

「ラクトフェリン実用化研究の新たな展開」——腸溶錠の開発と新規生理作用の発見——

“A New Development in the Study of Practical Lactoferrin Use” – Development of Intestine-Soluble Tablets and Discovery of New Physiological Effects
 “初乳抗毒物質実用化研究の新展開”——腸溶錠の開発と新規生理作用の発見
 “라크토페린 실용화연구의 새로운 전개”——장용정의 개발과 신규생리작용의 발견

株式会社 NRL ファーマ 特別顧問 清水洋彦

Hirohiko Shimizu, Senior Adviser, NRL Pharma, Inc. 株式会社 NRL 农场经营者 特别顾问 清水洋彦 주식회사 NRL 파마 특별고문 시미즈 히로히코

ラクトフェリンとは？

ラクトフェリン（以下、LF と略す場合がある）は1939年に牛乳から分離された鉄結合性の分子量約8万の糖タンパク質である。

母乳、特に初乳に多く含まれるが、成人においても涙液、唾液、腭液その他の外分泌液や好中球に含まれてお

り、毎日4～5g合成されていると言われる。

体内のLFは、大部分がアポ型で鉄イオンが結合していない状態であり、3価の鉄イオンに出会うとこれを強く結合することによって、酸化還元電位を調節している。

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、抗がん作用など、様々な作用のある多機能性タンパク質であり、健康サプリメントあるいは医薬品シーズとして近年注目されている。

豊富な学術研究のサポート

これまでに発表されたLFに関する学術論文数をPubMedで調べると驚くべきことに4500報を超える。昨今、流行りのコエンザイムQ₁₀が1360報、アガリクスが650報であることを考えると、LF研究がずば抜けて活発であることが分かる。

LFという魅力的な生理活性タンパク質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、International Conference on Lactoferrin – Structure, Function & Applications – という名前の国際会議が開催されており、今年10月16～19日にハワイで第7回の会議が開催される。会議の副題からも分かるように、構造、機能、及び応用といった幅広い分野、領域の研究者が一堂に介する研究討論の場で、最初の会議が1993年にハワイで開催されて以来、年々、参加者が増えており、最近では200名近い研究者が世界中から集まる。

わが国では森永乳業をはじめとする国内食品企業や大学の研究者の関心が強く、1999年に札幌で開催された第4回会議は、国内150名、海外90名の参加があったそうである。

会議を主催した北海道大学大学院農学研究科の島崎敬一教授のレポート¹⁾から、これまでの会議のトピックスを拾うと、第1回会議ではLFの一次構造、糖鎖構造及び高次構造が詳しく報告され、第2回会議ではLF遺伝子の解析、遺伝子組換えヒトLFの製造、LFのペプシン分解物であるラクトフェリシンの抗菌活性などが発表された。第3回の会議では抗腫瘍活性をはじめとするLFの多様な生

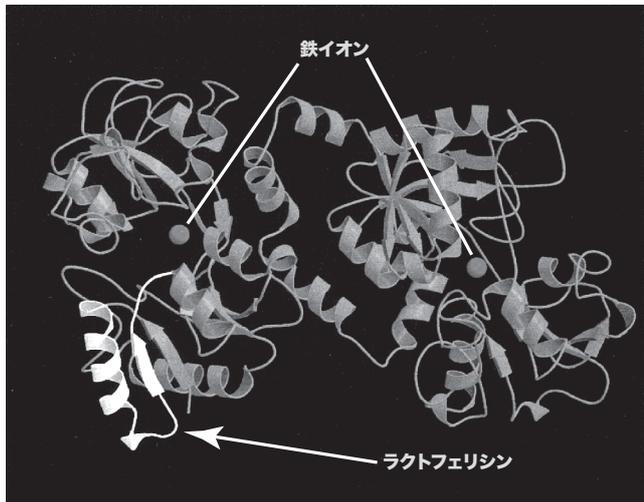


図1 ウシ・ラクトフェリンの分子構造
 (白色の部位がラクトフェリン、●は鉄イオン)
 (写真：E. N. Baker 博士、R. Kidd 博士提供)

表1 ウシ・ラクトフェリンの物理化学的性質

分子量	83,100
アミノ酸残基数	689
糖含量	11.20%
糖鎖数	4
等電点	8.2～8.9
鉄イオン結合数(1分子あたり)	2

表2 ヒト外分泌液中濃度および乳汁中濃度

ヒト外分泌液中のラクトフェリン濃度		人乳(母乳)及び牛乳中のラクトフェリン含量(mg/ml)		
唾液	5-10 μ g/ml	母乳	初乳	6～8
涙	0.7-2.2mg/ml		常乳	2～4
胆汁	10-40 μ g/ml	牛乳	初乳	～1
腭液	0.5mg/ml		常乳	0.02～0.35
尿	1 μ g/ml			
血液	0.1-2.5 μ g/ml			
好中球	3.45 μ g/10 ⁶ cells			

物活性に関心が集まった。

札幌会議ではコメによるヒト LF の生産、トランスジェニック動物によるヒト LF の発現、ヨード標識 LF のヒトでの体内動態、LF の抗炎症作用、サイトカイン産生調節作用、抗がん作用などの基礎研究や C 型肝炎への応用、アジェニックス社の遺伝子組換えヒト LF の工業的生産技術の確立など、LF の実用化に向けての研究開発が一気に花開いた感がある。

筆者がはじめて参加した 2001 年、カナダでの第 5 回会議の最大のトピックスは、ヒト小腸から LF リセプターがはじめてクローニングされたことであった。リセプターの組織分布を調べたところ、小腸だけでなく、精巣、卵巣、骨格筋、副腎、すい臓、肝臓、唾液腺、乳腺、甲状腺、などほぼ全身で発現しており、更には胸腺、脾臓、リンパ節などの免疫担当組織や、役割は不明であるが心臓や脳などにも存在することが明らかになった。このように広範な部位にリセプターが発現していることは、LF が体内で様々な生理現象をコントロールしている多機能性生理活性タンパク質であることを強く示唆するものであり、今後の生理機能及びその作用機作の解明が待たれる。

2003 年、イタリアの第 6 回会議は、一般的に注目をひく話題に乏しく、最新の臨床状況の発表が期待されたアジェニックス社はとうとう顔を見せなかった。LF リセプターに関する研究や LF 由来の新規抗菌性ペプチドの研究なども目立った進展が見られず、LF もそろそろテーマ切れかという声も耳にされた。そういう中で鳥取大学及び NRL ファーマの研究グループからラクトフェリン腸溶錠の開発と脂質代謝改善作用、鎮痛作用という二つの新規生理作用の発見に関する発表があり、ラクトフェリン実用化研究の新たな方向性が示唆され関心を集めた²⁾。

ラクトフェリン腸溶錠の開発

昨年 10 月に日本で初めてのラクトフェリン・フォーラムが約 170 名の研究者が集まって品川で開催された。世界の LF 生産量の大半を消費する日本ならではの関心の高さであった。このフォーラムで LF がシェーグレン症候群による重症ドライアイに有効であること³⁾、中性脂肪を顕著に低下させる⁴⁾ という臨床成績が報告され、新聞でも報道された。

フォーラムの実行委員長である島崎教授は、予想を超えて医学的立場からの発表が多かったとコメントされている(日経新聞、2005.3.6)。

実は、前記二つの臨床研究で使われたのが NRL ファーマで開発された LF 腸溶錠なのである。タンパク質である LF は、特に胃内のペプシンによる消化分解を受け易いことが知られている。カナダの会議でオランダの研究グルー

プが空っぽにしたヒトの胃内での LF の半減期を調べたところ、7~8 分と計算されることを報告している。つまり経口的に摂取された LF は胃を通過する間に大部分が分解されてしまい、小腸のリセプターに届くのはごくわずかであることが分かる。

ところが、これまで実施されている LF の臨床応用に関する研究で用いられている剤形は、国内では LF 粉末を固めただけの錠菓が使われ、海外では溶液製剤や軟膏剤が用いられている。

例えば、国立がんセンターを中心にして実施されている大腸がんの二次予防に関する臨床試験、あるいは慢性 C 型肝炎に対する臨床試験はいずれも LF 錠菓を毎日 1.8~3.6 g 経口摂取するとのことである。

米国のアジェニックス社というベンチャー企業が遺伝子組換えヒト LF の臨床開発を進めているが、肺がん治療におけるシスプラチンとの併用試験では LF の溶液製剤を毎日 5~15 g 投与している。いずれの場合も経口的に摂取された LF がどの程度胃での消化分解を免れて、腸管の取り込み部位であるリセプターまで届くのかの問題であり、大部分が胃で分解されるとすれば効果が限られるのは当然のことである。

LF 研究に取り組んでいる専門家の間で、実は LF はあまり効かないのではないかという話がささやかれ始めていた矢先での前記のラクトフェリン・フォーラムにおける臨床成績の発表であったことを考えると、島崎教授のコメントの背景にある思いを感じ取ることができる。

シェーグレン症候群による重症ドライアイに有効な治療薬は今のところ存在しない。研究グループのリーダーである慶応義塾大学医学部眼科の坪田一男教授はドライアイ研究の日本の第一人者であり、腸溶性 LF の臨床応用に強い期待を寄せている。

ラクトフェリンの体内移行

日経新聞に取り上げられた二つの臨床試験で使われた LF 腸溶錠の場合は、1 日あたり 200~450mg で十分に臨床効果が認められており、腸溶性であることのメリットは明らかである。しかしながら、LF のような高分子タンパク質が本当に腸管から取り込まれて血中に移行するかどうかについては、専門家の間でも意見が分かれている。限定的とはいえ、非腸溶性の LF でも効果が認められることがあり、薬理学の常識からいえば、経口摂取した LF がヒト血中に移行することが確認される必要がある。

薬効が発揮されるのは、薬物が血液によってターゲット組織まで運ばれて作用するというのが薬理学の基本だからである。ところが国立がんセンター・化学療法部の津田洋

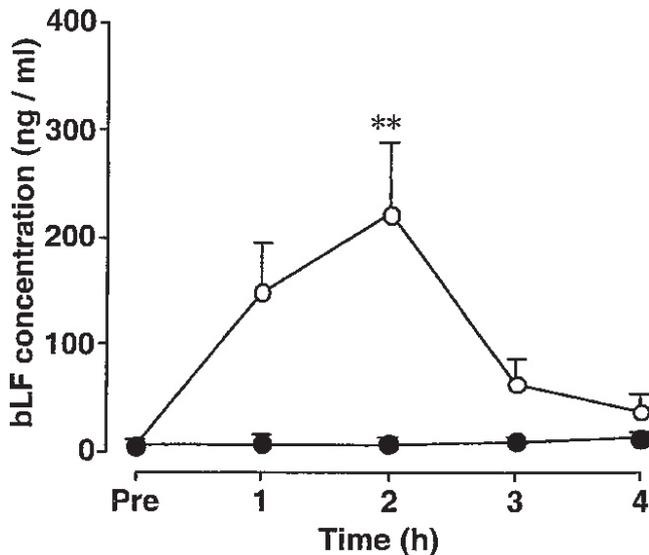


図2 ラクトフェリンの血中移行
A bLF(1g/kg) solution was infused into the rat duodenum under PB anaesthesia. Thoracic lymph was non-collected (open circle) or collected (closed circle).
[T. Takeuchi et al., Exp. Physiol. 89: 263-270 (2004)]

幸部長（当時、現名古屋市立大学医学部教授）によれば、ヒトに20 gのLF粉末を投与してもLF血中濃度は検出限界以下であったとのことである。

森永乳業を中心とする研究グループは、ラットを用いた実験で、薬物が腸管から吸収される際の主ルートである門脈血を調べ、LFが検出されないことから、LFはその

ままの形では血中に取り込まれず、LF分解物がLFの作用のかなりの部分を担っているのではないかと主張している。

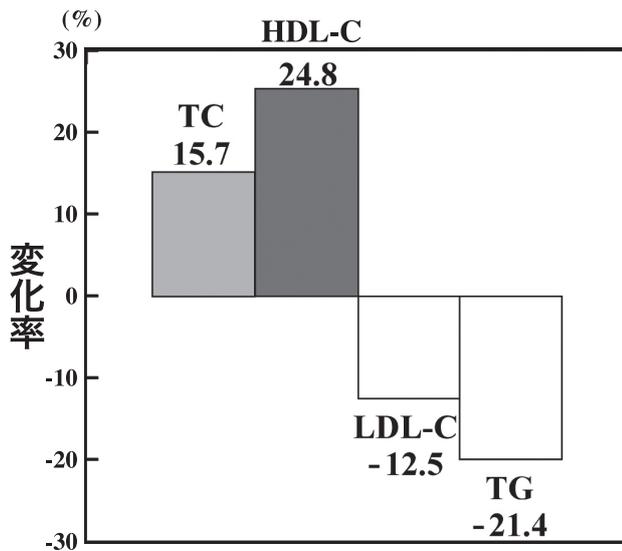
前記のラクトフェリン・フォーラムでも「ラクトフェリン体内動態とリセプター」と題するパネルディスカッションが行われて、LFの体内移行の問題が熱心に討議された。鳥取大学・原田らは、以前から乳タンパク質成分の腸管からの取込みについて研究しており、1999年にLFが腸管から取り込まれ、血中及び脳脊髄液に移行することを仔ブタを使った実験で証明している⁵⁾。

このLFの体内移行に関する食い違いの原因について、原田らは高度な動物実験技術を駆使して2004年5月の論文で科学的に結着をつけた⁶⁾。

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が検出されること、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管に取り込まれ、やがて体内循環に入って血中に移行するというを明確に証明した。最近、NRLファーマで開発したLFの腸溶性顆粒を用いてリンパ液への取り込みを調べたところ、ラットではLF粉末に比べて腸溶性顆粒は10～20倍効率よく取り込まれることが分かった（鳥取大学・竹内崇ら、未発表）。

また、原田らは1例であるがLF腸溶錠の経口摂取（LFとして0.9 g）でヒト血中にウシLFが検出されることも確認している。LF粉末の場合は、20 g摂取しても血中に検出されず、腸溶錠の場合は1例であるが、20分の1以

血漿脂質



肝臓脂質

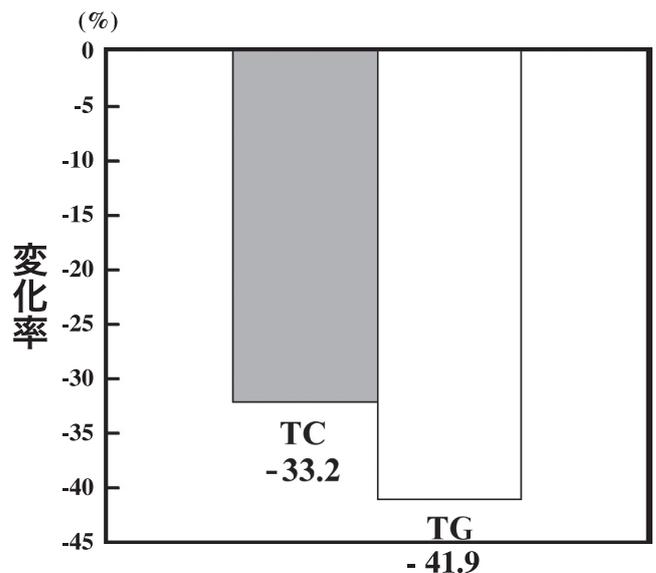


図3 ラクトフェリンによる脂質代謝改善効果
TC; 総コレステロール、HDL-C; HDL-コレステロール、LDL-C; LDL-コレステロール、TG; トリグリセリド
* ICR系マウス(♂)を4週間標準飼料で飼育(1% LF)
[T. Takeuchi et al., Br. J. Nutrition (2004), 91, 1-7]

下の0.9 gの摂取で血中に検出されることは、ヒトにおいてはLF腸溶錠が少なくとも20倍以上効率よく体内に取り込まれることを示しており、動物実験の結果ともほぼ一致している。

ラクトフェリンの新規生理作用

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、NRLファーマを中心とする研究グループによって、脂質代謝改善作用、鎮痛作用、抗不安・抗ストレス作用、抗酸化・抗老化作用など、新たな生理作用が次々と見出されている。

【脂質代謝改善作用】

原田らはNRLファーマとの共同研究により、LFを1%含有する飼料でマウスを一ヶ月間飼育した場合に、コレステロールのみならず血中及び肝臓に蓄積される中性脂肪をも低下させると同時に、血中の悪玉コレステロールLDLを低下させ、善玉コレステロールHDLを上昇させること、高脂肪食で飼育した場合には内臓周囲に貯まる脂肪がLF摂取で顕著に減ることなど、ユニークな薬理作用があることを見出した⁷⁾。

鳥取大学における最近の研究では、ラットに一定の運動負荷を与えて飼育する際に、LFを与えると体重の増加が抑制されること、内臓周囲の脂肪が減少することなどが分かってきた(竹内崇ら、未発表)。このことは、LFが運動エネルギーの消費に伴って脂肪を燃焼させていることを

示唆しており、エネルギー代謝の上流における調節機構にLFが関与している可能性を示唆している。

問題はヒトで同じように効くかどうかであるが、LF腸溶錠の経口摂取によってヒト血中コレステロール及び中性脂肪が低下するという症例報告があり、臨床的にもLFの脂質代謝改善効果が確認されている⁸⁾。

【鎮痛・抗ストレス作用】

原田らは、経口投与されたLFが脳脊髄液にも検出されることから、何らかの中枢作用がある可能性を考え、NRLファーマとの共同研究で、各種疼痛モデルでLFの鎮痛作用について広範な研究を展開した。その結果、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こと、②モルヒネと併用するとモルヒネの作用を50～100倍増強すること、③モルヒネのような薬剤耐性を示さないこと、④抗不安・抗ストレス作用があることなどを明らかにした⁹⁾。

図4はLFの鎮痛作用を明らかにした最初の実験である¹⁰⁾。この試験は、ホルマリンテストという、痛みを評価する代表的な試験法で、ラットの足にホルマリンを注射して、痛みによって足を振る回数を測定する。

Phase1(第1相)はホルマリン注射10分後までの急性期の痛みで、Phase2(第2相)はその後の後期の痛みで、がん性疼痛のモデルとされる痛みである。ラット髄腔内に投与されたLFは、いずれの相においても濃度依存性に鎮痛作用を示し、濃度によってはモルヒネ並みの鎮痛効果がある。

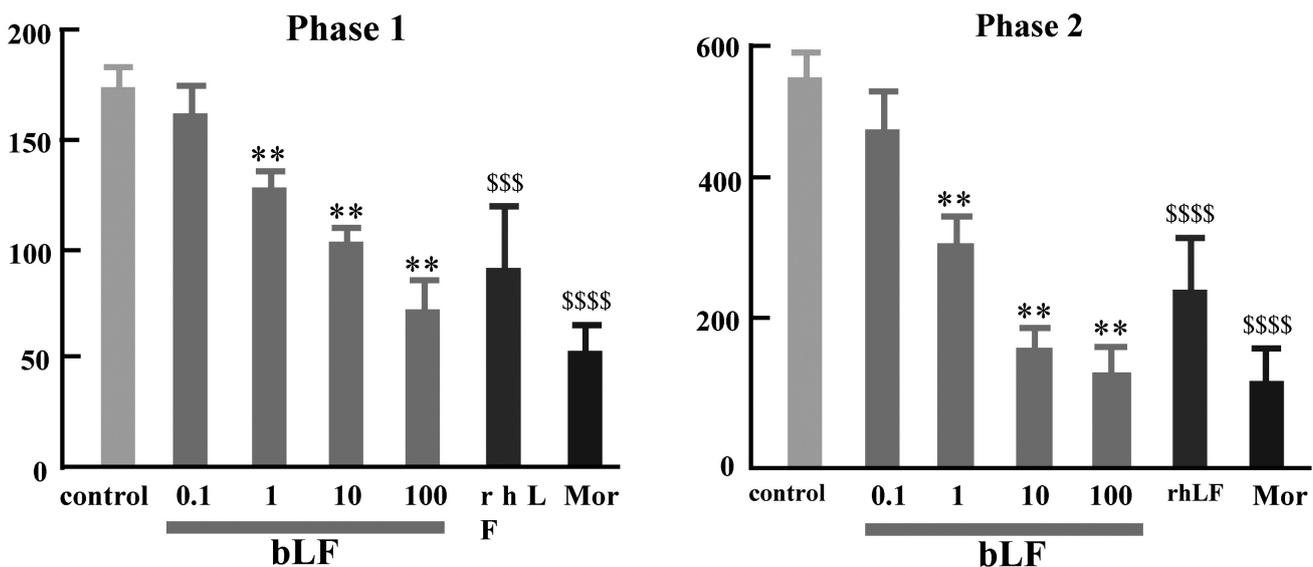


図4 ラクトフェリンの鎮痛効果

Effects of intrathecal application of bLF (0.1-100 μ g/rat), rhLF (100 μ g/rat) and Mor (10 μ g/rat) on phase 1 and phase 2 flinching responses during the formalin test.

[K. Hayashida et al., Brain Res. 965 (2003) 239-245]

rhLH（遺伝子組換えヒト型LF）も鎮痛効果を示すことから、ここで観察された鎮痛効果は牛乳由来LFに含まれる交雑物によるものではなく、LF自体の薬理作用であることが分かる。データは示さないが、その後の研究により、LFの鎮痛作用は、NO産生の増強により μ -オピオイドのシグナルを増強することに基づくこと、オピオイド受容体に結合しないのでモルヒネのような薬剤耐性を示さないこと¹¹⁾、乳飲みラットの母仔分離ストレスによる仔ラットの不安行動をLFが抑えること、このストレスや不安が痛みと同様 μ -オピオイド関与であること¹²⁾、LFの鎮痛・抗不安作用は経口投与によっても効果があること、などが明らかにされている。

我が国の死亡原因の1位はがんであり、抗がん剤の使用による免疫力の低下に伴う日和見感染の防止、末期の激しいがん性疼痛の緩和、精神的な不安を和らげるなど、LF腸溶錠はがんのターミナルケアにおけるQOLの向上に理想的な物質であり、科学的なエビデンスのあるサプリメントとしてがん医療の分野で普及することが期待される。

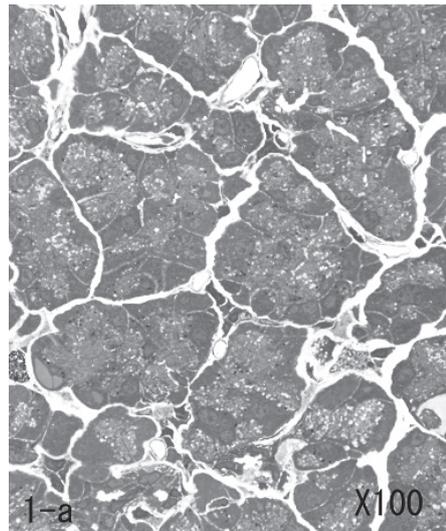
【アンチエイジングとラクトフェリン】

最近、生活習慣病の多くが活性酸素やそれに由来するフリーラジカル・過酸化脂質などによる酸化ストレスが発症の要因になっていることが指摘されている。

生きるためには酸素が必要であり、赤血球による酸素の運搬や体内の酸化還元反応などの重要な機能はヘム鉄に依存している。酸素と鉄は生命活動に必須であると同時に、われわれは常に酸素の活性化に伴う酸化ストレスにさらされながら加齢、老化の道を辿る宿命にあると言える。

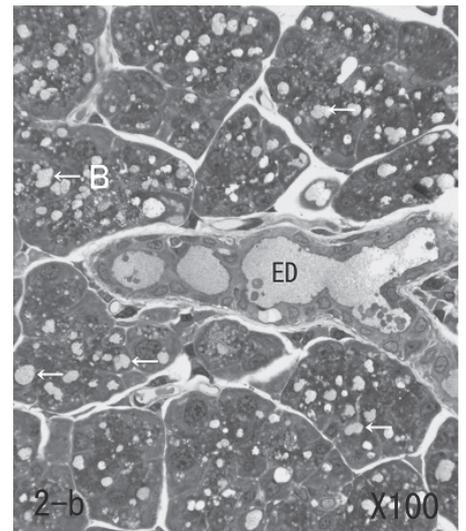
米国では早くから鉄をはじめとする重金属イオンによる健康への悪影響が注目され、若返りのためのキレーション療法、抗酸化性サプリメントの摂取が流行っている。ところが米国における複数の大規模な二重盲検臨床試験によって、必ずしも抗酸化物質の摂取が健康に良いという証拠は得られないということが最近明らかになってきた。

例えば、最も重要な感覚器官である眼は薄い膜で覆われ常時空気に曝されているため、酸化ストレスを受け易い部位であり、加齢黄斑変性症（AMD）という病気が米国で



対照老齢ラット涙腺の光学顕微鏡像 (1-a; 100倍)

細胞内はほとんど小顆粒(A)のみで占められている。



ラクトフェリン摂取老齢ラット涙腺の光学顕微鏡像(2-b; 100倍)

細胞内には小顆粒(A)、大顆粒(B)が認められる。導管(ED)内にも大顆粒(B)の内容物と同様の染色性を示す構造物が認められる。

図5 ラクトフェリンによる涙腺細胞の若返り効果

は社会問題となっている。

2005年度で軽症の患者は約1600万人、重症者は約200万人いると推定され、中途失明の原因になっている。55才から80才の健常者1193名に対してビタミンEの摂取がAMD発症の予防に有効かどうかを調べた臨床試験で、初期AMDの発症率が摂取群8.6%、プラセボ群8.1%であり、後期AMDの発症率はそれぞれ0.8%、0.6%であった。

ビタミンEサプリメントの摂取はAMDの発症及び進行を抑える効果はないというのが医学的な結論である¹³⁾。最近、効果がないばかりか、頭頸部がんの治療後の再発防止にかえって逆効果であったという衝撃的な報告が現れて論議を呼んでいる¹⁴⁾。

LFは3価の鉄イオンを強くキレート結合する性質があり、鉄イオンが触媒するヒドロキシラジカルの生成を抑える作用があり、アンチエイジング、若返り作用が期待できる全く安全なサプリメントである。

LFによる細胞の若返り効果について、最近、東京医科歯科大学医歯学総合研究科顎顔面解剖学分野の山下靖雄教授は驚くべき新事実を明らかにした¹⁵⁾。

2年齢を超えるメスの老齢ラットを2群に分け、一方を対照群とし、他方に粉末LFを2%添加した飼料を与え4週間飼育した。ラットの寿命は約2年半なので2年を超えたラットは人間で言えばかなりの高齢者になる。これに対して、生後10週齢のメスのラットを若齢対照群として、各群の涙腺細胞の様子を解剖学的に観察した。その結果、若齢群の涙腺細胞には小型のA顆粒のほかに中型のB顆粒

が多数認められ、活発に涙の成分を生合成していたが、高齢群では小型顆粒しか存在せず、涙の成分を合成する機能が著しく低下していることが示唆された。一方、高齢ラットにLFを投与した群は若齢ラットと同じようにA顆粒だけでなく多数のB顆粒が出現しており、若齢群と同じように涙液成分を送り出す導管構造も認められた。

最近、LFが重金属による酸化ストレスを抑制することがLECラットを用いる実験で明らかになった。LECラットというのは遺伝的に銅の排泄機能に異常があり肝臓に銅が蓄積するため、それに起因する酸化ストレスで劇症肝炎を起こして死んでしまうモデル動物であるが、LFの経口摂取で死亡率が大幅に低下することが分かった(慈恵医大・坪田昭人、未発表)。

実験は現在も継続しているが、このことは、LFに強い抗酸化ストレス作用があることを示唆しており、究極のアンチエイジング剤となる可能性を示すものである。

今後の展開

LFの実用化研究は1980年代はじめから本格化した、ラクトフェリン国際会議のトピックスの流れでも述べたように、LFは本当に効くのか、多機能性を説明できる作用メカニズムは何か、LFの体内動態はどうなっているのか、本当に体内に取り込まれるのか、脳や心臓にあるLFリセプターはLFのどういう機能を担っているのか、ペプシン分解物の作用はLFの作用を代替し得るのかなど、山積する疑問の前に、かえって混乱を増している感があった。

そういう状況の中から、2001年からはじまったこの数年間のNRLファーマと鳥取大学をはじめとする各大学とのLFの基礎、応用、臨床研究の成果によって、タンパク質医薬品の開発ブームに取り残された生理活性タンパク質、ラクトフェリンの限りないポテンシャルが明らかになりつつあり、LF実用化研究が新しい局面を迎えようとしている。

NRLファーマの創業の目的は、アスコクロリンという微生物代謝産物をベースにした生活習慣病治療薬の開発であるが、運転資金を確保するために取り組んできたラクトフェリン実用化研究の過程で、ラクトフェリンが究極のアンチエイジング物質として活力ある高齢化社会を担う健康サプリメントである可能性が拓けてきた。

今後は、健康サプリメントとしての腸溶性ラクトフェリン事業に取り組む一方、サプリメント用途とは差別化されたラクトフェリン素材で、シェーグレン症候群をはじめとする適切な治療法のない難病の治療薬シーズとしてのラクトフェリンに対する期待を是非現実のものにしたいと考えている。

(参考文献)

- 1) 島崎敬一、化学と生物 38(3),167-170 (2000)
- 2) Shimizu, H., BioMetals 17: 343-347 (2004)
- 3) 佐伯めぐみ他、第13回日本シェーグレン症候群研究会 (2004.9, 佐賀)
- 4) 木元博史、ミルクサイエンス 53(4), 313-314 (2004)
- 5) Harada, E., et al., Biol Neonate 76: 33-43 (1999)
- 6) Takeuchi, T., et al., Exp Physiol 89: 263-270 (2004)
- 7) Takeuchi, T., et al., Br J Nutrition 91:533-538 (2004)
- 8) 木元博史、Prog Med 23(5), 1519-1523 (2003)
- 9) 原田悦守、慢性疼痛 23(1), 9-23 (2004)
- 10) Hayashida, K., et al., Brain Res 965, 239-245 (2003)
- 11) Hayashida, K., et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285: R306-R312 (2003)
- 12) Takeuchi, T., et al., Brain Res 979: 216-224 (2003)
- 13) Taylor, H.R., et al., BMJ 325(7354): 11 (2002)
- 14) Bairati, I., et al., J Natl Cancer Inst 97(7): 481-488 (2005)
- 15) 山下靖雄、伊藤圭子、第110回日本解剖学会総会 (2005.3, 富山)

プロフィール 

清水洋彦 (しみず ひろひこ)



技術士(生物工学)
清水技術士事務所

現職：株式会社NRLファーマ 特別顧問
独立行政法人 科学技術振興機構
知的財産委員会・第一専門委員会 主査
よこはまティーエルオー株式会社
技術移転スペシャリスト
有限会社 ビオスジャパン 技術顧問

学歴：東京大学農学部農芸化学科(発酵学)卒

職歴及び活動：

東レ株式会社でインターフェロン他のバイオ医薬品の研究開発に従事し、東レリサーチセンター株式会社取締役を経て、定年退職後、清水技術士事務所を設立。

NRLファーマで腸溶性ラクトフェリンの開発、事業化や生活習慣病治療薬開発(NEDO助成事業)に携わる一方、大学発シーズの技術移転、特許化支援活動に従事。(有)ビオスジャパンを設立して、腸溶性ラクトフェリンの普及、ペット用途への展開に取り組んでいる。