

バイオ医薬品開発ブームに取り残されたラクトフェリン

近年の動物細胞培養技術、遺伝子組換え技術の進歩によって、従来は動物臓器から抽出するなどして実用化されていた生理活性タンパク質が工業的に大量生産されるようになって、抗ウイルス性タンパク質インターフェロン、顆粒球増殖因子 G-CSF、赤血球増殖因子エリスロポエチンなどの生理活性タンパク質を起源とするタンパク質医薬品が次々と実用化され、最近では、リウマチ治療薬などの抗体医薬品が注目されている。

ラクトフェリン（以下、LFと略す場合がある）は、母乳、特に初乳に多く含まれるが、成人においても涙、唾液、唾液その他の外分泌液や好中球に含まれている鉄結合性の生理活性タンパク質である。体内のLFは、大部分が鉄を結合していないアポ型の形で存在しており、3価の鉄イオンに出会うと強くキレート結合し、体の酸化還元電位を調節し、鉄イオンによるヒドロキシラジカルの生成を抑え、酸化ストレス防止によるアンチエイジング作用を示すことが分かってきた。LFは、この鉄代謝調節作用を中心に、抗菌・抗ウイルス作用、抗炎症・抗アレルギー作用、免疫調節作用、抗がん・抗転移作用など、様々な作用のある多機能性タンパク質であり、乳幼児の成長発育はもとより、成人の健康を守る上で重要な生理機能を果たしている。

残念なことに、牛乳由来成分という生い立ちから食品としての機能が注目されてきたため、生命活動の根幹に関わる重要な生理活性タンパク質であり、しかも経口投与が可能であるというユニークな特長があるにも関わらず、バイオ医薬品開発ブームに取り残され、ラクトフェリンの薬理作用、体内移行・分布（いわゆるADME）、製剤化等の基礎研究が遅れている面がある。

ラクトフェリンの臨床応用

にもかかわらず、LFの様々な作用については細胞や動物レベルで興味深いデータが得られており、多くの研究者の関心を惹きつけ、食品素材・健康サプリメントとしての開発や臨床応用が活発に行われてきた。国内では、LF錠菓（LF粉末を打錠したもの）を用いてウイルス性肝炎に対する臨床の有効性を評価する試験が行われ、海外では、米国のベンチャー企業が遺伝子組換えヒト型LF（rhLF）の溶液製剤を用いた臨床応用の試みが粘り強く行われてきた。いずれの場合も、LFは胃内でペプシン消化を受けやすいため、経口摂取されたLFのほとんどが消化分解されてしまうが、分解を免れたごく一部のLFが腸管まで到達して限定的な効果を示すものと考えられる。

LFに関心のある各分野の研究者の情報交換の場として、2年に一度、国際会議が開催されており、世界中から百数十名の研究者が一堂に会して研究成果を発表し、活発な討論が行われる。昨年10月に第7回ラクトフェリン国際会議がハワイで開催された。このハワイ会議ではっきりとした重要なポイントが二つある。第一点は、LFの投与量の問題である。アジェニックス社（米国）の非小細胞肺癌に対するシスプラチンとrhLFの併用によるフェーズII臨床試験の結果、部分寛解と完全寛解の合計が、プラセボ群29%に対して、rhLFの併用で47%に向上した（Petra K, et al: Double-blind Placebo controlled Trial of oral TALACTOFERRIN in Combination Therapy for First-line Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). 7th Intern Conf on Lactoferrin: Structure, Function and Applications: Oct 16th-19th, 2005, Honolulu, Hawaii)。重要なことは、rhLFの溶液製剤を使用しているが、LF投与量が1日あたり10-15gであり、国内で実施されている臨床試験よりも数倍多いことである。動物実験で効果が認められるLF摂取量は1日当たり300-600mg/kgに相当すると言われており、60kgのヒトに換算すると1日当たり18-36gに相当する。アジェニックス社の場合もほぼこれに近い投与量である。これだけ大量に投与すれば、胃での消化分解を免れた少量のLFが腸まで届いて薬効を発揮することが確認できたことである。

二点目は、鳥取大学名誉教授・原田悦守らによるLFの腸管からの体内移行に関する発表である。すなわち、LFを十二指腸内に投与したラットのリンパ管から採取したリンパ液中にLFが検出されるが、このリンパ液を抜き取ると血中にLFが検出されなくなることから、LFは門脈経由ではなく、まず腸管からリンパ系に取り込まれ、やがて体内循環に入って血中に移行するということが明確に証明した（Takeuchi T, et al: Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp Physiol* **89**(3): 263-270 (2004)) (図1)。さらに、最近開発されたLFの腸溶性顆粒を用いてリンパ液への取り込み効率を調べたところ、ラットではLF粉末に比べて腸溶性LFは10~20倍効率よく取り込まれることも分かった（Harada E, et al: Characteristic Transportation of LF into Blood via Lymphatic Pathway from Intestine

and Availability of Enteric-coated LF. 7th Intern Conf on Lactoferrin: Structure, Function and Applications: Oct 16th-19th, 2005, Honolulu, Hawaii) (図2)。ラットに比べて胃での滞留時間が長いヒトでは、この差はさらに大きいものと推測される。

図1. リンパ系を介するLFの血中への移行

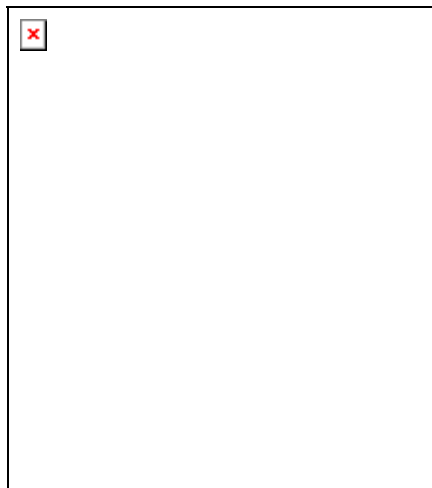
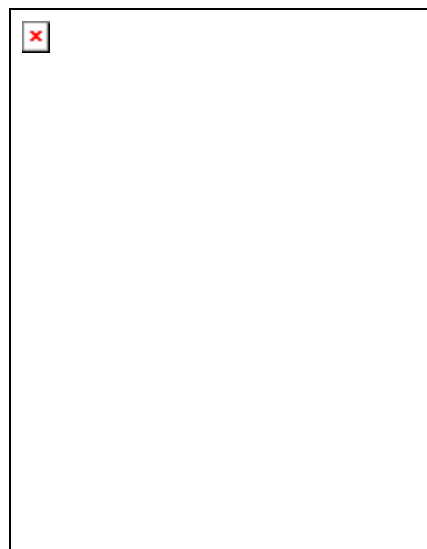


図2. 腸溶性LFと粉末LFのリンパ液への取込み



実際に、昭和大学の二つの臨床研究グループから、1日投与量200-600mgのLF腸溶剤の投与で、歯周病、ドライマウスに著効が認められたこと (Tamaki Y, Shimizu Y and Ando K: Lactoferrin in Dentistry. 7th Intern Conf on Lactoferrin: Structure, Function and Applications: Oct 16th-19th, 2005, Honolulu, Hawaii)、妊婦の便秘の改善に有効であったこと (Otsuki K, et al: Effect of Enteric-coated Lactoferrin on Constipation during Pregnancy. 7th Intern Conf on Lactoferrin: Structure, Function and Applications: Oct 16th-19th, 2005, Honolulu, Hawaii) が報告された。

今回、スケジュールの都合で学会参加を見合わせた慶応大学医学部・坪田一男教授らのシェーグレン症候群による重症ドライアイに対する臨床効果 (村戸ドール他: シェーグレン症候群に対するラクトフェリン内服の効果、第14回日本シェーグレン症候群研究会 (2005.9.16-17, 千葉) や永津会斎藤病院の木元博史博士による脂質代謝改善効果 (木元博史: ラクトフェリン腸溶錠により血清脂質の改善が認められた症例、ミルクサイエンス 53(4): 313-314 (2004) など) も含め、LF腸溶剤を用いた臨床試験で明らかな効果が次々と確認されつつある。

これまで、LFは本当に効くのかという疑問すら投げかけられていた臨床応用面で、アジェニックス社のように、兎に角大量に投与すれば臨床効果があること、腸溶剤にして腸管からきちんと体内に取り込ませれば、明確な薬効が確認できることが分かってきたことは、今後のLFの臨床応用に大きな期待を持たせるものである。

ラクトフェリンの中樞作用

LFは様々な生理作用を示す多機能性タンパク質であることが知られているが、最近、骨成長作用 (Cornish J, et al: Lactoferrin is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation in Vivo. Endocrinology 145(9): 4366-4374 (2004))、血圧低下作用 (Hayashida K, et al: Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats. Am J Physiol 286: R359-R365 (2004))、脂質代謝改善作用 (Takeuchi T, et al: Bovine lactoferrin reduces plasma triacylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents. Br J Nutrition 91: 533-538 (2004))、鎮痛・抗不安作用 (Takeuchi T, et al: Novel Functions of Lactoferrin in the Central Nervous System. LF. 7th Intern Conf on Lactoferrin: Structure, Function and Applications: Oct 16th-19th, 2005, Honolulu, Hawaii) (原田悦守、慢性疼痛 23(1): 9-23 (2004))、抗酸化・アンチエイジング作用 (Raghuveer TS, et al: Lactoferrin in the Preterm Infants' Diet Attenuates Iron-induced Oxidation Products. Pediatric Research 52(6): 964-972 (2002)) など、新たな生理作用が次々と見出されている。ここでは、LFの中樞作用にスポットをあててLF研究の最前線を紹介する。

【鎮痛・抗ストレス作用】

鳥取大学の原田、竹内らによる各種疼痛モデルでのLFの鎮痛・抗不安作用に関するこれまでの研究成果をまとめると、①LFは μ -オピオイドの作用を選択的に増強することにより、単独でも強い鎮痛作用を示す(Hayashida K, et al: Novel central function of milk-derived lactoferrin on anti-nociception mediated by the μ -opioid receptor. *Brain Res* **965**: 239-245 (2003)、②モルヒネと併用するとモルヒネの作用を50~100倍増強する(Hayashida K, et al: Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *Am J Physiol* **285**: R306-R312 (2003)、③モルヒネのような薬剤耐性を示さず、モルヒネと併用するとモルヒネに対する耐性化を遅らせる(Tsuchiya T, et al: Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia. *Brain Res* **1068**: 102-108(2006)、④LFはTNF α の産生を抑え、IL-10の産生を亢進するというデュアル効果によりラット関節炎モデルにおいて強い抗炎症・鎮痛効果を示す(Hayashida K, et al: Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci* **66**: 149-154 (2004)、⑤抗不安・抗ストレス作用があり、これも μ -オピオイド関与である(Takeuchi T, et al: Opioid mediated suppressive effect of milk-derived lactoferrin on distress induced by maternal separation in the rat pups. *Brain Res* **979**: 216-224 (2003); Kamemori N, et al: Suppressing effects of milk-derived lactoferrin on the psychological stress in adult rats. *Brain Res* **1029**: 34-40(2004)、⑥その作用メカニズムとして、LFは μ -オピオイド受容体には結合せず、NO合成酵素を活性化することにより、cGMPを介して μ -オピオイドのシグナル伝達を増強することなどが明らかになってきた(原田悦守・竹内崇、*ペインクリニック* **26(3)**: 359-368(2005)。

最近、がんの終末期医療における在宅ケアの重要性が叫ばれているが、LFのこのような作用は、免疫賦活作用、日和見感染防止作用、腫瘍血管新生阻害作用などと相まって、がん患者のQOL改善に極めて理想的なプロファイルを持っていると言える。

さらに、これらの研究から発展して、 μ -オピオイドを介するLFの作用が母と子の絆の形成に関わっていることを示唆する研究成果や、ノンレム睡眠(徐波睡眠)を亢進して脳を休息させる深い眠りをもたらすことなどが分かってきた。

【ラクトフェリンの脳内移行】

LFが様々な中枢作用を発揮するためには、腸管からの体内移行に続いて脳内に取り込まれる必要がある。通常、脳は血液中の物質が簡単に脳内に移行しないように血液脳関門 Blood Brain Barrier (BBB) によって保護されている。ところがアルツハイマー患者をはじめとする様々な神経変性疾患の脳病変部にLFの沈着が観察されている(Kawamata T, et al: Lactotransferrin Immunocytochemistry in Alzheimer and Normal Human Brain. *Am J Pathol* **142**: 1574-1585(1993); Leveugle B, et al: The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res* **650**: 20-31 (1994))。そこで、Fillebeenらは、LFの脳内移行の可能性を調べるため、ウシ脳毛細血管の内皮細胞の培養系を用いてBBBの細胞モデルを構築してLFがリセプター介在性に血管内皮細胞を通過することを証明した(Fillebeen C, et al: Receptor-mediated Transcytosis of Lactoferrin through the Blood-Brain Barrier. *J Biol Chem* **274**: 7011-7017 (1999))。さらに、原田らは、腸管上皮細胞やパイエル板からリンパ系を介して血液中に取り込まれたLFが血液髄液関門を形成する脈絡叢上皮細胞からリセプター介在性に取り込まれて脳脊髄液に移行し、中枢神経系に作用することを示すとともに、腸管上皮細胞及びパイエル板や脳の脈絡叢上皮細胞に存在するLF受容体のLFに対する親和性などが新生子と成動物で変化することを明らかにした(Harada E, et al: Characteristic transfer of colostrum components into cerebrospinal fluid via serum in neonatal pigs. *Biol Neonate* **76**: 33-43, 2003; Talukder MJR, et al: Receptor-mediated transport of lactoferrin into the cerebrospinal fluid via plasma in young calves. *J Vet Med Sci* **65**: 957-964, 2003 (図3)。図に示すように、腸管及び脈絡叢上皮細胞に存在するLFリセプターの親和性、取り込み効率を新生子と成動物で比較すると、腸管からのLFの取り込みは新生子の方が成動物よりも相対的に活発であるのに対して、脳の脈絡叢からのLFの取り込みは逆に成動物の方が相対的に亢進している様子が窺われ、脳内に取り込まれたLFの生理機能がどのようなものか、加齢とどのような関係があるのかなど、大変興味深い。

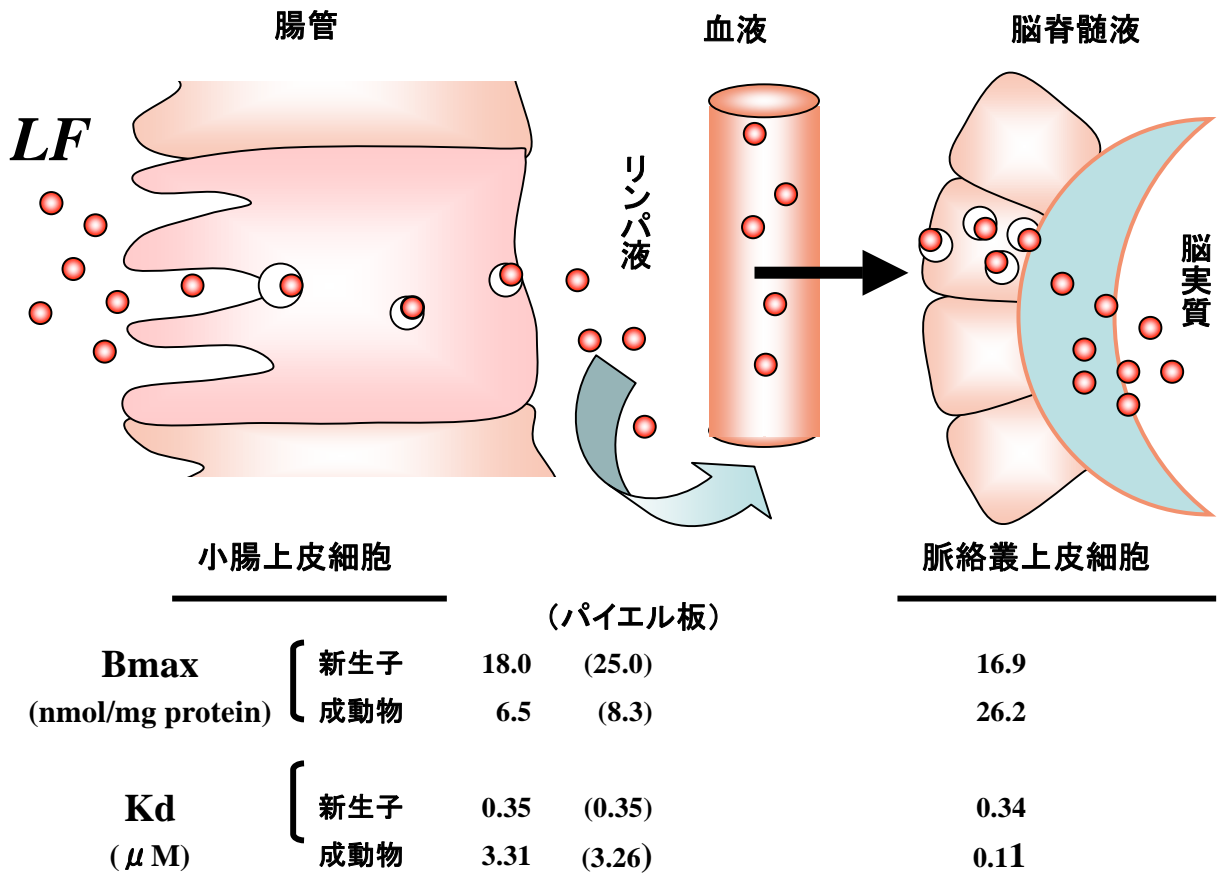


図3 腸管腔から血液を介する LF の脳内への輸送動態

面白いことに、BBBにはインスリン、トランスフェリンのようなポリペプチドに対する受容体があり、リセプター介在性にこれらの物質を脳内に取り込む機構があることは従来から知られている。このような取り込み機構が存在するには何らかの生理的な意義があるものと考えられるが、あまり詳しいことは分かっていない。最近、摂食調節ホルモンであるレプチンも BBB を通って中枢に作用することが分かってきた。グルコースの利用を調節するインスリンや摂食行動を調節するレプチンが BBB を通過して中枢に作用することの意味は生理機能から考えて理解できるような気がする。鉄を運搬することで知られているトランスフェリンが、なぜ積極的に脳内に取り込まれるのかはよく分かっておらず、脳の活動に必要な鉄を供給するためであろうと推測されている。トランスフェリンのこのような性質を利用して、例えば、リシンという毒素タンパク質を結合させて脳内へ毒素を送り込んで脳腫瘍の治療を目指すような、薬物送達 (DDS) ツールとして利用する試みもなされている。リシンは一時、がん細胞を標的とする抗体ミサイル療法の研究が活発に行われた際にミサイルの弾頭として検討されたが、主にリシンの肝毒性やがん細胞に本当に特異的な抗体を得ることが難しいなどの理由で実用化にはいたっていない。

話が少しわき道にそれてしまったが、LFはトランスフェリンファミリーに属する鉄結合性タンパク質で、実は3価の鉄イオンをトランスフェリンよりも約300倍強く結合する性質がある。このLFがリセプター介在性に脳内に取り込まれるということになると、その生理的な意味や脳へ薬剤を運ぶDDSツールとしても注目されることになる。最近、放射線医学総合研究所の脳機能イメージング研究開発推進室の須原哲也博士らが、トランスフェリンと比べてLFの取り込み効率をはるかに大きいことを明らかにし、LFはDDSツールとしても面白いのではないかと指摘している (Ji B, et al: Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats. Life Sciences 78: 851-855 (2006)) (図4)。

図4. ラクトフェリンとトランスフェリンの脳内移行の比較

図4は、LFとトランスフェリン(Tf)及びラットのトランスフェリン受容体に対するマウスモノクローナル抗体OX26をそれぞれ放射性ヨードで標識し、ラットに静脈注射してから60分後の放射能を測定し、組織1gあたりの投与量(ID)に対する脳内分布割合を測定した結果である。LFの場合は、約0.016%が脳に取り込まれているが、Tf及びOX26の場合は無視できる程度であった。LFの血中半減期は約8分でトランスフェリンの約1/6と短く、肝臓、脾臓への分布が極めて多い(肝臓1gあたり投与量の約1.6%、脾臓1gあたり投与量の約1.3%が分布)のが特徴的であり、トランスフェリンとは体内動態が全く異なっていることが分かった。

パーキンソン病をはじめとする多くの神経変性疾患は鉄イオンによる酸化ストレスが関係しているといわれており、LFの生理的役割も、単なる鉄の運び屋であるトランスフェリンとは異なり、不要な鉄イオンのスカベンジャー(掃除屋)として、あるいは抗炎症因子として動員されている可能性が強いと考えられる。

【ラクトフェリンと精神的ストレス】

すでに述べたように、竹内らは、母親から引き離された子ラットの不安行動や母親を探して泣き叫ぶ行動がLF投与で和らぐことや、成ラットの恐怖感によるフリージング(体のこわばり)などもLF投与で緩和されること、これらの作用のいずれにもLFの μ -オピオイド作用が関係していることを報告している。このLFの μ -オピオイドを介する抗不安・抗ストレス作用を裏付ける興味深い研究がある。

生体内の物質の役割を調べる手法に、その物質の生産や作用に関係している遺伝子を機能しないようにする遺伝子ノックアウトという技術がある。Molesらは、この技術を用いて、 μ -オピオイド遺伝子をノックアウトした遺伝子変異マウスを作出し、 μ -オピオイドが母と子の絆の形成に関わっていることを遺伝子レベルではじめて明らかにし(Moles A, et al: Deficit in Attachment Behavior in Mice Lacking the μ -Opioid Receptor Gene. Science 304: 1983-1986 (2004))、日経バイオビジネスの2004.9月号に“母を恋しがらない子マウス”の話として紹介され、注目された(図5)。

図5 母を恋しがらない子マウス

子マウスは母親に密着することにより、温もりを与えられ、乳を飲ませてもらい、母親を庇護者として認識し、嗅ぎなれた匂いのする寝床で安心して眠る。生まれたばかりの赤ちゃんはこのようにして自分以外の存在との関係を自分の行為に対して与えられる“報酬”(Reward)として認識することからはじまって、やがて社会に適合することを学んでいくようである。図5に示すように、正常マウスOrpm(+/-)は母親がいなくなると激しく泣き叫ぶが(マウスの鳴き声は超音波領域の波長で測定)、 μ -オピオイド受容体遺伝子を欠損した両親から生まれた遺伝子変異マウスOrpm(-/-)は母親が引き離されても寂しがらない、いわば、無感情というか、社会的な感性が欠如している。すなわち、肉体的な痛みに関係する μ -オピオイド系が“報酬”(Reward)という仕組みを通して、母親との精神的な絆を形成し、やがて社会性の学習にいたる実に巧妙なプロセスを構築していることを示唆している。そして、原田らが示したように、母乳から与えられるLFがこの μ -オピオイド系の信号を数十倍に増幅しているということは、育児、子育てにおいてもきわめて重要なことであると言えよう。ある臨床医の計算によると、初乳に含まれるLF含量から計算すると乳児は毎日6~7gのLFを摂取しており、これは60kgの体重に換算すると毎日、百数十グラムのLFステーキを生で食べていることに相当する。勿論、乳児の場合は、まだ胃が十分に発達していないため、その全量が胃を素通りして腸に到達することを忘れてはならない。

スウェーデン・ウプサラ大学のPlojらは、幼児期における肉体的、精神的ストレスが成長後の行動に影響することをアルコール中毒や薬物中毒との関係で研究している。生後すぐに、通常飼育の対照群(仮に放任群とする)、毎日15分間だけ母親から引き離すMS15群(仮に軽ストレス群とする)と毎日360分間引き離すMS360群(仮に重ストレス群とする)の3群に分け、アルコール摂取量を比較したところ(動物は普通の水と2~8%のアルコールをどちらでも自由に飲めるようになって

いる)、軽ストレス群はストレス無しの放任群及び重ストレス群に比べてアルコール摂取量が明らかに少なく、しかも、この実験を3週間続けた後、拘束ストレスを与えたところ、重ストレス群のアルコール摂取量が有意に高かった(Ploj K, et al: Long-Term Effects of Maternal Separation on Ethanol Intake and Brain Opioid and Dopamine Receptors in Male Wister Rats. Neuroscience 121: 787-799 (2003))。この動物実験の結果は、幼児期の過度のストレスは成長後もマイナスに働くが、軽く適度なストレス（家庭もしくは社会における抑制=しつけ）は成長後の自己の確立、自制心の育成につながることを示唆しているように筆者には思われるのである。

竹内らは、さらに興味深い現象を観察している。生後2～11日齢の間、子ラットを育てている母ラットを毎日、30分間（MS30）または300分間（MS300）別の場所に移す。子ラットは急に母親がいなくなって不安感に襲われ、母ラットもわが子が急にいなくなって強い不安、ストレスを感じていると思われる。それぞれの処置の30分前に子ラットまたは母ラットに生理食塩水かLF(100mg/kg)を腹腔内に投与しておく。12日目以降は正常な状態で飼育し、母ラットに子ラットを育てさせ、21日目に離乳する。6週齢後（42日目）に、子ラット（メス）が立ち上がってあたりを見回す行動（Rearing）の回数を、何も処置しないコントロール群（いわゆる放任群）及びハンドリング群と比べて実験者がラットに触れることによって適度の緊張感、ストレスを受ける群（正常群）と比較して、LF投与の影響を観察した（竹内崇ら、新生子ラットの長期母子分離による発育期不安行動に対するラクトフェリンの改善効果：日本獣医学会学術集会 2005.9.29（鹿児島））（図6）。この場合も、適度のハンドリングストレスを受けている正常群が活発なRearing行動を示すのに対して放任対照群は幾分活動が鈍いように思われるのが興味深い。さらに注目されることは、生後まもなく母親隔離(Dam Separation)を受けた子ラットの精神的ストレスの影響は離乳を終わって発育期に入っても残っていることと、この影響はLF投与によっても改善が認められないのに対して、母ラットにLFを投与した場合にはこの影響が改善され、子ラットがハンドリング群と同じように健全なRearing行動を示すことである。このことは、子育てにおける母親の精神状態が子供に大きな影響を与えることを示唆しており、また、LFに精神的なストレスを改善する効果があることを示しているものと考えられる。

Female Rat

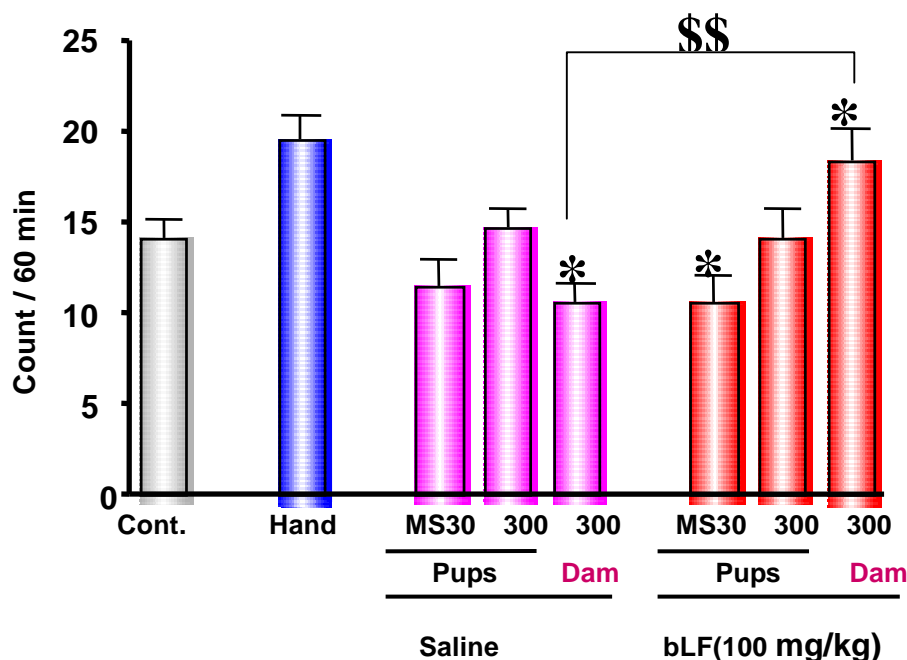


図6 母ラット隔離後の子ラット(メス)の立ち上がり行動

まとめ

字数の関係で説明を省略したが、竹内らは、LF がラットの徐波睡眠を促進することも観察している竹内崇ら、ミルク由来ラクトフェリンによる徐波睡眠促進効果：日本獣医学会学術集会 2005.9.29（鹿児島）。徐波睡眠はノンレム睡眠とも言われるが、脳が活動していない状態の眠りで、眼球の活発な運動(Rapid Eye Movement)を伴うレム睡眠に比べて、脳が休息する眠りと言われている。LF の摂取でぐっすり眠れて目覚めが爽やかであるのはこのためと思われる。今回、LF の中枢作用に焦点を当てて、LF の脳内移行、神経変性疾患との関わり、精神ストレスに対する作用について最先端の研究状況を紹介した。

筆者は生理学が専門ではない。動物の行動観察の結果から、人間の幼児期に受ける精神的なストレスの影響や、子育ての問題を考えるヒントとすることには飛躍があり異論があろうと思うが、逆に素人の気安さであえて大胆に精神ストレスに対する最近の学術研究の成果が示唆するところを分かりやすく提示した。引きこもり、不登校などに見られる子供たちの社会不適應、それは子供という年齢を越えて成人後にも引きずられているように見受けられ、また、親が子を殺す、子が親を殺すという、かつては考えられなかったような社会現象の根底に一体何があるのか、考え込んでしまうのは筆者だけであろうか。ここに紹介した研究にその原因を解くカギがあると言え、またお叱りを受けようが、少なくともそのヒントあるいは研究の方向性が示されているのではないかと考える。「抱きしめる子育て」という本を書店で見かけたことがある。子供は強く抱きしめて愛情を伝え、やって見せ、やらせてみて褒めてやる、というのが大切と言われる。さらに、してはいけないことをきちんと教えることも忘れてはならない。 μ -オピオイド系を介する“報酬”のプロセスが情緒や社会性の育成の根底にあるとすれば大変分かりやすく興味深い。人間が月の上を歩き、ヒトゲノムの解析が進み、科学技術の進歩は目を見張るものがあるが、子供の育て方、人間の精神医学の研究がこれに追いついていないように思う。健全な先進社会の発展のためにはこの分野の研究にもっと大規模に研究費を投入すべきであることを提言して本稿を終える。

以上

(参考文献)

【JMS (Japan Medical Society) 2006.5 月号原稿】