

いろいろなラクトフェリン

腸溶性ラクトフェリン研究会

受任理事 安藤邦雄

ラクトフェリン研究の進展

今年の1月18日、米国アジェニクス社は開発中だった遺伝子組換えヒト・ラクトフェリン (TLF)が、FDA 承認のもとに臨床第三相試験に入ったことを公表した⁽¹⁾。対象疾患は末期の非小細胞肺癌である。このニュースは抗癌剤にとって画期的な出来事だ。分子標的薬を含め、抗癌剤の副作用発現率は100%なので、癌に痛めつけられている癌患者をさらに副作用が苦しめる。誰しも抗癌剤イコール副作用とっていて、現状を不思議とは思わない。言い換えると、ほとんど効果のない抗癌剤であっても、副作用だけはすべての患者に発現するのである。さらに抗癌剤は発癌剤である。仮に抗癌剤により癌が治癒しても、患者は新規の発癌に脅えなければならない。TLF が画期的なのは、癌化学療法剤と併用すると効力を増強するとともに、副作用を軽減するからである。抗癌剤と併用しなくても、QOLを向上させ延命効果があるだけで、患者を苦しめる副作用はまったくくない。

人口高齢化が著しい我が国では、二人に一人が発癌し、三人に一人が癌で亡くなる時代に入っている。世界的にみても癌治療法の研究は、数ある医学の研究テーマのなかで最優先順位が与えられ、莫大な研究費がつき込まれてきた。そのわりに成果が乏しいのは、なぜだろうか。その理由については、“ヌードマウスに人癌ガンを移植するモデルがヒトの病態を反映していない”、“癌患者の死亡原因のなかで9割を占めるのは癌の転移だ。しかし転移を抑制する薬剤がない”等の理由があげられる。詳細についてはクリフトン・リーフ著、“なぜアメリカ人はがんで死に続けるのか？”を参照していただきたい⁽²⁾。一方、モスクワの研究所では母乳から抽出したヒト・ラクトフェリンを悪性腫瘍、敗血症及び喘息などの難病患者に静脈注射ないし吸入させる治療法を研究し、政府は新薬として許可を与えた⁽³⁾。

我が国に目を転ずると国立がんセンターの化学療法剤研究グループが1990年代から2003年にかけて“癌の化学予防”の研究に取り組み、世界のラクトフェリン研究をリードする業績を上げた⁽⁴⁾。彼らのマウス、ラットを使った動物実験の成果は臨床研究で再現性が認められなかったが、ネズミとヒトのあいだにおけるウシ・ラクトフェリン(BLF)の代謝上の差異が解明されれば、癌の一次および二次予防に活用されてゆくだろう。他の分野に目を転ずると、慶応(医)眼科の坪田一男教授等は、シェーグレン症候群に起因する重症ドライアイ患者10症例に腸溶性BLFカプセル(BLFとして270mg/day)を4週間経口投与した結果を発表している⁽⁵⁾。BLF投与はシルマーテストによる涙の分泌量こそ増加させなかったが、VASによる患者のQOL、人工涙液点眼回数、涙液層破壊時間及び涙液層の厚さを有意に改善した。この試験は二重盲検ではなかったが、彼らは8症例のBLF非投与対照群と投与群を対比し、非投与対照群は、改善効果をまったく認めなかったと報告している。注目すべきはBLFを投与すると眼粘膜の上皮metaplasiaが減少し、粘液分泌細胞の数が増加

することである。BLF が炎症を沈静化したため、ドライアイにより眼粘膜に惹起された上皮の異所性化生が抑制されたこと、涙液層厚の増加は粘液産生細胞が増え粘液産生が増加したためであることを示唆している(表 1)。

表 1.腸溶性ラクトフェリン治療前後の眼粘膜の変化

	治療直前	LF 内服 4 週後	LF 内服終了 4 週後
上皮の化性 (Nelson' Grade)	2.0±0.5	1.0±0.64*	1.75±0.25 ^a
ゴブレット細胞密度 (cells/mm ²)	385±100	912±50*	426±180 ^a

*P<0.01、LF 内服直前と 4 週間後の有意差検定 (Fisher exact test.)

^aP<0.01、LF 内服 4 週間後と内服終了 4 週間後の有意差検定結果(Fisher exact test)

ラクトフェリンが酸素ラジカル[・OH]発生を抑制することを証明した成果も我が国で得られた。慈恵医大内科の坪田昭人准教授等は、銅イオンの胆汁排泄が遺伝的に欠損している LEC ラットに BLF を飼料に混合して連日投与した。その結果、BLF を与え続けると、大部分の LEC ラットが劇症肝炎を免れて延命すること、肝ミトコンドリア DNA に含まれる核酸塩基の酸化生成物、8-ヒドロキシ・デオキシ・グアニン (8-OH d G) が有意な低レベルであること、遺伝子修復酵素 OGG1 をコードするミトコンドリア DNA において、転写を開始させるプロモーター (CpG island) 部分のシトシン・メチル化を抑制することを報告した(6)。ちなみに、OGG1 は[・OH]による 8-OHdG を切り出す酵素で、遺伝子の SNIP 解析の結果、酵素活性が強いほど肺癌の発症率が低いことがわかっている。最近、CpG island におけるシトシンのメチル化は、細胞分化とも深くかかわっていることがわかってきた。[・OH]による酸化ストレスとどのようにかかわっているか解明が待たれる。

ラクトフェリンの錯体化学

ラクトフェリンは動物種によって異なるが約 690 のアミノ酸が連なる一本鎖のポリペプチドである。一本鎖は多数のシステインがチスルフィド結合(-S-S-結合)を形成することにより複雑に折りたたまれ、大きさがほぼ等しい二つのローブ(球体)になる。N-末端を含むローブを N-ローブ、C-末端を含むローブを C-ローブと呼んでいる(図 1)。

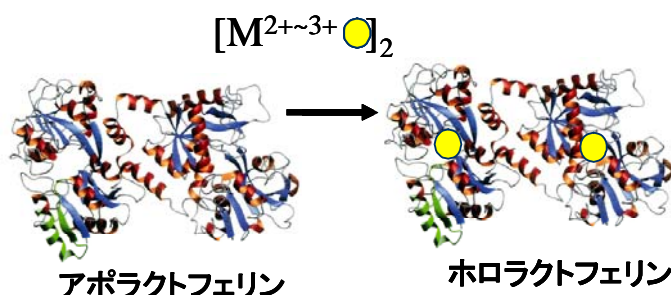


図 1. アポラクトフェリンとホロラクトフェリンの模式図

黄色の球は遷移金属イオンをあらわす。

各ローブの割目は、鉄、銅、クロム、コバルト等のイオンと強固にキレート結合し、錯体を形成する性質を持っている。いろいろな

動物種から得た LF について、遷移金属イオンをキレートしていないアポ体および 2 個のイオンをキレートしているホロ体を結晶化し X 線回折による構造解明が行われているが、両者の立体構造上の差異はごく僅かである。LF は Cu^{2+} と安定な錯体を形成して結晶化するので、X 線回折による構造の解明が行われている。 Cu^{2+} 錯体の立体構造は Fe^{3+} 錯体とほとんど同じで、各ローブの中心に Cu^{2+} が固定されていることが明らかになっている。 LF と Cu^{2+} との錯体形成は、BLF が LEC ラットに及ぼす効果と密接に関連していると推定されるが、まだ決定的な証明はなされていない⁽⁸⁾。

安定性から見ると、この錯体形成能は非常に強力で、1 モルのアポラクトフェリンと 2 当量の Fe^{3+} が溶解する溶液では、遊離 Fe^{3+} は 10^{-18} 当量しか存在し得ない。成熟好中球の顆粒に含まれるラクトフェリンは、ほとんど Fe^{3+} をキレートしていない。一方、乳は動物種によって差異はあるが、乳仔の成長に必要な Fe^{3+} を含んでいる。

また、中空のローブに遷移金属イオン 2 当量をキレートしたホロ体は、球体内部に突き出した極性基と相互作用した剛構造(rigid)になるので、アポ体と比べ胃内におけるペプシン消化に対して抵抗性がある。つまり、キレートした遷移金属イオンは柔らかなローブに筋交いを入れる効果がある。当然、筋交いがないアポ体の構造は柔らかく (flexible)、それだけにペプシンによる加水分解作用を受けやすい⁽⁸⁾。

アポラクトフェリン

このように研究が活況を呈するにつれ、新しい仮説”を提唱して研究に参入する研究者が出てきても不思議ではない。ここでは鉄含量が 1%のアポ BLF は耐酸性なので「丸ごと胃を通過し、小腸末端まで到達する」という仮説を紹介する。耐酸性といえはほとんどの蛋白質は耐酸性で、胃の pH に相当する 1.2-3.0 で温水中にインキュベートしても加水分解されない。上記の仮説が正しいなら、ビフテキや刺身を食べても胃を素通りして小腸末端に到達するはずである。その結果、タンパク質の消化不良が起こり、未消化のタンパク質を資化する微生物で小腸は充満するだろう。胃は食物に繁殖する微生物にペプシンを作用させ、殺菌する場でもあるからだ。⇒問題 1. この仮説についての情報が一般読者にあきらかではない。 2. 一般には“耐酸性”という言葉が、“耐胃酸性 (ペプシンを含む)”と同等に扱われるが (例えば、ライオン社の宣伝など)、上記のような議論では、その意味の違いを厳密にしないと混乱する。

なにをもってアポ BLF というかについては厳密な定義がない。ニュージーランドあるいはオランダでは鉄飽和度が 10~15% (ベーカー博士らは 4%もアポと言っている。オランダの Troost らの論文では、20%鉄飽和をアポ LF と言っている) の天然型 BLF をアポと呼んでいる⁽⁹⁾。そこで本当に Fe^{3+} 飽和度 1%ならびに 10%のアポ BLF が、胃で加水分解されないかどうか検証してみた。(“本当に”の前提である、誰が何を主張しているかが、一般読者にはわからない) 図 2 に示すように、日本薬局方の第一液(pH 1.2)⁽¹⁰⁾に磷酸緩衝液を加えて pH 3.0 に上昇させ、基質濃度が 2 mg/ml で 80 ng/ml のペプシンを加え温度 37°C で

2 時間インキュベートしてみた。図 2 は経時的にサンプリングしてしらべた BLF の分解パターンを示す⁽¹¹⁾。SDS-PAGE のバンドの面積、色調から判断すると、両者の分解は 5 分ごとに BLF が 1/10 に減少する速度で進行している。BLF は、10 分経過すると 1/100、15 分で 1/1000、20 分でバンドは消失してしまう。胃における食物滞留時間は、天麩羅、霜降り

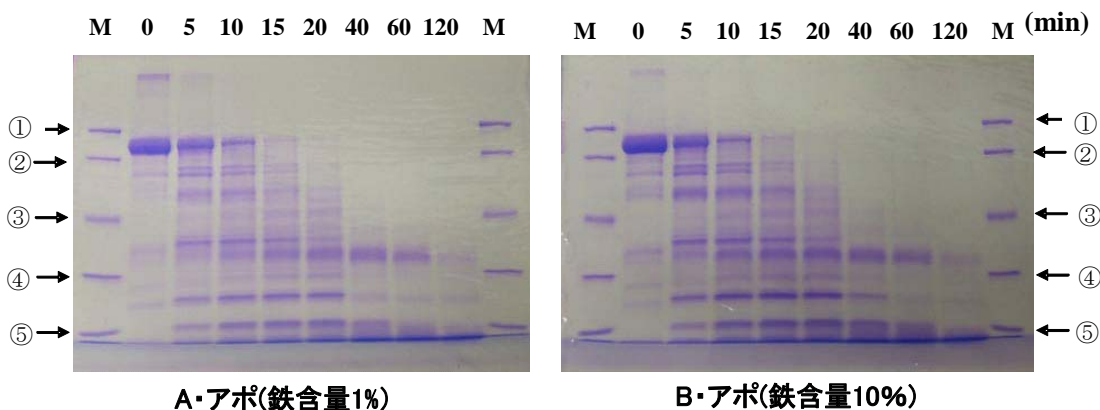


図 2. 鉄飽和度の違いによりアポ BLF のペプシン対抗性に違いがあるだろうか？

上段の M は分子量の異なるマーカー；①フォスホリラーゼ；分子量 97,400、②ウシ血清アルブミン；分子量 65,250、③アルブミン；分子量 42,400、④カボニクアンヒドラーゼ；分子量 30,000、⑤トリプシンインヒビター；分子量 20,100
 上段の数字；反応を開始してから時間(分)。8mg/ml ラクトフェリンを 12.5 μ l (終濃度 2mg/ml)、320ng/ml ペプシン(ブタ胃由来)を 12.5 μ l (終濃度 80ng/ml)、塩酸(pH2.5)を 25 μ l (最終 pH3)、を混合し(total 50 μ l)、37°C でインキュベートした。0、5、10、15、20、40、60、120 分後に 2 \times サンプルバッファー (0.125M Tris-HCl (pH6.8)、10% 2-メルカプトエタノール、1% SDS、10% スクロース、0.01% プロモフェノールブルー) を 50 μ l 添加し、95°C で 3 分間加熱した。ゲル濃度 10%、ゲル厚 1.0mm のゲルにサンプルを 5 μ l ずつアプライし、30mA、200V で泳動した。CBB 染色し、検出した(当研究会資料、未発表)。

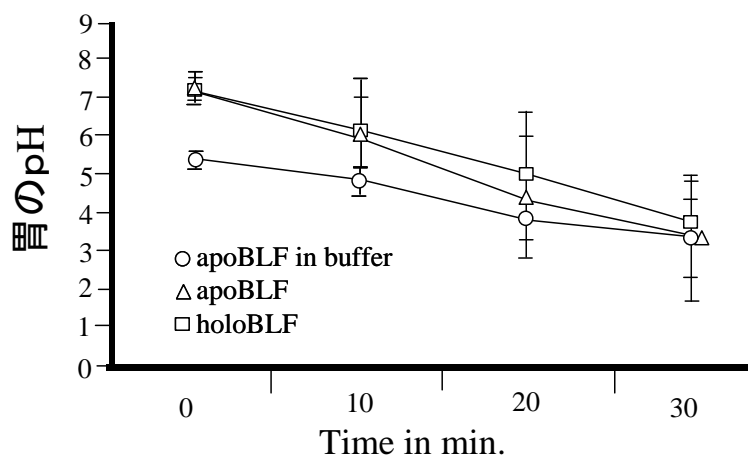
牛肉等は滞留時間が長く、果物、飲料等は比較的短い、通常 2 時間くらいといわれる。そこで 2 時間後の分解パターンをみると、分子量が 2 万ダルトン以上のペプチドさえほとんど存在しない。反応は極めて穏やかな条件下で行われたにもかかわらず、両者が同じ分解パターンを示したことは、Fe³⁺飽和度のいかににかかわらずアポ BLF は、ペプシン感受性の点ではまったく差異がないことを物語っている。

次にホロ LF、アポ LF がそのまま胃を通過し小腸に到達するとすると主張する根拠となった Troost 等の論文を紹介する⁽⁹⁾。オランダのマーストリヒト大学と BLF を製造する企業、DMV の研究者達は、クロスオーバー方式で 12 名の成人ボランティア (男性 5、女性 7) にそれぞれ① pH 4.7 の緩衝液に溶かしたアポ BLF (20% 鉄飽和であることが論文に明記されている。当社及び及び一般に市販されている LF はアポ型であるという認識で統一すべき)、② 水に溶かしたアポ BLF と③ ホロ BLF を鼻腔から胃に通したチューブで胃に流し込み、経時的にサンプリングして“胃が空になる時間(gastric emptying time)”、“小腸への BLF 到達量等を測定した。方法の概要は次のとおりである。ボランティアは前日、指定された食事を摂取し夜間の 12 時間は絶食した。翌朝、鼻腔を通してチューブを胃に挿入し、チューブを通じて洗浄水を流し込んで内容物を吸い出し、洗浄水に食物残渣が認められなくなるまで洗浄した。洗浄が完了して 45 分後に BLF を溶かした溶液をチューブ経由で胃

に流し込んだ。BLF の溶液は 80 g/l の麦芽デキストリン溶液 300ml に 4.5 g の BLF を溶解し、マーカーとしてポリエチレングリコールを加えた。

胃の内容が半分カラになる時間は、緩衝液に溶解したアポ BLF、水に溶かしたアポ BLF、同ホロ BLF でそれぞれ、 6.79 ± 2.36 、 8.46 ± 4.07 、 7.03 ± 2.14 で三者のあいだに有意差はなかった。さらに胃から BLF 溶液が消失する時間は急速で、いずれも 30 分以内であった。彼等が生理的に不自然な条件を設定した理由は、BLF が胃におけるペプシン消化を免れ、相当な量が小腸に移行すると主張したかったからである。(推測にもとづく中傷という批判を招く恐れがある。) つまり、食物が胃に滞留していない時にたんぱく質を溶液として摂取すると、“パブロフの犬” の条件反射が働かないので、胃酸とペプシンノーゲン(ペプシン前駆体)の分泌が極めて緩やかであり、胃洗浄を免れて微量に存在するペプシンも中性～微アルカリ性の pH で不可逆的に失活するからである。

果たせるかな、図 3 に示すように鉄飽和型、鉄 50%飽和型、鉄飽和度 4%のアポ BLF (実験は鉄 100%飽和のホロ



LF, 鉄が約 20%飽和のアポ LF で緩衝液有無の 3 群を比較) を流し込んだ胃の pH はいずれの場合でも常に 4.0 以上であった。特に BLF とホロ BLF 水溶液はペプシンが完全に失活する中性 pH を越えている。胃の pH は 30 分かけて徐々に低下するが、ペプシンが作用する pH4.0 以下になることはない。したがって、小腸に到達して BLF は、いずれ

図 3. アポ BLF およびホロ BLF をチューブ経由で胃に流し込んだ際の胃 pH の変動

各点は 12 名の平均値±SD

の場合でも 60%を超えている(図 4)。とりわけ、最高に到達したのは予想通りにホロ BLF で 70%以上の到達率を示した。

BLF はトリプシン、キモトリプシン等のプロテアーゼに耐性があるといわれるが、その耐性は完全ではないこともこの実験で明らかになった。十二指腸に流入すると、これらのプロテアーゼの作用を受けて加水分解が起こるのである。構造的に rigid なホロ BLF が最も作用を受け難いことが、この実験でも実証され

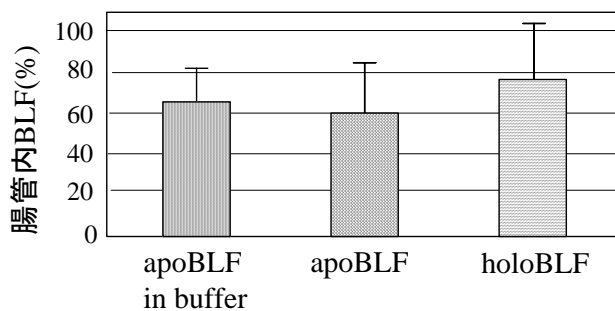


図 4. 小腸に到達したラクトフェリンの割合

た。胃でペプシンがはたらかない条件で得たデータがどのくらいの意味があるだろうか。

終わりに当研究会のデータを示し、今月のミニレビューを締めくくりにしよう。図 5 は当研究会が検討した BLF のペプシンによる消化を示す⁽¹²⁾。pH が 3.5 以下に低下すると急速な BLF の加水分解が起こるのは図 2 と同様である。重要なことは pH 4.0 以上で BLF はペプシンの作用を受け難いことである。普通に生活した場合、胃に食物塊が存在せず、たんぱく質が胃に流入しても、胃酸とペプシノーゲンがほとんど分泌されない事態は、ほとんど起こりえないことは自明である。

本誌 2008 年 3 月号と 4 月号に紹介したアジェニクス社の TLF(一日 3 g)は医療機関が患者に投与する薄いぶどう酒の液剤で、鉄飽和度は 23%である。また、最近、ニューランド

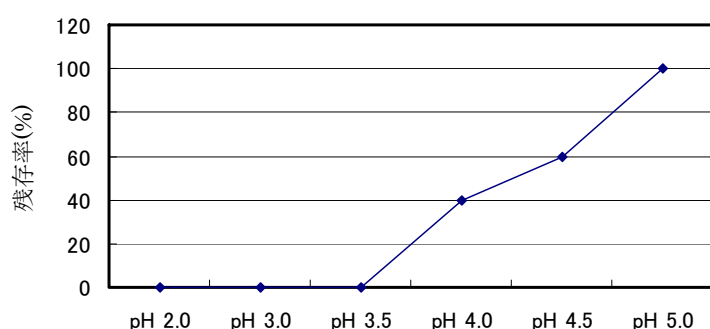


図 6. ペプシンの pH 依存性ラクトフェリンの加水分解
ラクトフェリン(2mg/ml)を各種の緩衝液に溶かし、ペプシン(0.2mg/ml)を加えて 37°C に 30 分間インキュベートした。

のオークランド大におけるラクトフェリン研究コンソーシアムは、予めホロ BLF を飼料に混合して与えたマウスに可移植性実験腫瘍を移植し、直径が 0.6 cm に到達した時点で、癌化学療法剤を 1 回だけ投与した結果を報告している。使用した移植癌は EL-4 悪性リンパ腫、B-16 メラノーマ、ルイス肺癌等、化学療法剤としてはタキソール、白金錯体、5FU などを使用している。

ホロ BLF を与えた群は癌化学療法剤を 1 回投与すると、100%の担癌マウスで癌が完全に退縮したが、50%鉄飽和、アポ BLF はこのように劇的な効果を認めなかった。1 回だけ投与した癌化学療法剤は癌の増殖に影響を与えない。この抗癌作用は、ホロ BLF が強力なアジュバント効果を持っているためである。事実、担癌マウス脾臓から分離したエフェクター細胞は、*in vitro* で癌細胞に対し強い殺細胞効果を示す⁽¹³⁾。

Fe³⁺飽和度 1%の BLF と 10%のあいだでペプシン感受性に差がないことは確実である。これまで行われた C 型肝炎を対象とする国立がんセンター⁽¹⁴⁻¹⁵⁾、北海道大学⁽¹⁶⁾及び東邦大学⁽¹⁷⁾の二重盲検試験および国立がんセンターによる大腸がんの二次予防の二重盲検試験⁽¹⁸⁾は、BLF を連日 1.8~3.6 グラムも経口投与しながら、ことごとく失敗に終わった。その理由は、BLF が胃で急速に分解されることを無視したためではなかろうか。

本邦には外国論文でさえあれば盲信し、読解力、理解力が不足している科学者が往々にしているのは残念なことだ。その論文が何を意図して研究した結果なのか読み取ることができなければ、ショーペンハウエルが言うように、読書は“自分の頭脳を他人の思想の運動場として提供する”だけである。

たかがサプリメントというなかれ！高齢化と定額診療の結果、現代は医療機関に相手に

されない医療難民があふれている。現代医薬は比較的短いスクリーニングの産物なので、慢性病患者の QOL を満足させ、寿命を延長させるかどうか定かではない。医療難民が最後の望みを託すのが、サプリメントを含む民間療法なのである。医療難民に役立つサプリメントを提供してこそ、科学者冥利に尽きるのではあるまいか？

引用文献

- (1)アジェニクス社ホームページ : <http://www.agennix.com/>
- (2)Clifton Leaf ; FORTUNE Magazine, March 22, 2004
- (3) Yakubovskaya RI et al. Abstract in 8th Int. Conference on Lactoferrin, p60, Oct 21-25th 2007, Nice, France, ref. in Anesteziol Reanimatol. 1997; (3): 36-41
- (4) Tsuda H, et al. Drug Metab Pharmacokinet. 2004 ; 19: 245-63. Review.
- (5) Dogru M, et al. Ophthalmology. 2007; 114: 2366-7
- (6) Tsubota A, et al. J Hepatol. 2008; 48: 486-93
- (7) Baker E et al. Lactoferrin: Structure, Function and Applications. Proc 4th Int Congress on Lactoferrin, 3-15, 2000, Elsevir Science Publisher B.V.
- (8) Baker EN et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1994; 50: 302-16
- (9) Troost FJ et al. J Nutrition 2001; 131: 2101-2104
- (10) 日本薬局方 (第 9 改正)、一般試験法、619-695、
- (11) 当研究会資料、未発表
- (12) 当研究会資料、未発表
- (13) Kanwar JR et al. Immunol Cell Biol; 2008; 86: 277-288
- (14) Okada S et al. Jpn J Cancer Res. 2002; 93: 1063-9.
- (15) Ueno H et al. Cancer Sci. 2006; 97: 1105-10.
- (16) Ishibashi Y et al. Hepatol Res. 2005; 32: 218-23.
- (17) Ishii K et al. Hepatol Res. 2003; 25: 226-233.
- (18) Tsuda H et al. Abstract in 8th Int. Conference on Lactoferrin, p32, Oct 21-25th 2007, at Nice, France.