

前回は、まだ二重盲検試験は実施していませんが、ラクトフェリン（LF）が花粉症の治療・予防に有用であること、花粉症に対する作用機作として、アレルギーの即時相と遅発相の双方を抑制することを紹介しました。すなわち、（1）LF はヒト及びヒツジのマスト細胞表層の IgE 受容体同士が架橋されることにより起こる細胞内顆粒からのケミカルメディエーター放出を抑制する（2）LF はメディエーターの一つであるトリプターゼの活性を阻害する（3）LF によるトリプターゼ活性の阻害は、トリプターゼからヘパリンを奪い、四量体を不活性の単量体に解体するためである（LF はヘパリンと高い親和性で結合する性質がある）（4）ヒドロキシラジカルの産生を抑制し、低比重リポ蛋白粒子（LDL）の酸化を防ぐため局所への炎症細胞の集簇を阻止し遅発相を抑制する……等を述べました。今回は LF の花粉症に対する有効性を支持する“LF の経口吸収”、“LF の IgE 産生阻害”、“LF によるヘルパー T 細胞の Th1 への分極効果”について説明します。

LF の経口吸収

LF は分子量が 8 万ダルトンを越えるタンパク質です。完全な分子構造を維持したままで

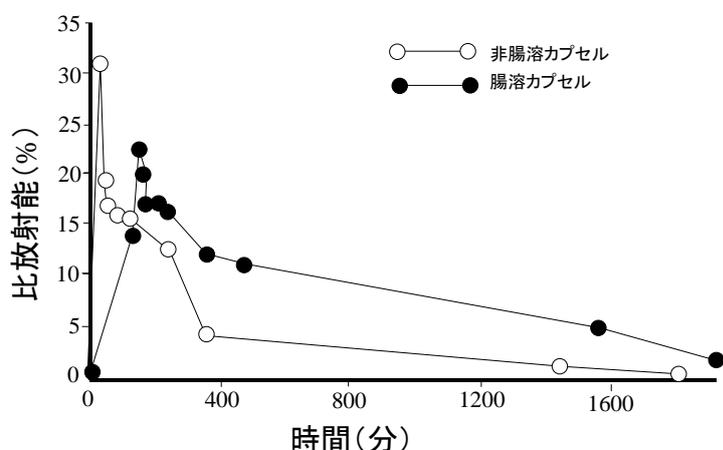


図1. 腸溶（●）と非腸溶（○）ヒト ^{125}I -標識ラクトフェリンを経口投与したヒトの血中放射能推移

ヒトラクトフェリン遺伝子を組み換えた transgenic cow の乳から採取したヒトラクトフェリンを ^{125}I ヨードで標識し、標準ハードカプセルおよび腸溶ハードカプセルに充填して経口投与。試験は健康人ボランティア 10 名が参加する二重盲検クロスオーバー方式で行われ、経時的に採血して血中に放射能を投与全放射能で割って%表示した。

ドカプセルに充填して経口投与しました（図1）。この試験¹⁾は 10 名のボランティアが参加するクロスオーバー方式です。図1の縦軸は血中にあらわれた放射能を摂取全放射能で除してパーセント表示しました。図からわかるように血中放射能推移は、両者のあいだで大きく異なります。通常のカプセルに充填すると（○）、カプセルは胃の中で崩壊し、胃酸

消化管から取り込まれ、さらに血液・脳関門を越えて脳脊髄液にあらわれることは、にわかに信じがたいことです。そこで LF がヒト消化管からも確かに吸収されると言う証明をこころみました。今日ではヒト LF 遺伝子を組み換えたトランスジェニック乳牛にヒト LF を泌乳させることができます。こうなるとトランスジェニック乳牛は、まさにヒトタンパク質の合成工場です。ヒト LF (th-LF) のチロシン残基を放射性ヨード ^{125}I -で標識し、通常のカプセルあるいは腸溶性ハー

存在下に LF はペプシンにより半減期 6~7 分で分解されます。LF が分解されて生じたペプチド断片が十二指腸に流入すると、腸液が吹き付けられて中和されると同時に、ペプチド断片はタンパク分解酵素によりさらに細断され吸収されます。血中放射能のピークである約 45 分後には 30% を越える放射能が血液中に移行しますから、吸収は非常に速やかです。さらに、吸収された断片は、タンパク質合成の素材として利用されるので、放射能は素早く血中から衰減し身体の蛋白に取り込まれて行きます。そのため、血中に残存する放射能は 6 時間以内に全放射能の 5% 以下になります。

一方、th-LF を腸溶カプセル (●) に充填して摂取すると、血中放射能のピークは投与約 3 時間後で、ピークの高さは通常のカプセルよりやや低い 23% です。つまり、カプセルが

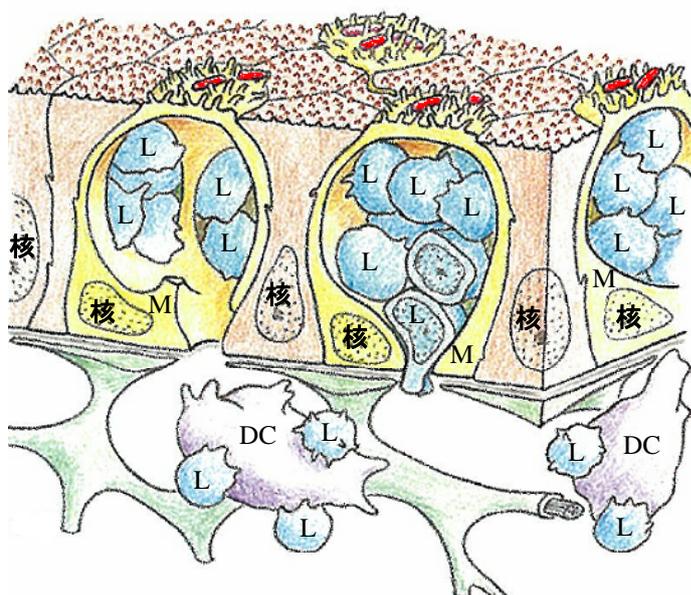


図 2. パイエル板と M 細胞

L; リンパ球、M; M 細胞、DC; 樹状細胞、核; 細胞核
藤田恒夫、牛木辰男共著; カラー版“細胞紳士録”、岩波書店、2000 年刊行より抜粋

シの分泌型 IgA を用いました。その実験でわかったことは、後者は経時的に粘液に溶け込むのに対し、LF は粘液にほとんど溶け込まないということでした。つまり、経口摂取した LF は小腸まで到達したとしても、粘液のバリアーを突破し小腸粘膜には浸透しません。LF は粘液に覆われていないパイエル板及び絨毛突端の M 細胞表層に発現する LF 受容体に到達し、リンパ管へと吸収されると推定されます。図 2 に示すように M 細胞はアーチ型をした袋状の細胞で、内部にリンパ球を抱き込んでおり、さらにその下の免疫細胞集団と情報交換をしています。驚くべきことに、異物、ウイルスや細菌が M 細胞表面に接着すると、それらは無差別に細胞内に取り込まれ、分解せずに M 細胞を通り抜けます。例えば、表面に接着した赤い棒として例示した桿状の細菌は、M 細胞を通り抜けることができます。Probiotics と呼ばれる乳酸菌およびビフィズス菌はこの経路で取り込まれ、リンパ球および

小腸下部に到達する頃に崩壊し放射性 LF の吸収が始まることを示唆します。特徴的なことは、投与 12 時間後でも 10% を越える放射能が血中に残存することです。この事実は LF 分子が小腸下部に到達すると、粘液で被覆されていない腸管粘膜から急速に取り込まれ、リンパ球、樹状細胞 (DC) およびマクロファージの LF 受容体に結合していることを示唆しています²⁾。

LF はどこから吸収されるか

LF 含有緩衝液にウシの小腸を浸し、掻き取った粘液にどのくらい溶け込むかを測定したことがあります (未発表)。対照としてはウ

食細胞を刺激して自然免疫を賦活すると考えられています。M 細胞を通り抜けた LF は直下の空洞と近傍に待機したリンパ球や DC、マクロファージ等にトラップされ細胞内に取り込まれます。これらの免疫細胞表層に LF 受容体が存在するからです。トラップを免れたごく僅かの LF は腸間膜リンパ管を経由して大循環に流入し、血液脳関門を越えて脳脊髄液にも流入すると考えられます³⁾。つまり、腸溶カプセルに封入して内服された LF が、血中から容易に衰減せず、長時間にわたって存在し続ける原因は、リンパ球や DC と言った免疫細胞に取り込まれ、受容体経由で細胞質や核膜を通り抜け遺伝子に直接結合するためと思われ⁴⁾。このように腸管粘膜で LF 刺激を受けた免疫細胞が、大循環に流入し全身をパトロールして異物の侵入に備え、異物が発見されると現場に駆けつけるのですから、免疫は実にダイナミックな現象です。

免疫グロブリン E 産生に及ぼす LF 経口投与の影響

図 3 は卵白アルブミンあるいは高カゼイン飼料により誘発したマウスの高 IgE 血症に対する LF 経口投与の影響を調べた結果です⁵⁾。いずれの場合でも、LF は高 IgE 血症を有意に抑制しています。なぜ LF の経口投与が、IgE 産生を抑制するのか、そのメカニズムを考えてみました。

経口投与した LF が、細胞性免疫を強化し感染防御能を賦活した実験成績は幾つか報告されています。例えば、結核菌の細胞内感染成立は、細胞性免疫と Th1 型 T 細胞の強弱に依存しています。ここでは LF がウシ型結核菌 BCG の免疫原性を強化するかどうかを検討した Kruzell 等の報告を紹介し⁶⁾。彼らはマウスから採取したマクロファージを *ex vivo* で LPS 刺激した際に産生される IL-12 は、LF 投与により増加することを見いだしました。すなわち、LF をアジュバントとして経口投与したマウスに加熱殺菌 BCG を 1 回免疫した

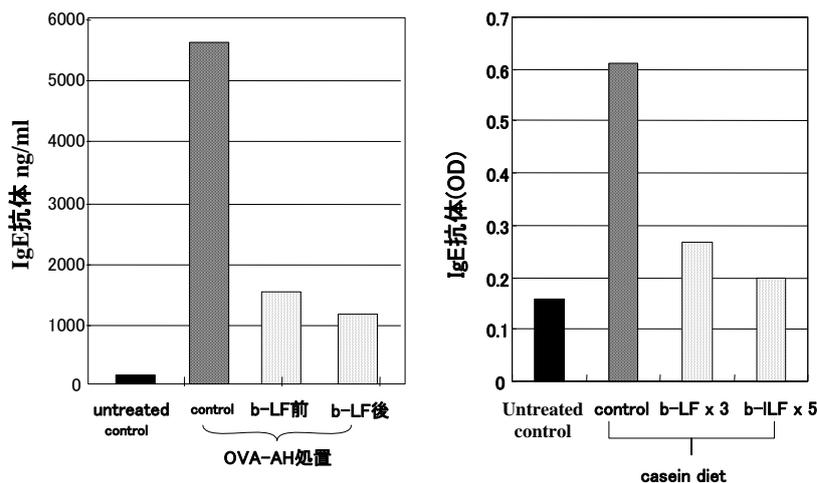


図 3. ラクトフェリンによる免疫グロブリン E の産生抑制

図右は卵白アルブミンと水酸化アルミを BALB/c 系マウスの腹腔内投与して高 IgE 血症を誘発した場合。図左は高カゼイン飼料を与えて、高 IgE 血症を誘発した場合。ラクトフェリンは 300 mg/kg を経口投与した。

だけで、BCG に対する脾臓細胞の増殖反応が増強され、IL-12 産生を増加させて IL-12/IL-10 比を増大させることがわかったのです。この現象は LF が Th0 を Th1 へ分極させることを示唆します。それに加え、LF をアジュバントとして経口投与した BCG 免疫マウスの脾臓細胞は、結核菌抗原に対しフロイントの完全アジュバントで免疫したマウスから得

た脾臓細胞に近い反応性を示しました。LF をアジュバントとして投与した群は対照と比べの IFN- γ 産生能が有意に上昇します。一般化して言えば、LF はマウスにおいて細胞性免疫の反応を亢進させるのです。LF を経口投与し BCG 死菌で免疫したマウスに強毒結核菌を噴霧して経鼻感染させると、LF をアジュバントとして使わなかった対照と比べ、肺の結核菌数が有意に少なく、脾臓への結核菌の分布も少数でした。この実験から LF が細胞性免疫を Th1 型にシフトさせること、アジュバントとして作用し BCG の免疫原性を強化すること、強毒結核菌の感染から宿主を保護することがわかります。LF は明らかに細胞性免疫を強化するのです。図 3 に示された LF によるマウスの IgE 産生抑制は、Th1/Th2 細胞のバランスを変化させ、ヘルパー T 細胞を Th1 優位に誘導する性質があるためではないでしょうか。

津田等⁷⁾が報告するように、LF は腸管壁で IL-18 を強く誘導する性質を持っています。図 4 左は LF300 mg/kg 経口投与したマウスにおける血中 IL-18 濃度の推移を示します。LF を経口投与しないと、IL-18 は血中からほとんど検出されませんが、経口投与すると投与 6 時間後をピークとして高い濃度の IL-18 が検出されるようになります。さらに、腹腔内マクロファージを LF 含有培地で培養すると、濃度依存性に IL-18 が産生されることがわかります。ちなみに、IL-18 は、強力な IFN- γ 産生誘導作用があるので、IFN- γ 誘導因子と呼ばれていました。その後の解析から IL-18 は IFN- γ 産生誘導のみにかかわるサイトカインではなく、それ以外の多様な生理活性を持つことが明らかになり、さらにその受容体も既知

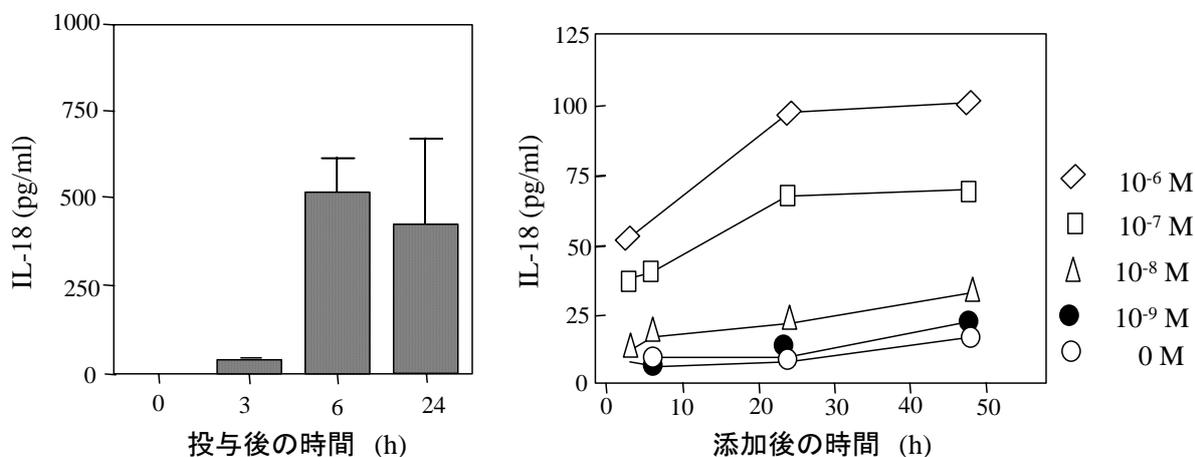


図 4. ラクトフェリン投与マウスの血中における IL-18 濃度の増加と培養マクロファージによる IL-18 の生産増加

図左はマウスに 300 mg/kg のラクトフェリンを経口投与し、経時的に採血して血中の IL-18 濃度を測定した。図右は腹腔内マクロファージをラクトフェリン含有培地に培養し、培地に産生されるラクトフェリン量を測定した。

のサイトカイン受容体と異なるため、IL-18 と呼ばれるに至った経緯があります。IL-18 が産生されるのは、マクロファージ、樹状細胞などの自然免疫系細胞です。つまり、M 細胞の空洞から漏れ出た LF は、その直下に流れ着いたマクロファージ、DC 表層の受容体に結合し、それが刺激になって IL-18 産生が増大するのでしょうか。図 2 に示すモデルが体内でもはたらき、経口摂取した LF でも自然免疫を刺激して Th1 優位で細胞性免疫が賦活され

た状態が作り出されているのです。

LF はヘルパーT 細胞を Th1 優位にシフトさせる

これまでお話ししたように LF はパイエル板と小腸吸収上皮の絨毛突端に存在する M 細胞から体内に取り込まれ、リンパ球と DC の受容体に結合してから核内に移行し、DNA に結合する一種の転写因子として作用している可能性が大きいのです。Guillen 等はマウスにヒト・ラクトフェリン遺伝子を導入したトランスジェニック・マウスをつくり、ヒト・ラクトフェリン (h-LF) が発現したマウスに黄色ブドウ球菌 (黄ブ菌) を感染させて免疫系表 1. 黄色ブドウ球菌を感染させたヒト・ラクトフェリン遺伝子を導入 DBA マウスの血中ヒトおよびマウス。ラクトフェリン

感染後日数	hLFトランスジェニック(+/-) (ng/ml)		Congenic同腹仔(-/-) (ng/ml)	
	hLF	mLF	hLF	nLF
0	302±104	106±23	ND	166±16
3	241±100	258±155	ND	260±89
7	277±68	251±127	ND	170±77

ND: 検出不能。hLF; ヒトラクトフェリン、mLF; マウスラクトフェリン

に及ぼす影響を調べました。表 1 に黄ブ菌感染トランスジェニックマウスにおける h-LF とマウスラクトフェリン (m-LF) の血中濃度を示します。トランスジェニック・マウスにはヒトおよびマウス双方の LF が発現していることがわかります。それに対し、congenic 同腹仔は当然のことながらヒト LF は検出されません。つまり、トランスジェニックマウスはヒトおよびマウスのラクトフェリンが同時に産生される状態にあります。

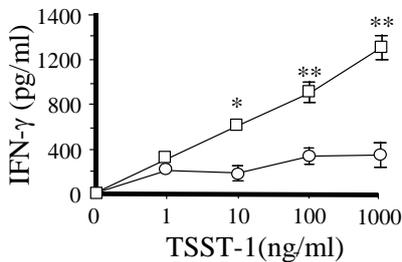
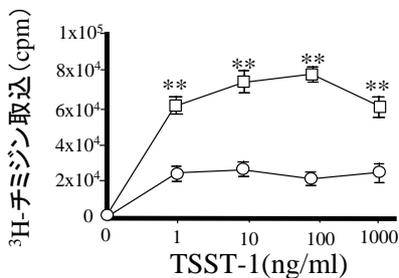
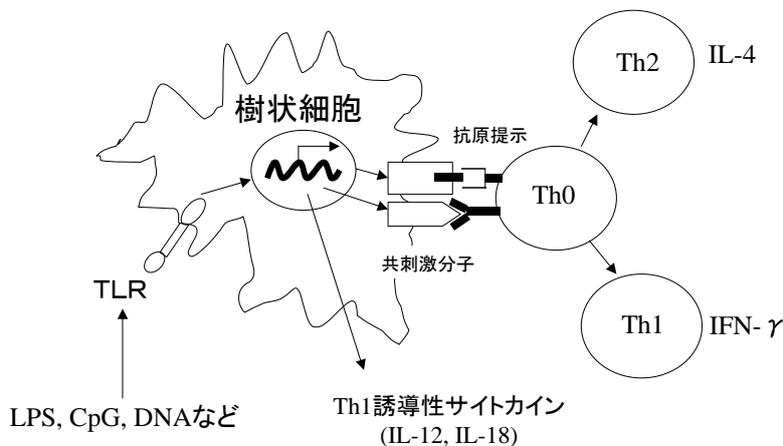


図 5. マウス脾臓細胞の TSST-1 刺激時におけるチミジン取込と IFN- γ 産生

図 5 は黄ブ菌感染マウスから脾臓細胞をとりだし、TSST-1 で刺激した際の増殖反応と IFN- γ の産生を示します。TSST-1 は黄ブ菌の外毒素である toxic shock syndrome toxin (TSST-1) のことです。まず、トランスジェニック・マウスの脾臓細胞は、同腹仔と比べ TSST-1 に対する反応性が有意に増大しています。これは黄ブ菌感染に際し、対照と比べ黄ブ菌を攻撃するリンパ球が急速に増殖することを意味します。さらに、トランスジェニック脾臓細胞の IFN- γ 産生は TSST-1 の濃度依存性に上昇しますが、同腹仔の脾臓細胞はその産生が有意に低く、TSST-1 に対する濃度依存性がみられません。このことはヒトおよびマウス双方の LF にさらされた T 細胞は、Th1 型サイトカインである IFN- γ を多量に産生する性質を獲得したことを意味し、LF がヘルパー T 細胞の Th1 への分極させることを示唆しています。

Kruzel 等と Guillen 等が示したように LF は経口投与、あるいは、異種 LF 遺伝子を導入



して過剰発現させると、抗原刺激に対する免疫細胞の増殖を著しく増強します。つまり、アジュバントとして作用し免疫細胞の増殖性および反応性を高めることがわかります。さらに、LF は Th1 誘発性サイトカインである IL-12 および IL-18 の産生を増加させますから、LF を取り込んだ DC は、TLR にリガンドが結合す

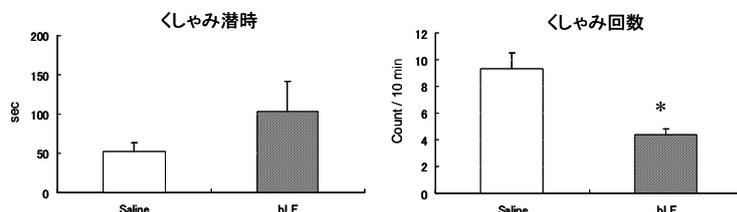
図6. 樹状細胞からヘルパーT 細胞への抗原提示における Th0 細胞の分極

ると、ナイーブ Th0 を Th1 に分化させます。つまり、LF は IL-12 および IL-18 の産生増強を通じヘルパーT 細胞を Th1 優位にシフトさせるので、オボアルブミン/水酸化アルミ、あるいは、高カゼイン食で誘発される高 IgE 血症を阻害するのです。図6に示す DC が Th0 と結合することによるヘルパーT 細胞分化の過程は、まだ完全に解明されていません。LF

による Th1 へのシフトは M 細胞を経由して、(1) DC が LF を受け取る、(2) Th0 が LF を受け取る、(3) DC と Th0 の双方が LF を受け取るの三つの可能性のいずれかで起こっています。

それでは LF の花粉症抑制作用をモルモットで実証してみましょう⁹⁾。モルモットは齧歯類と比べ抗原感作を受けやすいのでアナフィラキシーの実験によく使用されます。モルモットは1週間のうちで3日間連続してスギ花粉を吸入させ、4週間

酢酸刺激のみ



スギ花粉+酢酸刺激

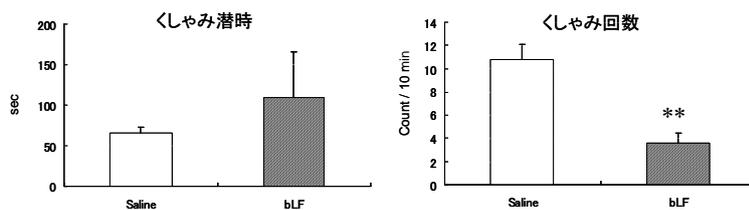


図7. 花粉感作モルモットの酢酸誘発性くしゃみに対する LF の抑制効果

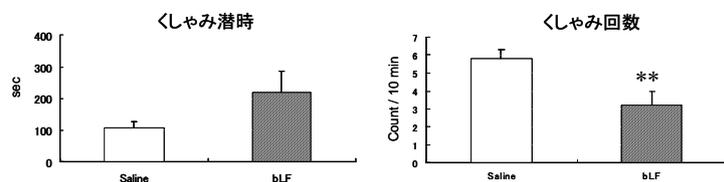
行動試験は 0.5M 酢酸ミストによる刺激を 10 分間、またはスギ花粉を 10 分間吸入させた後、酢酸刺激を 10 分間行った。試験当日は生理食塩水ないし LF は投与していない。くしゃみ潜時は酢酸刺激開始から最初のくしゃみを発するまでの時間とし、くしゃみ回数は刺激を行った 10 分間の回数。

*P<0.05, **P<0.01, グラフは Mean±SE (n=10)

繰り返してスギ花粉に感作させました。すべての個体に生理食塩水 (対照群) ないし LF (腹

腔内 100mg/kg) を 3 日に 1 回投与しました。図から明らかなように LF はくしゃみ潜時を有意に延長しませんでした。が、(酢酸刺激のみ) および (スギ花粉+酢酸刺激) においてくしゃみを有意に抑制しました。

噴霧による効果



腹腔内投与による効果

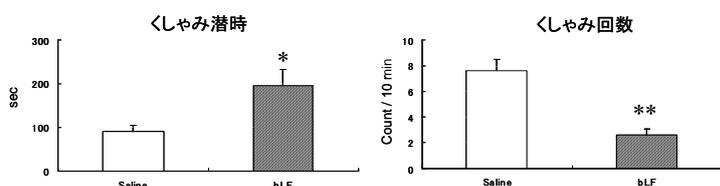


図 8. 酢酸誘発性くしゃみに対する LF の抑制効果

噴霧試験では、Saline または 10% bLF をモルモットの鼻腔内に 5 回噴霧し、その 10 分後に 0.5M 酢酸ミストによる刺激を 10 分間行った。腹腔内投与試験では、Saline または bLF (100 mg/kg) をモルモットに投与し、その 30 分後に同様の酢酸刺激を行った。くしゃみ潜時は酢酸刺激開始から最初のくしゃみを発するまでの時間とし、くしゃみ回数は刺激を行った 10 分間の総くしゃみ回数とした。*P<0.05, **P<0.01 vs. saline, グラフは Mean±SE (n=10)

さらに、酢酸誘発性くしゃみに対しても LF は明らかな抑制効果を示します (図 8)。単に LF を噴霧し 10 分後に酢酸ミストで刺激した場合、くしゃみの回数を有意に抑制します。一方、LF の腹腔内投与 30 分後に酢酸ミストで刺激すると、くしゃみ潜時を延長し回数を有意に減少させました。

LF は花粉症、アトピー性皮膚炎等のアレルギーに有用性を発揮することはもちろん、種々の抗原に対する免疫原性を強化す

るアジュバントとしても実用化される日が来ることでしょう。LF は母親が乳児に与える防御物質ですから、アジュバント効果があったとしても何ら不思議ではありません。

(謝辞) 未発表データの公表をお許しいただいた鳥取大学の原田悦守名誉教授ならびに竹内崇助教授に感謝します。

- 1) S. Khan, AC Perkins, M Frier, PE Blackshaw and P Leufkens. Biodistribution of human lactoferrin in the gastrointestinal tract. "Lactoferrin: Structure, Function and Applications" K Shimazaki et al., editors. Elsevier Science BV, 2000
- 2) Y Suzuki & B Loennerdal: Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Bio* 80 (1):75-80, 2002
- 3) T Takeuchi, H. Kitagawa and E Harada: Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp. Physiol.* 89 (3): 263-270, 2003)
- 4) J He and P Furmanski: Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *NATURE* 373: 721-724, 1995
-) 久原徹哉 : LF による腸上皮からの IL-18 産生誘導とその意義 : 臨床免疫、34:376-381, 2000
- 6) SA Hwang, ML Kruzel and JK Actor: Lactoferrin augments BCG vaccine efficacy to generate T helper response and subsequent protection against challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunopharmacol.* 5: 591-599, 2000
- 7) M Shimamura, Y Yamamoto, H Ashino, T Oikawa, T Hazato,, H Tsuda and M Iigo. *Int J Cancer* 111: 111-116, 2004
- 8) C Guillen, IBMcInnes, DM Vaughan, S Kommajosyula, PHC Van Berkel, BPLeung, AAuula and JH Brock, *J Immunol.* 168: 3950-3957, 2002
- 9) 竹内崇、原田悦守等、未発表。