

第3回ラクトフェリンフォーラムに参加して

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

第3回ラクトフェリンフォーラム⁽¹⁾は、2008年11月30日(日曜)に140名あまりの研究者と企業関係者が参集して神田神保町の一ツ橋ホールで行われた。ラクトフェリンに関する研究集会は、定期的に世界で四つ開催されており、いずれも企業色が希薄なことが特徴である。ラクトフェリンは育児用調製粉乳、ヨーグルトなどへの添加及び健康食品として利用されているに過ぎないが、定期的に研究会が開催されることは極めて珍しい。ラクトフェリンが研究者を魅了する多機能を持ち、これから紹介するように多くの興味ある生理活性を呈するためだろう。研究会の一つ国際ラクトフェリン会議は、2009年10月18-22日に北京で開催される予定で、9回を数える。この国際会議はラクトフェリン・タンパク質のX線回折から臨床応用まで幅広い研究が発表される他流試合の場である。ホームページは英語で書かれているが、中国語、日本語、アラビア語も公式サイトで使われていて国際色が豊かな研究会である⁽²⁾。1993年、ハワイで第1回の国際ラクトフェリン会議を開催したときには、参集した研究者の国籍は、殆どが米国、カナダ、日本、フランス、英国、ニュージーランドであった。最近では、上記の国々に加え、北欧、ロシア、イタリア、スペイン、ベラルーシなどの欧州諸国、中国、インド、韓国等の研究者が参加し、研究に広がり厚味が加わってきた。

残り三つのラクトフェリン研究集会は、すべて日本で開催されており、我が国はラクトフェリンの研究大国である。結成された順に「ラクトフェリンフォーラム」、「歯科改め“臨床ラクトフェリンシンポジウム”」、「歯周病・ラクトフェリンフォーラム」である。今年で第3回を迎えたラクトフェリンフォーラム“は、北大の島崎教授、国立がんセンターの津田部長(当時)、横浜市大(医)の田中教授等が中心となって5年前に結成された研究会である。このフォーラムは国際ラクトフェリン会議の小型版で、基礎から臨床まで幅広い研究分野をカバーしている。今回はフランスから招待されたピアース教授の”ラクトフェリン・イソフォームの構造と機能“と題する講演、ラクトフェリンの臨床応用に関する講演5題、一般講演9題、ポスター発表27題があり、多数の研究者と業界の関係者が参集して盛会だった。これらの発表の中から特に目立った研究を順不同に採り上げて紹介する。

1. ラクトフェリンの創傷治癒促進効果

星薬大の輪千等⁽³⁾はサラヤ(株)の研究者と共同して“ウシ・ラクトフェリン(b-LF)の創傷治癒促進効果”について発表した。既に本誌に紹介したように米国のAgennix社は、ヒト遺伝子組換えラクトフェリン(TLF)8.5%含有ゲル軟膏を糖尿病性下肢潰瘍の治療薬として開発中である。糖尿病患者の創傷治癒は遷延することが知られていて、健常人であれば短期に治癒する足の傷、例えば、靴ずれ(血豆)、軽いやけどなどであっても、糖尿病患者の場

合には容易に治癒せず、足を切断しなければならない重症の感染症(脱疽)を起こすことも稀でない。脱疽は糖尿病が引き起こすものではないが、神経が正常に働いてないため、感染しても気が付かずに放置され壊死に至るのである。米国 FDA が糖尿病患者の創傷治癒用に承認している外用剤は、J&J 社の Becamplernin (商品名 ; Regranex)⁽⁴⁾だけである。これは外用剤としては珍しく危険なクスリで、今年 6 月、FDA はこの外用剤を“3 チューブ以上使うとがんにより死亡リスクが高まる”という異例の黒枠警告をラベルに表示するよう指示した。糖尿病性の下肢潰瘍は難治性なので Regranex のような危険なクスリであっても必要悪として使わざるを得ないのである。Agennix 社のホームページは糖尿病性の下肢皮膚潰瘍を対象とした TLF と Regranex の治癒率を比較した成績を発表している。偽薬群で潰瘍が 100%治癒した割合をベースとして、薬剤塗布による 100%治癒率の上昇を比較すると、Regranex の有効率が 27%上昇であるのに対し、TLF がその 2 倍を超える 58%である。つまり、有効性と安全性の両面にわたり TLF が遥かに優っている。TLF ゲル軟膏は臨床第二相(二重盲検試験)が行われているので、遠からず FDA の承認がおりることが予想される。今フォーラムにおける輪千等の発表は、ラクトフェリンの臨床的な創傷効果を動物実験及び細胞培養で確認する結果になった。すなわち、b-LF 外用剤は streptozotocin 投与で誘発した糖尿病マウスの背部における創傷の治癒を促進し、さらに表皮細胞(ケラチノサイト)の培養で細胞増殖と遊走を加速した。発表者等は“b-LF が MAP キナーゼ・カスケードを介してケラチノサイトの増殖と遊走を惹起するとともに、マトリックス・メタロプロテイナーゼ-9 の発現上昇を誘発し、創傷治癒の促進に働く可能性を示唆している。日本創傷治療学会の公式見解によると、”これまでの創傷の治療は間違っていた。常識である「創傷面に消毒薬を塗る、ガーゼで覆う」は、治癒をかえって遅延させる。「創傷は単に水で洗うべきである」「とのことである。傷口に b-LF のローションを噴霧する創傷治療法が意外に早く普及するかもしれない。

2. ラクトフェリンによるプリオン複製阻害

動物衛生研プリオン病研究センターの岩丸等は、細胞培養モデルを使いプリオン病タンパク質 PrP(Sc)の生成に及ぼすラクトフェリンの影響をしらべた^{5,6}。プリオン病は致死的な神経変性疾患であり、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病、ヒツジとヤギのスクレイピー、ウシの BSE などが含まれる。これらは正常な細胞内プリオン蛋白 (PrPc) が病原性のアミロイド異性体に変換されて発症する。ラクトフェリンは強塩基性蛋白でアルツハイマー病及びピック病のような神経変性疾患において、アミロイドに結合し蓄積することがわかっている⁽⁷⁾。検討の結果、b-LF は用量及び時間依存性にスクレイピーの持続感染細胞 (ScNa58) における PrP(Sc)の蓄積を抑制したが、構造が類似した鉄蛋白、トランスフェリンにはこの効果はなかった。b-LF 存在下に感染細胞を継代培養したところ、5 代目から PrP(Sc)がイムノブロット法で検出できなくなり、10 代目では感染性の著しい減弱を認めた。

これらの結果から岩丸等は b-LF が細胞表面の PrPc の細胞内輸送を阻害、あるいは PrPc

と PrP(Sc)との相互作用を阻害することにより、プリオン蛋白の複製を阻害していると考察している。

3. バイオフィルムの形成阻害

2002年、米国のシン等はラクトフェリンが緑膿菌のバイオフィルム形成を阻害することを報告した⁽⁸⁾。筆者も本誌において2回にわたり微生物のバイオフィルムについて紹介している。すなわち、歯周病を始めとする日和見感染症はバイオフィルム感染症であり、バイオフィルム感染症の特徴は次の四点にある。(1) 通常、日和見病原菌は生体内ではバイオフィルムに閉じこもり、なりを潜めている、(2) 病原菌はバイオフィルムに閉じこもると抗菌剤に抵抗性になる、(3) 病原菌は宿主の免疫能が低下するとバイオフィルムを飛びだして、増殖し感染症を起こす、(4) 抗菌剤と宿主の免疫能により感染症が制圧されると、病原菌は再びバイオフィルムに籠城する。

今回、森永乳業^(株)の若林等⁽⁹⁾は新潟大との共同研究で歯周病の病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と *Prevotella intermedia* がバイオフィルム形成期にある場合、b-LFは低濃度でバイオフィルム形成を抑制することを見出した。しかも、このバイオフィルム形成の抑制は、b-LFの鉄飽和度とは無関係なこと、b-LFはニューキノロン系及びテトラサイクリン系抗生物質と相乗的にバイオフィルム形成を阻害することを報告した。

一方、東京医大の神宮等⁽¹⁰⁾はb-LFが緑膿菌臨床分離株によるバイオフィルム形成を *in vitro* で阻害することを発表した。緑膿菌による慢性気道感染症や尿路感染症はバイオフィルム感染症で、抗菌剤による治療が困難な難治性感染症である。しかし、彼らのデータによると、バイオフィルム形成を阻害するb-LFの最適濃度は *in vivo* では到達不能の2 mg/mlなので臨床に応用できる実用性は薄いかもしれない。

4. リポソーム封入 b-LF の歯周病治療における有用性

サンスター^(株)の石角等⁽¹¹⁾は広島大並びに徳島大と共同でb-LFを歯周病治療に応用する研究を精力的に続けており、既にその成果を歯周病学会と歯周病ラクトフェリン研究会で発表している。本誌でも度々触れたようにb-LFはpH 3.0で超微量のペプシンにより5分ごとに90%が分解される。そこで、彼らは胃における加水分解を避けるため、b-LFのリポソーム封入体を使って研究を推進している。今回は“①リポソーム化ラクトフェリンの歯周病に対するヒト予備摂取試験”、“②大豆レシチンによるリポソーム化ラクトフェリン経口投与がリポポリサッカライド誘導歯周組織破壊に及ぼす抑制効果”、“③リポポリサッカライド誘導歯周組織破壊に及ぼすリポ

表 1. ボランティア末梢血単核球のサイトカイン産生能の変化

サイトカイン	開始時(0W)	終了時(4W)
TNF- α (pg/ml)	178.7 \pm 90.6	91.9 \pm 50.1*
IL-1 β (pg/ml)	255.2 \pm 130.7	95.0 \pm 72.4*
IL-6 (pg/ml)	4251.7 \pm 2646.6	2403.7 \pm 1496.3*
MCP-1 (pg/ml)	3172.9 \pm 2199.6	2137.8 \pm 1575.1*

Mean \pm SD. n=12, *P<0.05, paired t-test,

大豆レシチンによるリポソーム化ラクトフェリン経口投与がリポポリサッカライド誘導歯周組織破壊に及ぼす抑制効果”、“③リポポリサッカライド誘導歯周組織破壊に及ぼすリポ

ソーム化ラクトフェリン経口投与の抑制効果”と題し三つの発表を行った。いずれもラクトフェリンの歯周病に対する有用性を説得するのに十分な内容で、b-LF は歯周病の治療面で大きな将来性を予測できる。特に、①の発表は、歯周病に罹患した社内ボランティア(男性 8 名、女性 2 名、年齢 42~58 歳)による臨床試験で、b-LF の投与量は 180 mg/day、4 週間の内服である。表 1 に示すように僅か 4 週間の経口摂取で末梢血単核球の炎症性サイトカイン産生能は有意に低下し、リポソーム化ラクトフェリンが全身的な炎症を抑制することを示唆した。さらに驚くべきことは、歯周ポケットの深さが、投与前の $4.51 \pm 0.64(\text{mm})$ から 4 週後で $4.24 \pm 0.91(\text{mm})$ に有意に縮小したことである。米国 FDA を始め世界中で歯周ポケット縮小効果を承認されている“ペリオチップ⁽¹²⁾”は、クロルヘキシジンをカラーゲンの三次元マトリックスに封じ込めた DDS 製剤である。これを 3 カ月おきに歯周ポケットに挿入すると、1 週間にわたりクロルヘキシジンを徐々に歯周ポケットに溶出し、局所的に病原菌を殺菌する。しかし、3 ヶ月ないし 6 ヶ月後に測定した歯周ポケットは、1mm 以下のごく僅かな縮小効果を示すだけである。リポソーム化ラクトフェリンは毎日 180 mg を 4 週間摂取するだけで、炎症を抑制し歯周ポケットを縮小させるので、ペリオチップと比べて遥かに有用性が高い。云うまでもなく歯周病は風邪について大きな経済的損失を与える疾患である。リポソーム化ラクトフェリン製剤は、これからの歯科診療に大きな役割を果たすことが予想される。

5. メタボリック症候群の内臓脂肪に及ぼす腸溶性 b-LF の効果

メタボリック症候群は別名“死の四重奏”と称し、「肥満」「高血圧」「脂質代謝異常(高脂血症)」「糖代謝異常」が合併する慢性病である。原田等は b-LF がマウスの基礎代謝を亢進させ⁽¹³⁾、ラットの血圧を低下させること⁽¹⁴⁾は既に報告している。ライオン(株)の村越等は、2007 年春に b-LF 腸溶錠を肥満者に 2 ヶ月間摂取させるオープン・トライアルを行い、内臓脂肪、腹囲、体重の有意な改善効果を発表している。今回はその跡を受け、body mass index が

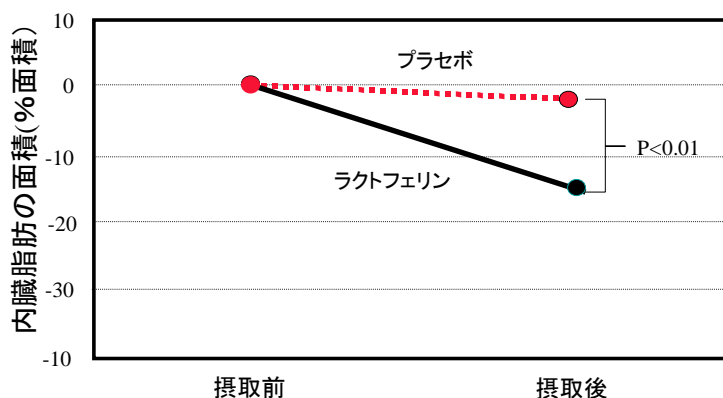


図 1. 内臓脂肪面積の変化

摂取直前と直後に腹部の CT-scan を行い、両群の内臓脂肪が占める面積を比較した。b-LF 群の内臓脂肪面積は実薬摂取により有意に減少したが、プラセボ群のそれは減少しなかった。両群のあいだには危険率 1% の水準で有意差がある。

25~35 の被験者男女 30 名を二群に分け、二重盲検試験により b-LF 腸溶錠の効果を検討した。実薬群(n=15)は b-LF を 100mg 含有する腸溶錠を一日あたり 3 錠、2 ヶ月連続摂取し、プラセボ(乳糖)群には見かけがほぼ同一で b-LF を含まない錠剤を一日あたり 3 錠を与えた。4 週ごとに医師による問診、身長、体重、腹囲、臀部囲、血圧、採血を行い、被験者は日記に運動量と食事を記録

した。しかし、食事療法及び運動療法は特に指示しなかった。

図 1 に示すように b-LF 腸溶錠群の内臓脂肪面積は摂取前と比べて有意に減少したが、プラセボ群のそれは変化がなかった。両群のあいだには群間比較で危険率 1%以下の水準で有意差がある。b-LF 腸溶錠群における内臓脂肪と皮下脂肪の減少率を比較すると、興味あることに前者の低下率は後者と比べて有意に高く、b-LF 腸溶錠は選択的に内臓脂肪を減少させることを示唆した。この現象は

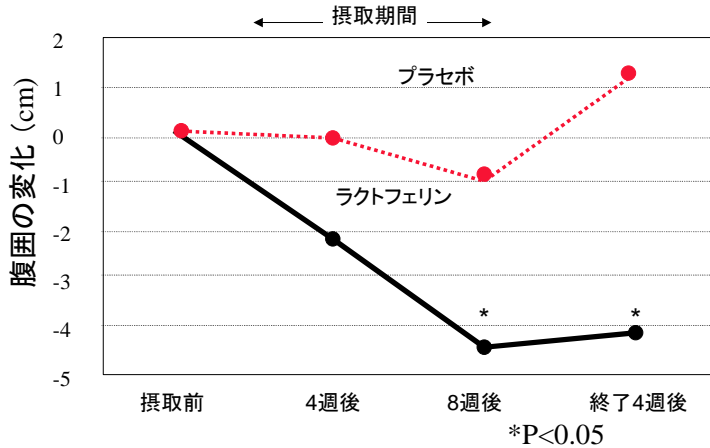


図 2. 腹囲の変化

摂取直前、4 週、摂取終了直後の 8 週及び摂取終了 4 週目の腹囲を測定して図示した。プラセボ群の腹囲は有意に変化しないのに対し、b-LF 群では 8 週(P<0.05)と投与終了 4 週後(P<0.05)で腹囲が縮小した。つまり、b-LF には腹囲に対し“効能の持越し(キャリアーオーバー)効果がある。

ようになった人など、b-LF の腹囲縮小効果について多くの情報が集積している。この二重盲検試験でも、プラセボ群の腹囲は有意な変動がないが、b-LF 群のそれは 8 週目と摂取終了 4 週目で有意な縮小効果が認められた。つまり、b-LF の腹囲縮小効果は、b-LF 摂取を中止しても持続する“持越し効果が認められる。何故、持越し効果が見られるのかは、今後の検討課題である。

図 3 は体重の変化を示した。プラセボ群の体重は、実験開始から 12 週にわたり、殆ど変わらないが、増加傾向にあるのに対し、b-LF 群は摂取 4 週及び 8 週後に有意な体重減少が認められた。さらに摂取

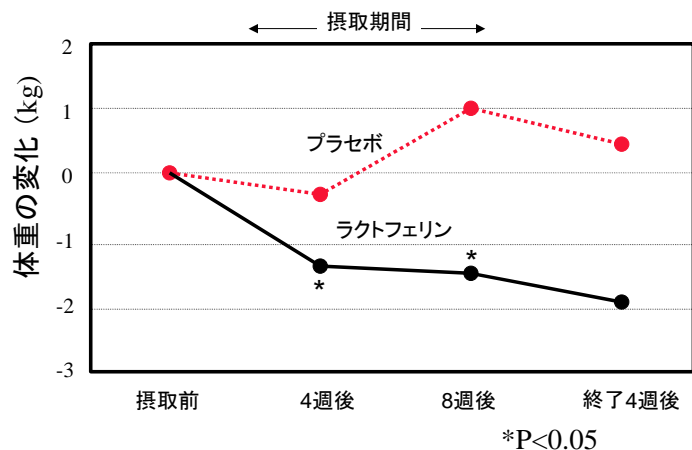


図 3. 体重の変化

摂取直前、4 週、摂取終了直後の 8 週及び摂取終了 4 週目の体重を測定して図示した。プラセボ群の体重は有意に変動しないのに対し、b-LF 群では 4 週(P<0.05)と 8 週目(P<0.05)に体重が減少した。また、摂取終了 4 週目でも体重減少が持続し、プラセボ群とのあいだに 2kg 以上の差があったが、統計的には有意でなかった。

「内臓脂肪はエネルギーの一時的な貯蔵庫、皮下脂肪は断熱・保温を兼ねた脂肪貯蔵庫」という説と合致し、b-LF による基礎代謝亢進は、一時的な貯蔵エネルギーである内臓脂肪を優先的に消費するためであることを裏付ける結果となった。

次の図 2 に腹囲の変化を示す。筆者等の調査でも、b-LF を摂取してズボンがだぶだぶになった人、直立してもお腹が邪魔で見えなかった足先が見える

が終了した4週間後もボランティアは減少した体重を維持していた⁽¹⁵⁾。

6. まとめ

2009年に国際ラクtofフェリン会議が北京で開催されることからわかるとおり、年々、ラクtofフェリンの研究は広がり厚味を増してきている。その特徴は多機能性にあり、フォーラムごとに予想もしなかった新しい発見があって驚かされる。今回も、まったく新しい分野を開拓するであろうと予測される報告が二つあった。その一つは輪千等(星薬大とサラヤ株)が発表したラクtofフェリンの創傷治癒促進効果である。今回の発表では、糖尿病マウスの創傷修復がラクtofフェリンの塗布により促進されること、**confluent**に達したケラチノサイト培養の一部をかきとり、ラクtofフェリンを含む培地を加えると、細胞が遊走して空隙を埋める様子を見事に証明していた。皮膚に塗布したラクtofフェリンの一部は角層を通過し、基底層に到達することが証明されているだけに、この発見は糖尿病性神経障害に基づく下肢の潰瘍、各種の創傷、褥瘡の治療に応用できて、化粧品としても活用されてゆくことは確実である。特に、ラクtofフェリンは紫外線による皮膚の酸化ストレスを回避させるので、皮膚の老化を抑制する化粧品として広く使われるようになるだろう。

動物衛生研究所プリオン病研究センターの岩丸等が発表したラクtofフェリンによるプリオン複製阻害の研究は、プリオン病の予防・治療に止まらず、脳・神経の変性疾患治療・予防に新しい突破口を開く研究として注目に値する。

今回はシンポジウムで5題の「ラクtofフェリンの臨床応用研究」が発表された。そのうちの2報が胃におけるラクtofフェリンの加水分解を回避し、丸ごとの分子を小腸まで到達させる“腸溶製剤派”、残りの3報はラクtofフェリンが胃で急速に加水分解される従来型の製剤を使った“非腸溶派”である。対照的だったのは、腸溶派の投与量が非腸溶派の1/10の少量にもかかわらず、臨床的な指標を有意に改善していたが、非腸溶派は、一日あたり1.8g~3.0gも投与しながら、指標の有意な改善が一向に見られないことである。医療関係者のあいだでは従来型の**b-LF**製剤は経口投与しても無効というのが通説になっているにもかかわらず、相変わらずこの種の臨床研究が続いているのは困ったものである。

非腸溶派が**b-LF**の臨床試験を行った論拠は、ネズミによる薬理実験にある。つまり、**b-LF**は飼料に混合して与えさえすれば、いろいろな薬効が発現することは事実である。しかし、ネズミに**b-LF**を強制経口投与した場合には必ずしもそうではない。大量に与えても、薬効が発現しないことが殆どなのである。混餌実験におけるネズミでの有効性が、人の臨床的な有効性を担保していないのである。

胃でペプシン消化された断片が**b-LF**の薬理効果の本体だというドグマも、とうの昔に破産している。ドグマが真であるとすれば、今回、発表された新潟大における歯周病の臨床試験も、リポソーム**b-LF**と同様のポケット縮小効果を示したはずである。この試験は一日3回口腔内で毎回30分かけて**b-LF**チュアブル錠をなめて溶かす規約で行われた。被験者に心理的及び時間的に大きな負担をかけた試験だったのである。

当研究会によせられた情報によれば、腸溶性 b-LF 製剤は西洋医学の弱点である種々の慢性病を克服する有力な手段であり、慢性病患者の QOL を改善する。したがって、これからの超高齢化社会において、がんを始めとする慢性病の改善に大きな役割を果たすであろう。しかも、丸ごとのラクトフェリン分子が小腸に到達しないと効果を発揮できないことがますます明確になってきた。今回のフォーラムは、これまでの臨床研究に対し反省を迫る内容だったのである。

引用文献

- (1) ラクトフェリンフォーラムについては次の URL を参照のこと。
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/lactoferrin/lf-forum.htm>
- (2) 第 9 回国際ラクトフェリン会議については次の URL を参照のこと。
<http://www.lactoferrin-conference.com/>
- (3) 輪千等。ラクトフェリンフォーラム要旨集 (O-3) : pp29
- (4) Lyons TE et al. Am J Surg. 2007; 193: 49-54.
- (5)
- (5) 岩丸等、ラクトフェリンフォーラム要旨集、2008(P-17); pp51
- (6) Iwamaru et al. J Neurochem. 2008; 107: 636-46
- (7) Kawamata T et al. Am J Pathology. 1993; 142: 1574-85.
- (8) Singh PK et al. Nature. 2002 May 30; 417: 552-5.
- (9) 若林等、ラクトフェリンフォーラム要旨集、2008(O-7): pp29 FDA drug information; Periochip/Chlorhexidine Gluconate 2.5 mg, Application No.: 20-774. Approval Date: 5/15/1998
- (10) 神宮等、ラクトフェリンフォーラム要旨集、2008(P-12): pp46
- (11) 石角等、ラクトフェリンフォーラム要旨集、2008(S-2): pp16
- (12) Bonito AJ et al. J Periodontol. 2005; 76: 1227-1236
US. FDA Drug Information: PerioChip Approval Date; 5/15/1998
- (13) Takeuchi T et al. Br J Nutr. 2004; 91: 533-38
- (14) Hayashida K et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004; 286: R359-65
- (15) 村越等、ラクトフェリンフォーラム要旨集、2008(S-5): pp19