

ラクトフェリンは免疫アジュバント

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

本誌 2～3 月号で遺伝子組換えヒト・ラクトフェリン (Talactoferrin; TLF) が米国で非小細胞肺癌に対する治療効果を検証するため第三相臨床試験に入ったことを報告した。白金錯体/タキソールと併用した末期の非小細胞肺癌に対する臨床第二相の二重盲検試験において、TLF の経口投与(一日 3g、2 回分服)が有意な改善効果を示したからである。非小細胞肺癌末期のステージⅢb～Ⅳ患者を治療する第一選択は、白金錯体/タキサン系抗癌剤の併用である。これに TLF を付加すると、対照群と比べ①有効率の向上、②延命効果、③副作用の軽減等が認められた。また、TLF 単独使用の場合も、有意な延命効果が認められている。作用機作は小腸パイエル板から吸収された TLF が、担がん患者の樹状細胞を成熟/活性化させ、癌を免疫的に破壊するエフェクター細胞、NK、NK-T 細胞及び CD4+、CD8+リンパ球を賦活するためとされている。つまり、TLF はエフェクター細胞の癌抗原に対する認識を高めるアジュバントとして抗癌作用を発揮するらしい。そこで今回は、ラクトフェリンのアジュバント効果について説明する。

ラクトフェリンは BCG の効果をたかめるアジュバント

東欧のポーランドは、1980 年代から Zimecki 博士が中心となってラクトフェリン研究に取り組んできた。彼の弟子数人は米国テキサス州ヒューストンに移住し、米国におけるラクトフェリン研究センターの一つになっている。昨年、ポーランドグループの Kruzal, Actor 等はラクトフェリンが BCG の抗結核効果を増強するアジュバントであることを報告しているの紹介する(1)。

BCG は 1921 年、フランスのカルメットとゲランが経代培養を繰り返して弱毒化したウシ型結核菌で、結核予防用ワクチンとして実用化されている。その後、BCG を改良する幾多の試みは、ことごとく失敗に終わり(2)、今にいたるまで最初に導入された菌株がワクチンとして使われている。二の腕に癍痕化した BCG 注射跡をお持ちの年配の読者が多数おられることだろう。乳児期～学齢期に BCG 注射を受けた名残である。かつて我が国では肺結核は青年層の死亡原因第一位をしめ、亡国病といわれた時代があった。いつの間にか結核菌はおとなしくなり、現在では昔日の面影がない。

この研究の目的はラクトフェリンが BCG の感染防御効果を増強するかどうか検証することである。Actor 等は BCG をフロイント不完全アジュバントあるいは生理食塩水に懸濁して C57BL/6J マウスを免疫し、一定時間後に強毒の結核菌 (エルドマン株) を経鼻感染させて、免疫時のラクトフェリンの付加が感染経過にどう影響するかを観察した。膨大な実験なので、フロイントの不完全アジュバントで懸濁して免疫した場合に限り紹介する。

図 1 は BCG を予防接種したマウスに結核菌強毒株を経鼻感染させた際における肺及び脾

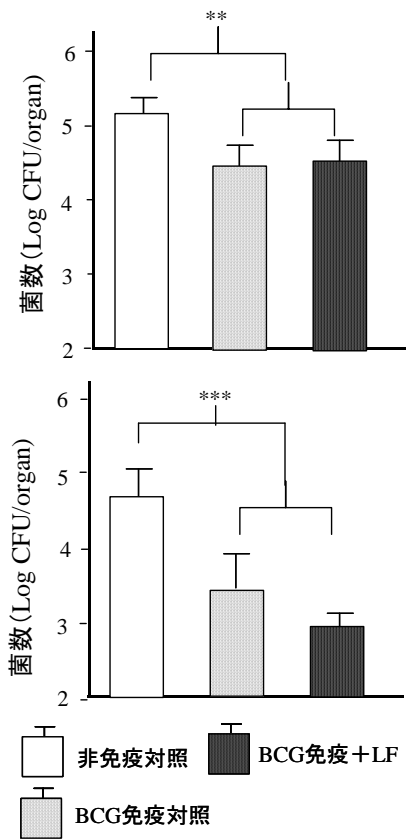


図 1. 結核菌の経鼻感染マウスにおける肺(上段)及び脾臓(下段)の生菌数
BCG(10^6 CFU/mouse)で免疫し、2週間後に強毒結核菌(エルドマン株 <100 CFU)を経鼻感染させ 28 日目に肺と脾臓の生菌数を計測した。ラクトフェリンは $100\mu\text{g}/\text{mouse}$ をフロイント不完全アジュバントに混合し、尾の基部に皮下注射した。図は Mean \pm SE. ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ in Student's t-test N=4

臓の結核菌数を示す。図から明らかなように BCG をフロイント不完全アジュバント (IFA) に懸濁してマウスに免疫すると、肺及び脾臓に感染したヒト型結核菌の菌数を有意に減少させた。BCG に添加するラクトフェリンの有無が臓器の菌数に及ぼす影響については、肺では影響がないが脾臓ではラクトフェリンを添加すると臓器あたりの菌数が減少した。データは省略するが、BCG を生理食塩水に懸濁して予防接種した場合でも、BCG-ラクトフェリン群のほうが BCG

単独と比べ菌数が少なかった。BCG 予防接種の感染防御効果は明らかだが、ラクトフェリンが BCG の感染防御能を増強するかどうかは明らかでない。

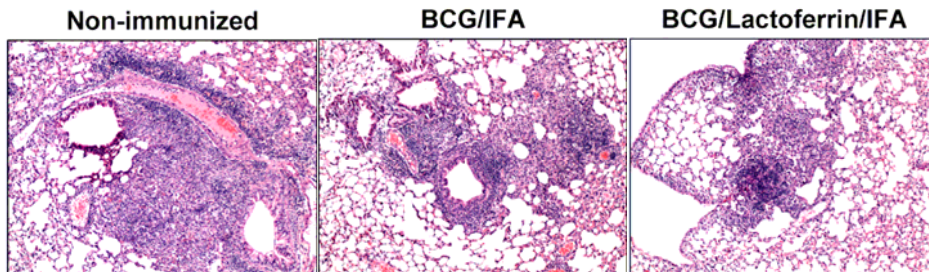


図 2. BCG とラクトフェリンで免疫したマウス肺の病理所見

BCG(10^6 CFU/mouse)で免疫し、2週間後に強毒結核菌(エルドマン株 <100 CFU)を経鼻感染させ 28 日目に肺と脾臓の生菌数を計測した。ラクトフェリンは $100\mu\text{g}/\text{mouse}$ をフロイント不完全アジュバントに混合し、尾の基部に皮下注射した。図左; 非免疫対照、図中; BCG/IFA で免疫、図右; BCG/ラクトフェリン/IFA で免疫。ヘマトキシリン・エオジン染色(40 倍)。一群 6 頭のマウスから選んだ代表例。

結核の感染経路はほとんど経気道性である。一般にごく少量の結核菌が気道深く侵入して肺胞内

に達し、肺胞マクロファージ中で増殖を始める。マクロファージは細胞内寄生菌に対しては自然抵抗性を持っているが、結核菌のような強毒菌は細胞の抗菌作用を破壊し、菌が増殖して細胞は死滅しする。死細胞は他のマクロファージによって貪食されてさらに菌は増殖を続け、肺に定着して初感染病巣を形成する。この間に、マクロファージによって結核

菌の抗原提示を受けた T リンパ球が特異的に感作され、免疫が成立する。感作 T 細胞は抗原刺激によって多種類のインターロイキンを産生し、これによって活性化したマクロファージが結核菌の局在する病巣部分に集積し、類上皮細胞肉芽腫組織となって病巣は被包され、やがて乾酪化に陥る。図 2、左の濃く赤紫色に染まる部分は、上記の炎症性肉芽腫である。BCG/IFA で免疫したマウス肺の肉芽腫は、対照群のそれと対比すると肉芽腫の部分が明らかに小さい。さらに、図 2 右のようにマウスを BCG/ラクトフェリン/IFA で免疫すると、肉芽腫は縮小し、肺胞における炎症と浸出液は減少していた。すなわち、ラクトフェリンを含むフロイント不完全アジュバントに BCG を懸濁して免疫すると、含まない場合と

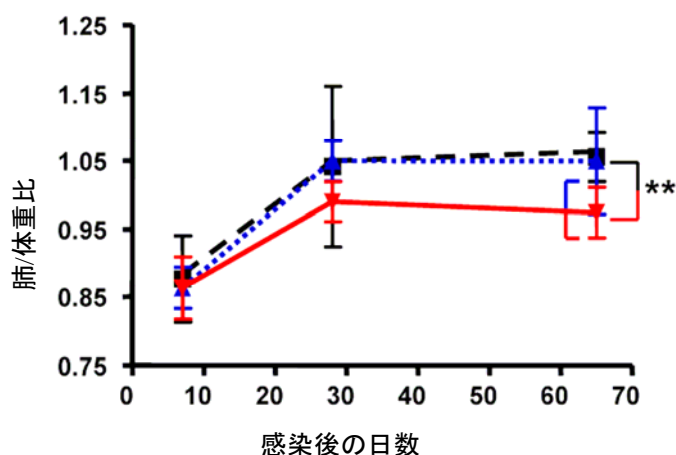


図 3. 各群における肺/体重比の変化

黒点線；非免疫対照群、青点線；BCG 免疫群、赤実線；BCG/ラクトフェリン群。結核菌の経鼻感染 7 日、28 日並びに 63 日目に肺を摘出して重量を測定した。各点；Mean±SE (n=6)。63 日目では BCG/ラクトフェリン群とその他の群とのあいだに P<0.01 で有意差がある。

たマウスから得た脾細胞と比べ有意に多量の IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 及び IL-1 β を産生する。したがって、結核菌の感染防御用ワクチンは、BCG 浮遊液にラクトフェリンを添加すると防御効果がさらに高まる可能性がある。

比べ感染症が改善されたように見える。

結核菌が肺に感染して病巣をつくると、炎症による浮腫と蛋白質を含む滲出水が肺胞に貯留するため図 3 に示すように肺重量が増加する。赤実線で示す BCG/ラクトフェリン群は、対照群並びに BCG 免疫群と比べて肺重量の増加が有意に抑制された。この結果は図 2 に示した BCG/ラクトフェリン群肺における肉芽腫抑制を支持している。一方、BCG/ラクトフェリン/IFA で免疫して 2 週間後のマウス脾臓から得た脾細胞は、BCG 抗原で刺激すると BCG/IFA で免疫し

ラクトフェリンは旅行者下痢症ワクチンの防御能を強化するアジュバント

最近になって論文化されたが、ラクトフェリンが旅行者下痢症の予防に有効であることは以前から知られていた(3)。この研究でアジュバントの原料として使われる *Hafnia alvei* は、ヒスタミン食中毒の原因菌である。中毒はヒスタミンが蓄積した赤身魚を摂取して惹起される化学性食中毒であり、喫食後 30 分ほどで顔面紅潮や発疹などのアレルギー様症状を呈する。ヒスタミン食中毒は化学性食中毒に分類されているために原因菌に対する関心が低く、現在までにヒスタミン食中毒事例において実際に原因菌として分離・特定されたのは *Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae* および *Hafnia alvei* のみであった。これらは腸内細菌科細菌であり、腸内細菌科ヒスタミン生成菌はヒスタミン生成能が高く、赤身魚から頻繁に分離されることから主要な食中毒原因菌とされてきた。ポーランド学派の Zimecki 等は *H. alvei* の LPS 複合体 (MPLH a) を免疫アジュバントとして研究し、その LPS から単離したモノフォスホリル・リピッド A とラクトフェリンとの複合体は、一般的な抗原に対し体液性及び細胞性免疫を亢進させるアジュバントになる可能性があることを指摘した。

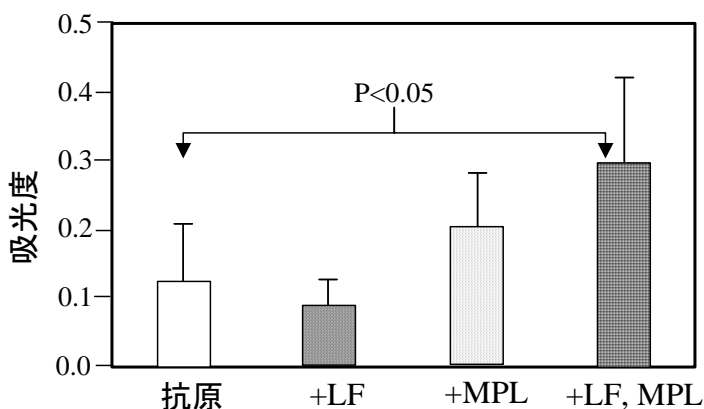


図 4. *Hafnia alvei* のリピッド A とラクトフェリン併用による *Plesiomonas shigelloides* の死菌ワクチンの特異的 IgG 抗体産生増強

BALB/c マウスを *P. shigelloides* DNCTC 138/92 の死菌ワクチンにアジュバントを加え皮下注射して免疫。注射死菌体は 0.1 μ g/マウス、LF 50 μ g, MPL 2.5 μ g, LF-MPLH 50/2.5 μ g である。MPLH a は図で MPL と省略した。免疫注射は毎週行い、最終免疫の 1 週間後に採血し、血清の抗 *P. shigelloides* 抗体を測定した。

べ、血清の抗 *Plesiomonas shigelloide* 特異抗体は有意に上昇し、さらにデータは省略するが抗原特異的な血清 IgG2a, IgG1 及び IgA も有意に増加した。

加えて、アジュバントが MPLH a 単独の場合と比べ、ラクトフェリンとの複合体を投与すると、感染マウスの肝臓から検出される病原菌が有意に減少する(図 5)。すなわち、死菌

彼らは今年発表した論文で旅行者下痢症の原因になる *Plesiomonas shigelloides* DNCTC 138/92 の死菌ワクチンに加え MPLH a/ラクトフェリン複合体をアジュバントとして免疫した BALB/c マウスは、*P. shigelloides* 感染に対する強い感染防御能を獲得することを見出した(4)。ちなみに、MPLH a はラクトフェリンと強い親和性を持って結合する性質がある。

図 4 に示すように、そのアジュバント効果は、血清中の抗原特異的な IgG の上昇によって証拠立てられる。ラクトフェリンと MPL を良好者下痢症病原菌の死菌と混合して注射すると、抗原を単独注射した場合と比

ワクチンだけを注射した場合と比べ、ラクトフェリン-MPLH a 複合体をアジュバントとして注射すると、肝臓から検出される菌数は 1/10 以下に減少した。脾臓から検出される菌数も肝臓の場合と同様な傾向であった。

予防接種にはアジュバントが必須である。アジュバントのなかでも *Salmonella minnesota*

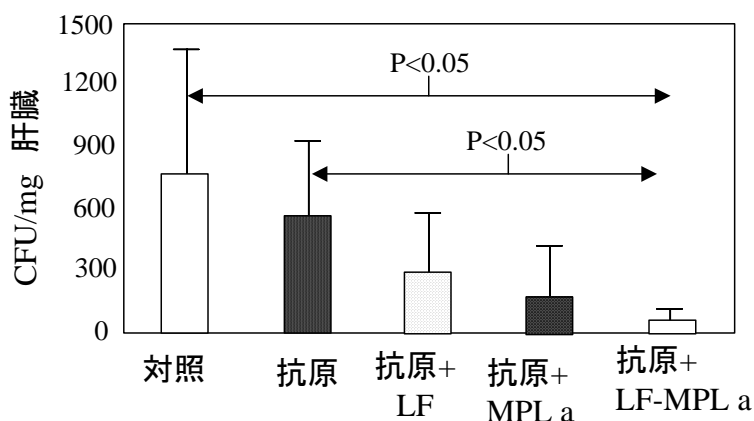


図 5. *P. shigelloides* 感染 24 時間後における免疫マウスにおける肝臓の菌数

3 回抗原+アジュバントで免疫して 1 週間後に 1.5×10^8 CFU の *P. shigelloides* を静脈内感染させ、24 時間後に肝臓を摘出して菌数を計測した。抗原及びアジュバントの量は図 4 と同じである。

Mean \pm SE, n=7

R595 から単離したリン酸化リピッド A は、アジュバントとして最有望と言われている。部分的に実用化されている。重要なのはラクトフェリン-MPLH.a. 複合体がマウスのフットパッドを用いる起炎テストで炎症性が弱いことで、水酸化アルミニウムゲルのように体内に残留する危険が低いことである。さらに細胞培養に加えると、MPLH a より TNF- α の誘発能が低いことはアジュ

バントとして有利な条件である。これらの特徴は新しい MPLH a とラクトフェリンの複合体がアジュバントがヒトへのワクチン投与に当たっても有用かもしれない。

BCG で免疫する場合、ラクトフェリンを同時に注射すると結核菌感染に対する防御能が有意に高まること、グラム陰性細菌のリポ多糖とラクトフェリンからなる複合体をアジュバントとして旅行者下痢症の病原菌の死菌ワクチンに混合してアジュバントとして注射すると、病原体に対する体液性及び細胞性が亢進することも明らかになった。これらの結果からラクトフェリンが体内で免疫アジュバントとして作用していることはほぼ確実である。しかし、これらの知見はウシのラクトフェリンを使って得られたものである。ヒトに応用するためには、さらなる検討が必要なことは言うまでもない。一方、ラクトフェリンが樹状細胞の成熟/活性化を通じ、癌抗原を識別して破壊するエフェクター細胞を賦活することを強く示唆する論文がニューランドのオークランド大から発表された。この論文の紹介は次号以降に譲ることにする。

- (1) Shen-An Hwang et al. Lactoferrin enhanced efficacy of the BCG vaccine to generate host protective responses against challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. 25: 6730–6743, 2007
- (2) Behr MA. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 86-92
- (3) Mohamed JA et al. A novel single-nucleotide polymorphism in the lactoferrin gene is associated with susceptibility to diarrhea in North American travelers to Mexico. *Clin Infect Dis*. 44: 945-52, 2007.
- (4) Chodaczek G et al. Lactoferrin-monophosphoryl lipid a complex enhances immunity of mice to *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 138/92. *Acta Biochim Pol*. 55: 91-6, 2008.