

第 56 回 ; ラクトフェリンと新型インフルエンザ

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

はじめに

第 51 回の本誌ミニレビューは、新型インフルエンザ・ウイルス(ブタ H1N1 型)がメキシコで変異を起こし、「ヒトからヒト」へ感染する性質を獲得する直前に書かれた。その後、当時は不明だった新型ウイルスの正体が明らかになったので、以前の版を改定し再び世に問うことにした。幸いなことに、新型ブタ H1N1 ウイルスは、同じ血清型に属するスペイン風邪(H1N1)ほどの毒力 (virulence) がないので、大流行しても 3 年以内には終息するのではあるまいか。

哺乳類は 1 億 6 千万年~2 億 2500 万年ほど昔、地球に出現したと云われている。この間、幾多の生物が絶滅を繰り返したにもかかわらず、哺乳類がこれほど長期にわたって生命をリレーできたのはなぜだろうか？哺乳類新生仔は、母親から産まれたとたん生存にとって最大の危機を迎える。新生仔は自力で呼吸を始めて体内に酸素を取り込むので、身体は酸化ストレスにさらされるようになる⁽¹⁾。母親から栄養を与えられていた臍帯ルートは遮断され、産まれるとミルクから栄養を摂取し、成長と体温維持のためのエネルギーを自前でつくるようになる。母親の胎内は無菌なので、新生仔は産まれるやいなや、腸管をはじめ皮膚及び粘膜に細菌、真菌等の微生物とウイルスが寄生するようになる。そのなかには病原微生物と病原ウイルスも含まれているので、免疫系が未成熟の新生児は侵入を試みる病原菌、病原ウイルスとも戦わなければならない。さらに、動きが鈍い出生直後は、肉食獣に捕食される最大の危機なので、新生仔はできるだけ迅速に身体を成長させる。

他の哺乳類と比べ未成熟な状態で産まれる人類は、成長しながら学習してゆく。ヒト新生児の脳重量は、脳神経細胞の数は増えないが、生後半年で 2 倍、2 年半後には 4 倍に達するほど急速である。これらはいずれも新生児にとって大きなストレスである。なぜ新生児がストレスに耐えて成長し、生命を後の世代にリレーできるのだろうか？ミルクこそ 2 億年以上にわたる生命のリレーを可能にした原動力の一つであるというのが筆者年来の持論

である。ミルクは新生児の急速な成長過程で起こる種々の障害を克服する成分を含んでいる。しかも、免疫的に未熟な状態で産まれる新生児は、多種多様な病気にかかる。それに対応してミルクに含まれる防御因子も実にバラエティに富んでいる。図 1 にヒト母乳と牛乳の成分を対比した。牛乳と著しく異なるのは、母乳は主要なミルクた

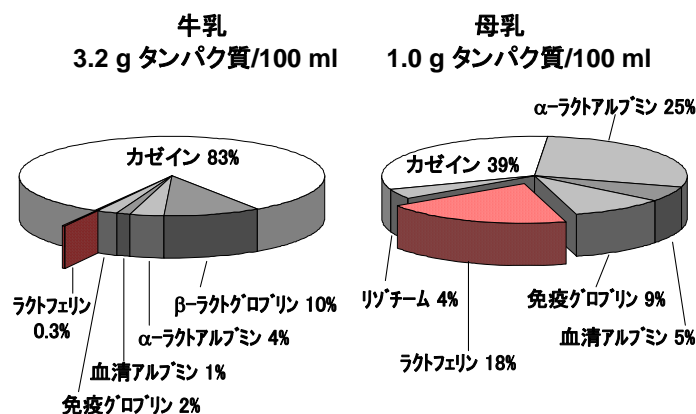


図 1. 母乳と牛乳のたんぱく質存在比

北海道大学、島崎敬一名誉教授提供

んぱく質であるカゼインの含量が少なく、多機能性たんぱく質である LF、免疫グロブリン、 α -ラクトアルブミン及びリゾチームが大きな割合を占めていることである。LF が最大の生態防御因子であること示唆する事実としては、膿汁の LF 含量からも明らかだ。血液を含む体液中の LF 含量は約 $0.2 \mu\text{g/ml}$ だが、好中球が感染の最前線で戦った末の残骸、膿には $800 \mu\text{g/ml}$ を越える LF が含まれている⁽²⁾。

I 型インターフェロン

以前、インターフェロン α/β と呼ばれた I 型インターフェロン (IFN) は、哺乳動物が進化の過程で獲得した最強かつ非特異的な抗ウイルス物質である。非特異的であるから、ヒト IFN はあらゆるヒトのウイルス感染症を抑制するが、別種、例えば、ネコのウイルス感染にはヒト IFN は効果がない。図 2 に示すように、哺乳動物は病原性ウイルスの種類を問わず、感染局所に I 型 IFN を産生し、感染が拡大しないよう防御のバリエードを築く。すなわち、ウイルスが細胞質に侵入して増殖を始めると、感染局所の上皮細胞+繊維芽細胞

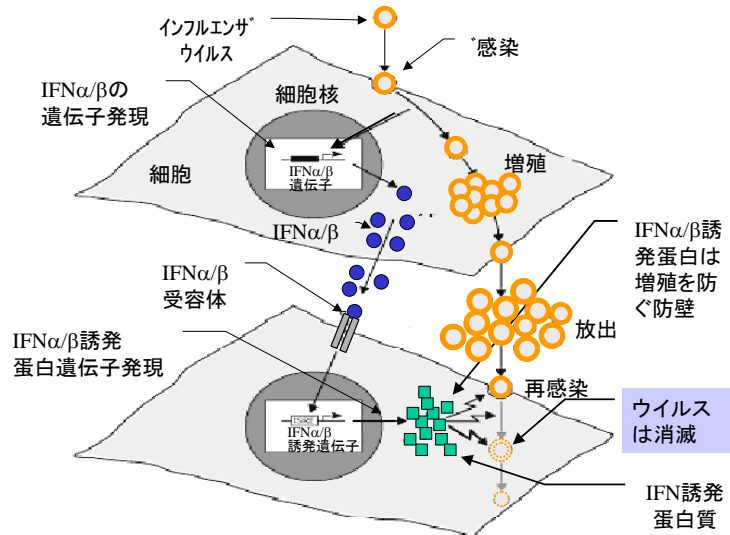


図 2. I 型インターフェロン産生によるウイルス感染拡大の阻止

インフルエンザ・ウイルスを例にとると、肺に吸い込まれたウイルスは細胞内に進入し、細胞質で増殖を始める。ウイルス RNA はトル様受容体に結合して I 型インターフェロン遺伝子を発現させて、インターフェロンが産生され、周囲の微小環境に放出される。I 型インターフェロン、IFN α は IFN 誘発遺伝子を発現させ、細胞質に IFN 誘発蛋白が放出される。このたんぱく質が細胞質に存在すると、ウイルス粒子は感染しても増殖できず死滅する。

と遊走してきたプラズマ細胞性樹状細胞 (pDC) の細胞核は、I 型インターフェロン遺伝子を発現させ、青玉で示す I 型 IFN を大量に産生する。細胞外に放出された青玉は、周辺の細胞表層に存在する IFN 受容体に結合して核内に取り込まれ、DNA の特定部位に結合して ■ で示す I 型 IFN 誘発蛋白遺伝子を発現させる転写因子である。この経路で ■ が細胞質で合成されると、侵入したウイルスは細胞質で増殖できなくなり消滅する。つまり、哺乳動物は病原性ウイルスの種類を問わず、感染した局所にピンポイントで I 型 IFN を産生し、感染が体内に拡大しないよう防御のバリエードを築くのである。I 型 IFN は C 型肝炎を始めある種の癌治療薬として使われているが、それによる治療は多彩かつ重篤な副作用を呈する。いわば、他に治療手段がないための緊急避難先だからである。このことは内因性

の I 型 IFN が、副腎皮質の糖コルチコイドやインスリンのように循環血により全身に運ばれ作用を発揮するホルモンではなく、ウイルス感染局所に産生され、その場所で消費され

る局所的な防御物質であることを示唆する。

新型インフルエンザウイルス

近年、鳥の A 型インフルエンザ (H5N1 型) が鳥から人に感染する事例が数多く報告され、インドネシア、タイ、ヴェトナム等の東南アジア諸国では、トリの H5N1 がヒトに感染し、高率で致死的な肺炎を起こすので恐怖の的になっている。鳥の H5N1 型がヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザ・ウイルスに変異する可能性が高まっているのである。表 1 及び 2 に示すように、人類は新型インフルエンザに対する免疫を持っていないため、ヒトからヒトへと容易に感染して世界的な大流行 (パンデミック) を引き起こし、大きな健康被害と社会の混乱を惹起することが懸念されている。

表 1. A 型インフルエンザ・ウイルスの赤血球凝集素の分布

赤血球凝集素	H1	H2	H3	H7
ヒト	○	○	○	—
ウマ	—	—	○	○
ブタ	○	○	—	—

水禽類は H1~H13 にいたるすべての赤血球凝集素を保有。

表 2. A 型インフルエンザ・ウイルスのノイラミニダーゼの分布

N1	N2	N7	N8
ヒト	ヒト	—	—
—	—	ウマ	ウマ
ブタ	ブタ	—	—

水禽類は N1~N9 にいたるすべての型のノイラミニダーゼを保有。

1918 年から翌 19 年にかけて、世界に流行した A 型インフルエンザのパンデミック “スペイン風邪” は、感染者 6 億人、死者 4000~5000 万人の大災害をもたらした。わが国の人口統計でも 1919 年~1921 にかけて肺炎の死者が急増しているのは、スペイン風邪の影響である (図 3)。スペイン風邪の病原体は、鳥 A 型インフルエンザウイルスに由来する H1N1 亜型であった。つまり、スペイン風邪はそれまでヒトに感染しなかったインフルエンザウイルスが突然変異し、ヒトからヒトへ感染する能力を獲得して大惨事を起こしたのである。当時の人々にとっては全く新しい感染症であり、それに対する免疫を持った人がいなかった

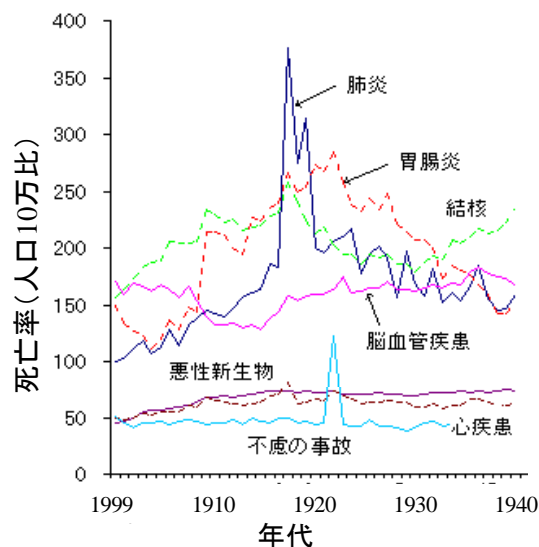


図 3. 1919~1921 年におけるスペイン風邪パンデミックによる死亡率の激増

この当時の大きな死亡原因は、風邪、胃腸炎、肺結核、脳卒中であった。人口動態統計月報；年計 (概数) の概況、厚生省、人口動態統計 (平成 10 年) より引用 (8)

たからだった。

幸いなことに今回流行しているブタ由来の H1N1 型は、virulence が H5N1 型より弱いので大きな社会的混乱を起こすには至っていない。厚労省はパンデミックが起こると人口の約 1 / 4 が感染し、医療機関を受診する患者数は最大 2500 万人に達すると想定し災害に備えている。過去に流行したインフルエンザのデータから入院患者は 53 万人～200 万人、死亡者は 17 万人～84 万人と推定される。このような状況下で頼りは、“ワクチン” と “抗ウイルス剤” である。果たしてそれだけだろうか？

内因性 I 型 IFN は A 型ウイルス・パンデミックに有効だろうか？

生体における I 型 IFN の役割は、ウイルス感染局所で産生され、感染拡大を阻止するため局所にバリケードを築くことにある。以前は I 型 IFN を産生する細胞は、血中の免疫細胞と血管内皮細胞、組織の繊維芽細胞と考えられてきた。研究の進展とともに、ウイルス感染時に多量の I 型 IFN を産生するのは、常時、体内をパトロールしているプラズマ細胞由来の樹状細胞 (pDC) であることがわかってきた。pDC はウイルス感染により自然免疫受容体 (Toll like receptors; TLR) が刺激されると、I 型 IFN を多量に産生し自然免疫応答の増強に関与する樹状細胞の亜集団である。ウイルスが感染すると、pDC は走化性によりウイルス感染部位に集まり、ウイルス DNA、RNA の核酸を Toll 様受容体が認識し、感染に対する生体防御の中心的役割を担う I 型 IFN を生産しウイルスの増殖を抑制する。

これまでの議論から、新型 A ウイルスによるパンデミックを防ぐ最も有効な手段は、ウイルス感染の局所に pDC を迅速に走化させ、多量の I 型 IFN を産生させて周辺への延焼を防ぐことである。ウイルス感染時における I 型 IFN の産生量は、年齢、性別、基礎疾患の有無と種類、寒冷刺激の程度等々によって変動することが予想される。どのような条件が整うと I 型 IFN の産生応答を極大にすることができるかは、新型 A ウイルスによるパンデミックを防御する上で重要である。しかし、どのようにして I 型 IFN が大量に生産されるのか、具体的なメカニズムは謎のままで、インフルエンザ克服の手段は見つかっていないかった。

2008 年、カナダ McGill 大の Colina 等⁽⁹⁾は、マウスで I 型 IFN の産生を抑制する Irf7 タンパク質の発現をコントロールする 4E-BP1 及び 4E-BP2 と呼ばれる二つの抑制遺伝子を発見した。I 型 IFN の産生をコントロールするのは、IFN 抑制タンパク質 7 (Irf7) であり、これが体内の IFN の産生を抑制する主因子である。次に IFN 産生を抑制する 4E-BP1 及び 4E-BP2 抑制遺伝子をノックアウトしたマウスを作成したところ、ノックアウトマウスの pDC は予想通り大量の I 型 IFN を産生した。彼らはこのノックアウトマウスに鳥インフルエンザを含む 4 種のウイルスを感染させたが、対照マウスが死亡する条件でも感染症への発展は阻止されたと報告している。しかも、IFN 産生能が upregulate されたマウスには何らの異常は見つかっていないので、I 型 IFN 産生を抑制する遺伝子をノックアウトしても健康への被害はないらしい。

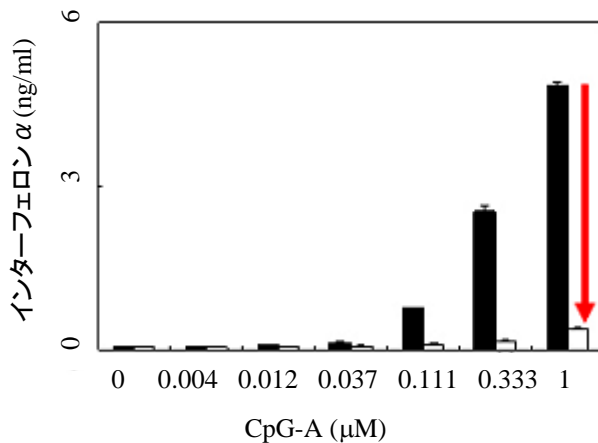


図4. PDC-TREM 特異的モノクローナル抗体による I 型インターフェロンの産生抑制

Toll 様受容体刺激物質 CpG-A の作用により形質細胞様樹状細胞から産生される I 型インターフェロンは、PDC-TREM に対する特異的モノクローナル抗体を作用させることにより、抑制することができる。

を抑制すると、I 型 IFN の産生が著しく抑制されることから、PDC-TREM が I 型 IFN の産生に必須の分子であることを明らかにした。さらに、pDC から産生される I 型インターフェロンは、PDC-TREM と会合して細胞表層に発現する PlxnA1 のリガンドを結合させることにより、増強することができることを示した(図5)。このように PDC-TREM 機能を人為的に制御して I 型 IFN 産生を増強することができると、社会的要請の高いウイルス感染症の克服が可能となるかもしれない。これら二つの論文から言えることは、安全確実に I 型 IFN 産生能を増強する方法は、ワクチン及び抗ウイルス剤と並んでウイルス感染のパンデミック阻止に有効だろうと云うことである。それでは安全無害に I 型 IFN 産生能を増強することが果たして可能だろうか。

同じ年、理化学研究所の渡会等⁽¹⁰⁾は、ウイルス感染時に I 型 IFN を大量に産生する pDC がウイルス核酸により刺激されると、pDC は彼らが PDC-TREM と名づけた蛋白質を発現し、それに引き続き I 型 IFN 産生が起こること、産生には PDC-TREM 発現が必須であることを報告した(図4)。

しかし、pDC がどのようにして大量の I 型 IFN を産生しているのか、具体的なメカニズムは不明のままだった。渡会等は、pDC が Toll 様受容体からの刺激信号を受けた後、pDC に特異的に発現する分子 PDC-TREM を世界に先駆けて同定したのである。そして、PDC-TREM 機能

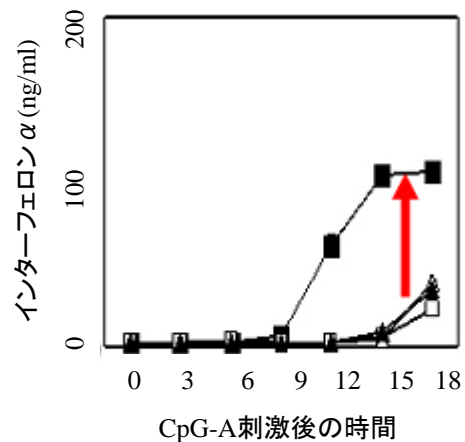


図5. PDC-TREM リガンドによる I 型インターフェロンの産生増強

Toll 様受容体刺激物質 CpG-A の作用により形質細胞様樹状細胞から産生される I 型インターフェロンは、PDC-TREM と会合する PlxnA1 に対するリガンドを作用させることにより、増強することができる。

ウイルス感染症とラクトフェリン (LF)

LFはウイルス感染に対抗する生体防御因子の一つであり、多数の論文がウイルス感染に対するLFの生体防御能増進を証明している。LFが、細胞培養レベル、実験動物レベル、さらに、臨床試験においてI型IFNの産生能を増進させたとする報告もあるが、LFの抗ウイルス活性とI型IFN産生能増強との因果関係は必ずしも明確ではない。

免疫不全症候群（ヒトではHIV）を起こすウイルスは、ヒト、サル、ネコ、マウス等に分布し、感染すると難治性の免疫不全を惹起する。意外なのはLFがHIVの感染に有効であるとする論文が相当な数にのぼることである。その大部分は細胞培養においてLFがHIV感染を阻止するメカニズムに焦点をあてているが、なかには母親から垂直感染したが、抗HIV剤の投与を受けていない小児感染者の臨床試験報告もある。Zuccotti等⁽³⁾はHIV感染の小児にウシLF(bLF)を投与すると、Tリンパ球の分化を誘導し、貪食能、NK細胞活性、TLR-2の発現、IL-12/IL-10の比を有意に改善することを報告した。二重盲検試験ではないが、bLFはHIV感染児の免疫能を有意に改善することは確かである。また、bLFはネコの免疫不全症候群ウイルス(FIV)にも有効らしい。ネコはFIVに感染すると、難治性の口内炎を発症し免疫的な過剰反応と持続性炎症を特徴とする病態を呈する。小林等⁽⁴⁾はFIVにより口内炎を発症したネコにbLFを経口投与し、採取した末梢血単核球(PBMC)をコンカナヴァリンA(ConA)で刺激して細胞分裂への影響とサイトカイン分泌をしらべた。その結果、bLFはConA刺激によるPBMCのプラスト化を抑制し、インターフェロンγとIL-2の産生を抑制することを明らかにした。つまり、bLFは臨床的な終末状態でもネコのリンパ球機能を改善し、過剰な炎症反応を抑制する。

堂迫等⁽⁵⁾は細胞培養においてラクトフェリンがI型ヘルペスウイルス(HSV-I)の感染を阻止することを報告した。それ以来、bLFがHSV-II、ヘルペス・ゾスター等のヘルペス属ウイルスの感染を阻止するメカニズムが追及されてきた。若林等はマウスのHSV-1感染実験において、bLFがHSV-1感染症による体重の減少を阻止したと報告している⁽⁶⁾。渡会等もHSV感染マウスの死亡率が、pDCをCpG-Aで刺激して誘発するI型IFN産生能増大に相関して低下することを報告している⁽⁷⁾ので、HSV感染症においてI型インターフェロンが感染症を阻止する主役であることは間違いない。

Enterovirus 71型(EV71)は、夏季に中国と東南アジアの小児に流行し、後遺症として重症の麻痺と脳炎を起こさせる“手足口病”の病原体である。このウイルスに対する抗ウイルス剤並びにワクチンは開発途上なので、感染を阻止する方策を見出すことは喫緊の課題である。Chen等⁽⁷⁾はEV71ウイルス感染に対しLFの有効性を証明する病態モデルを作成した。作成したのはブタLFをミルクに発現する遺伝子組替えトランスジェニック・マウスである。ブタLF遺伝子を組替えたBALB/cマウスのhemizygoteとhomozygoteは、ブタLFをマウスのミルク中に分泌する。出生4日目のマウスにEV71を接種し、トランスジェニック・マウスのミルクを与えたところ、生存率が有意に増加し、体重の増加率も対照群を上回った。EV71のウイルスRNAをRT-PCRで比較すると、ブタLFを含むミルクを与

えたほうは EV71RNA のコピー数が少なく、感染を阻止していることがわかった。つまり、LF を多量に摂取すると、EV71 の感染を抑制し“手足口病”の発症を阻止できる可能性がある。残念なことに、これらの研究は、殆どが現象論に留まっており、なぜ LF がウイルス感染を阻止するのかと言う本質を追及していないのは惜しまれる。

ラクトフェリンによるヒトでの I 型 INF 産生能の昂進

獲得免疫を持たずに産まれる新生児は、免疫的に成熟するまでに長い時間がかかるので、病原性ウイルスの感染に対し高感受性のはずである。実際には乳幼児のウイルス感染症は成人と比べても、それほど多いとは云えない。そこで、母乳には愛児を感染症から守る自然免疫の強化因子を含んでいると考えられてきた。それを見事に立証したのが図 6 のラクトフェリン経口投与による血液 buffy coat 画分の I 型 INF 産生能亢進である⁽¹¹⁾。実験は全血から白血球画分(buffy coat)を分離し、pDC を含む buffy coat にセンダイ・ウイルスを感染させ、放出される I 型 INF を測定する方法を採用した。

この臨床試験は、10 人の健康人男性ボランティアが参加するク

ロスオーバー二重盲検方式で行われた。個々のボランティアは 1 日あたり 319 mg のラクトフェリンを含む錠剤を 4 週間内服した。内服した錠剤は、LF の素錠とリポソーム化した LF を錠剤化した腸溶錠の 2 種類である。二つの製剤を交換する際、先行する錠剤の影響を消し去るため、休薬期間を 3 週間とった。リポソームは胃の消化酵素では破壊されず、小腸に流入して始めて外皮がリパーゼにより消化され包み込まれた LF を放出する。つまり、リポソームは完全な腸溶製剤である。10 例の平均値から明らかのように、リポソーム化 LF は白血球の I 型 INF (IFN- α) 産生能を 1 週間で 2 倍強、4 週間で 3 倍弱上昇させたが、素錠は IFN- α 産生能を有意に上昇させなかった。

二重盲検試験が示唆するのは、(1)ヒトに bLF を経口投与すると、pDC の I 型 INF 産生能を高める、(2) I 型 INF 産生能を増強するには、bLF が胃で分解されず小腸に到達して

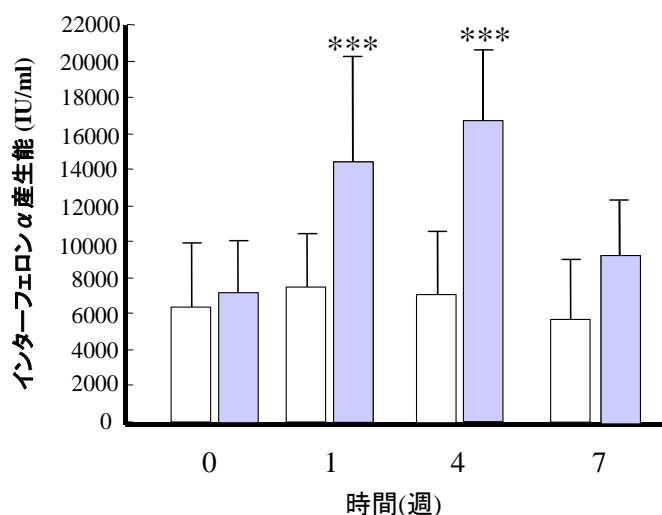


図 6. ラクトフェリンを経口投与した男性ボランティアから採血した単核球のインターフェロン α 産生能
健康人男性 10 名のボランティアにウシ・ラクトフェリンを 4 週間にわたり毎日 1 回、319 mg を経口投与し、投与直前、1 週間後、4 週間後及び 7 週間後に採血し、全血球をセンダイウイルスで刺激し、産生されるインターフェロン α を測定した。試験は二重盲検クロスオーバー方式で行われ、数値を平均値 \pm 標準偏差であらわした。白いバー；対照とした通常の錠剤、薄青のバー；リポソーム化したラクトフェリンの錠剤。
***P<0.001 in Student's paired t-test

腸管腔に放出される剤形で投与する必要がある。つまり、単に bLF を内服しただけでは、I 型 IFN 産生能は昂進しないのである。I 型 IFN 産生能が昂進するのは、bLF が分子として完全な形を保ったまま小腸に流入し、吸収された場合に限られている。

当研究会でも腸溶性ラクトフェリン製剤が、ウイルス感染症を阻止したのではないかという証拠を幾つかつかんでいる。ワクチンの発展によりウイルス感染症は克服されたと勘違いされているが、HSV-1 の治療ですらままならぬ状態なので、人類が病原ウイルスを制圧したというには程遠い。bLF は高度に安全であり、pDC の I 型 IFN 産生を昂進させることがわかってきた。この LF の性質は、新型インフルエンザウイルス、サーズ (SARS) 或いは日常的に起こるいろいろなウイルスの感染症阻止に有用ではなかろうか。

引用文献

- (1)Shoji H et al. *Pediatr Res.* 2007; 61: 89-92
- (2) Bryant RE et al., *Am J Med Sci.* 2004; 327: 73-6.
- (3) Zuccotti GV et al. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29: 353-5.
- (4)Kobayashi S et al. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 429-35.
- (5)Hasegawa K et al. *Jpn J Med Sci Biol.* 1994; 47: 73-85.
- (6) Wakabayashi H et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68: 537-44.
- (7)Chen HL et al. *Vaccine* 2008; 26: 891-8
- (8)人口動態統計月報 “年計 (概数) の概況” (平成 10 年) 厚生省
- (9)Colina R et al. *Nature.* 2008; 452: 323-8
- (10)Watarai H et al. *PNAS,* 2008; 105: 2993–2998.
- (11) Ishikado A et al. *Biofactors.* 2004;21(1-4):69-72.