Nutr 104, 1688-1695 (2010).
- 2) Ono, T *et al.* Br J Nutr 105, 200-211 (2011).
- 3) Ono, T *et al.* Biosci Biotechnol Biochem 77, 566-571 (2013).
- 4) Ikoma-Seki, K *et al.* PLoS One 10, e0141378 (2015).

第7回学術集会津田賞・富田賞 受賞者の決定について

2016年10月30日に開催された本会の第7回学術集会(2016年度臨床ラクトフェリン研究会と共催)で発表演題を対象に、日本ラクトフェリン学会賞(津田賞・富田賞)の選考を行い、下記の方々が受賞されました。ここに報告申し上げます。

日本ラクトフェリン学会賞・津田賞

- ・ 守屋孝洋 (東北大学大学院薬学研究科)

マウス体内時計の光同調に対する牛由来ラクトフェリンによる促進作用機序の解析

日本ラクトフェリン学会賞・富田賞

- ・ 中村佳菜恵 (ライオン株式会社生命科学研究所)

褐色脂肪細胞におけるラクトフェリンのエネルギー消費促進作用の検討

- ・ 水木将 (信州大学医学部)

ラクトフェリン摂取による冬季の感染症予防効果-幼稚園、保育園職員を対象とした二重盲検ランダム化比較試験から-

日本ラクトフェリン
学会ニュースレター
第18号 (2016年11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 畜産研究部門

竹内 崇
鳥取大学農学部
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

〒467-8603
名古屋市瑞穂区田辺通 3-1
名古屋市立大学
津田特任教授研究室
担当：鵜飼知里

lacto@phar.nagoya-cu.ac.jp
TEL & FAX : 052-836-3497