

体内移行ラクトフェリンの新規作用の 発見とその応用性

抗不安・鎮痛、関節炎の軽減、脂質代謝改善、血圧低下効果

ラクトフェリン 2007

原田悦守^{*1, 2)}, 竹内 崇^{*3)}

Application and novel functions of lactoferrin transported into blood and cerebrospinal fluid

筆者らは、ラクトフェリン(LF)は腸上皮細胞からリンパ系を介して血液中に移行し、さらに脳脊髄液内にもリセプター介在性トランスサイトーシスによって輸送されることを明らかにした。体内に取り込まれたLFのまったく新規な作用として、① 新生子における母子分離ストレスを改善でき、この抗不安効果は成動物でも確認された。② LFは各種の疼痛反応を改善できること、③ その機序としてはNO産生を介して内因性オピオイドの作用を増強すること、さらに④ モルヒネの鎮痛効果を数10倍に増強させ、かつ⑤ 連用による耐性を起こしにくいこと、および⑥ LFはリウマチ性関節炎モデルの疼痛と炎症を改善できることを明らかにした。加えて⑦ コレステロール低下とトリグリセライドの上昇を伴う脂質代謝改善効果、および⑧ 血管平滑筋の弛緩による血圧降下作用が明らかとなった。

LFはメタボリックシンドローム、生活習慣病の予防・改善などに貢献できる機能性食品素材として、強いては医薬品としての開発も期待される。

*Etsumori Harada^{*1, 2)}, Takashi Takeuchi^{*3)}*

Key words : 初乳由来多幸感物質, 抗不安・鎮痛作用, 関節炎改善効果,
血圧降下作用, 脂質代謝改善効果

ミルクとはなにか。母親から子に授けられる総合的栄養飲物には多様な生理活性物質が含まれており、これら物質が体内へ取り込まれて機能しているのではないか。母親の胸に抱かれて、乳頭を口いっぱい吸い付き、このうえない幸福感に満

たされた笑みを見るに付け、“これは母乳に含まれる多幸感誘起物質によって精神的にも満たされているのではないか”との仮説をもって研究を進めた。

その結果、初乳に含まれる高分子蛋白質が腸上皮細胞からエンドサイトーシスによって取り込まれ、リンパ系を介して血液中に輸送されることがわかった¹⁾。さらに、ある種の蛋白質は脈絡叢を介して脳脊髄液内へも移行することが明らかとなった^{2~4)}。これら高分子蛋白質の体内輸送系は新

^{*1)} Emeritus Professor, Tottori University 鳥取大学(名誉教授)

^{*2)} Visiting Professor, Rakuno Gakuen University 酪農学園大学(客員教授)

^{*3)} Department of Veterinary Medicine, Tottori University 鳥取大学農学部獣医臨床検査学

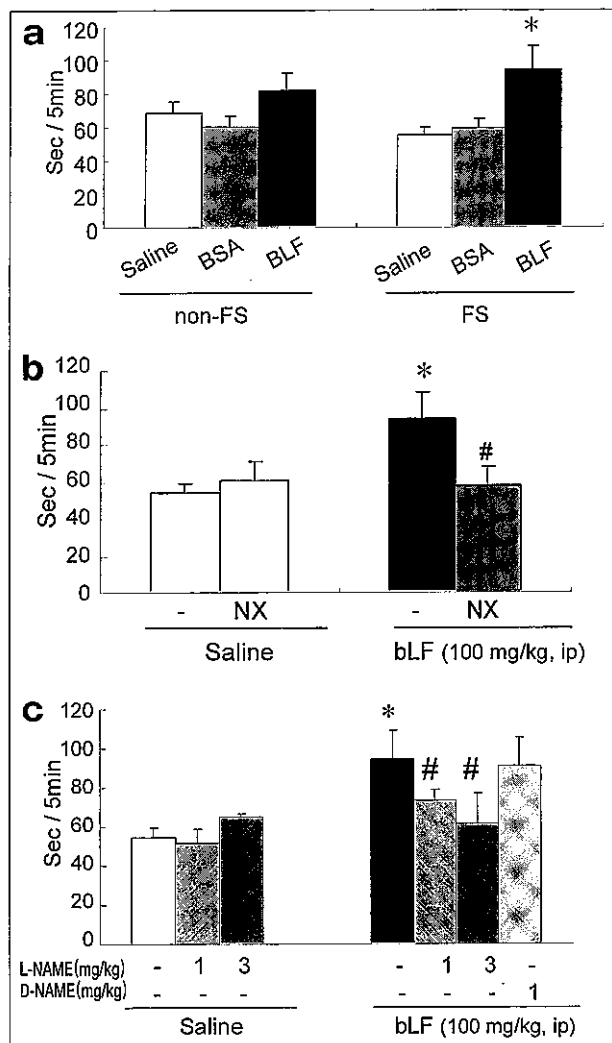


図1 Footshock負荷後のプラスメイズテストにおけるラクトフェリンの効果

LFを投与後、四肢へ電気ショックを与えてプラスメイズテストを行うと、オープンアーム滞在時間が延長された(a)。このLFの効果はナロキソン(NX)で阻害され(b)、また、L-NAMEによっても抑制された(c)。

* $P < 0.05$ vs saline. * $P < 0.05$ vs bLF alone
(Kamemori N et al., 2004)¹²⁾

生子のごく限られた時期に認められるが、ある時期を過ぎるとバリアーが形成される(gut closure)⁹⁾。

しかしながら、ミルク蛋白のなかでもラクトフェリン(LF)は新生子のみならず、成動物でもリンパ系を介して体内へ輸送できる系があることを見いだした⁶⁻⁹⁾。さらに血液中のLFは、脈絡叢の上皮細胞膜のLF受容体を介してトランスサイトシスされて脳脊髄液に輸送され、脳各部の軟膜を介して脳実質へ移行することが示唆された¹⁰⁾。

初乳に豊富に含まれるLFの体内移行動態から

体内へ輸送されたLFの生理作用について、筆者らが発見した新規作用を中心に解説する。

抗不安・抗ストレス作用

脳内へ移行したLFはどのような生理作用を持っているのだろうか。研究当初からの仮説“母乳にはなにか多幸福誘発物質があるのではないか”。あるとすれば、特に母親が常に哺育してくれるとはかぎらない野生動物では、母乳のLFが子のストレスを軽減しているかもしれないと考えた¹¹⁾。ラットの赤ちゃん1匹を母親や兄弟から離してしまうと、その赤ちゃんは超音波を発信して親を探す不安行動を示す。しかし、前もってLFを投与しておくと、この不安行動は明らかに抑制され、かつストレスホルモンである副腎皮質ホルモンの分泌も有意に抑制された。したがって、母親が留守のときに赤ちゃんが不安を感じて異常行動をとらないよう、ミルク中のLFが赤ちゃんの精神状態を制御しているものと推測された。このようなLFの抗ストレス作用は、成熟ラットにおける実験(LFによる不安軽減効果)においても実証された(図1)¹²⁾。

それでは、LFはどのような機序で抗不安作用を示すのであろうか。LFのこの抗不安作用はオピオイド受容体拮抗薬naloxon(NX)、および μ -オピオイド受容体拮抗薬CTOPの投与によってほぼ完全に抑制された。しかしながら、LFは神経細胞膜上のオピオイド受容体には結合しないことが確認されたことから¹³⁾、この抗不安効果はLFのオピオイド受容体への結合を介した効果とは考えられない。

そこでニューロン活動にも作用が注目される一酸化窒素(NO)の関与を調べた。このLF効果は、NOシンターゼ(NOS)阻害薬であるL-NAMEの投与によって劇的に抑制された。したがって、LFは μ -オピオイド受容体を介した制御系において、NOSを活性化させてNO産生を増強させることによって抗不安効果を発現することが明らかとなった。

鎮痛作用

中枢神経系に輸送されたLFがオピオイド系を活性化するのであれば、疼痛を抑制する作用も期待される。

そこで、いくつかの疼痛モデル動物を用いて実験を進めたところ、LFにはモルヒネに匹敵する鎮痛効果があることを発見した¹³⁾。ラットの足掌部皮下にホルマリンを微量投与し、動物がその足を振る回数を指標とするホルマリンテストによる痛み反応は、LFの前投与によって劇的に抑制(40~70%)された。この抑制効果は、ウシLFのみならず、ヒト・リコンビナントLF(rhLF)でも認められたことから、LFは種を越えて鎮痛効果を持つことが明らかとなった¹³⁾。

このような化学物質による痛み刺激のみならず、熱刺激による痛み(ホットプレートテスト、テイルフリックテスト)、内臓痛のモデルとして、PGE₂がメディエーターとして知られる酢酸ライジングテストにおいても、LFは顕著な鎮痛作用を示した。

1. LF鎮痛効果の特徴

モルヒネは連用すると薬物耐性が起こり、薬の用量を徐々に上げないと十分な鎮痛効果が得られなくなる。しかしながら、LFの作用はやや遅れて発現するが、数日にわたって持続的な鎮痛効果を示し、薬物耐性を起こしにくい¹⁴⁾。また、モルヒネの単独反復投与によって形成される薬物耐性は、LFを添加して反復投与することにより耐性獲得を遅らせることが出来る¹⁵⁾。さらに、鎮痛効果を発現できない極微量のLFをモルヒネに添加することによって、モルヒネの鎮痛作用は50~100倍も増強されることが明らかとなった^{14, 15)}。

2. 鎮痛作用機序

LFはどのような機序で鎮痛作用を示すのであろうか。痛覚制御機構としては痛みを受容する一次知覚神経の末梢レベルと、二次ニューロンの興奮を伝達する脊髄後角レベル、および痛みを認知する延髄から大脳皮質に至る上位中枢レベルが考

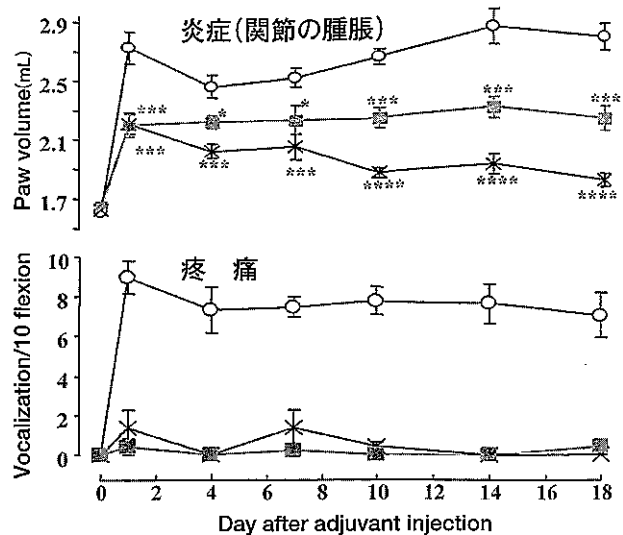


図2 リウマチ性関節炎モデル動物におけるラクトフェリンの腫脹と疼痛緩和作用

LFを経日的に反復経口投与することによって、ラットにおけるアジュバント性関節炎の腫脹(上段)と疼痛(下段)は劇的に改善された。

○ saline. ■ bLF. × dexamethasone

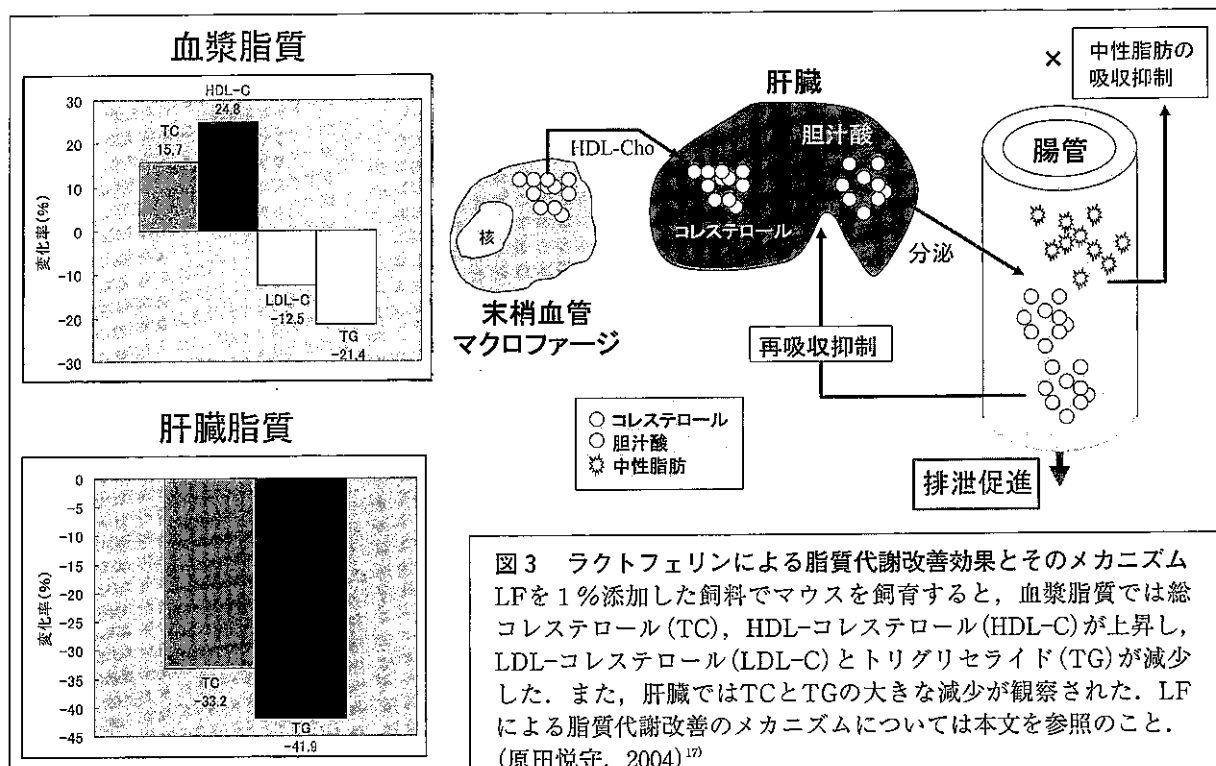
* $P < 0.05$. ** $P < 0.001$. *** $P < 0.0001$ vs saline

(原田悦守, 2004)¹⁶⁾

えられる^{16, 17)}。

腰髄レベルにおけるLFの効果を調べるために、大槽から腰髄部にカニューレを挿入したラットを用いてホルマリンテストによる解析を進めた¹⁴⁾。ホルマリン刺激による疼痛は、極微量(0.1 μ g/ラット)の腰髄部へのLF投与によって抑制された。この鎮痛作用は、オピオイド受容体拮抗薬NXおよび μ -オピオイド受容体拮抗薬CTOPの投与によってほぼ完全に抑制された。しかしながら、LFは神経細胞膜上のオピオイド受容体には結合しないことが確認されたことから¹¹⁾、この鎮痛効果はLFのオピオイド受容体への結合を介した効果とは考えられない。

そこで、ニューロン活動にも作用が注目されるNOの関与を調べた¹⁴⁾。LFの鎮痛効果は、NOS阻害薬であるL-NAMEの投与によって劇的に抑制された。したがって、LFは疼痛刺激に対する μ -オピオイド受容体を介した制御系において、NOSを活性化させてNO産生を増強させることによって鎮痛効果を発現することが明らかとなった。また、LFには末梢性鎮痛効果も認められ、この効果はNXおよびL-NAMEの投与で消失する



ことから、末梢組織のマクロファージからのNO産生を増強させ、内因性オピオイドの制御系を賦活させて鎮痛効果を発揮することが示唆された¹⁸⁾。

リウマチ性関節炎の改善効果

ラットを用いてアジュバントの投与3時間前からLFの経口投与を開始し、アジュバント性関節炎を発症させて関節の腫脹と疼痛を経日的に観察した。アジュバント投与により対照群に認められた関節の腫脹(1.8倍)は、LFの反復経口投与によってデキサメタゾン投与効果の約50%に抑制された。関節痛はさらに劇的に抑制され、デキサメタゾン効果の約90%に相当する鎮痛効果を示した(図2)¹⁹⁾。また、アジュバント性関節炎発症19日目からLFを投与すると、関節の腫脹は7日後には有意に抑制され、その痛みは当日から90%に相当する抑制効果が得られた。

このLFによる抗炎症・鎮痛効果は、悪玉サイトカインであるTNF α の産生を抑制し、善玉サイトカインIL-10の産生を増加させて発揮されることが実証された。

血圧降下作用

LFの抗不安・鎮痛作用が、NO合成酵素を活性化することによるNO産生の促進によることから、NOを介した血管拡張作用がLFにもあるのではないかと考えて実験を進めた²⁰⁾。ラットを用いてLFを静脈内に投与すると、血圧は30%ほど低下した。

このLFによる血圧低下作用は、摘出血管リング標本の張力測定によってLFが直接、血管標本を拡張させることに起因することがわかった。さらにこの拡張作用は、L-NAMEによって抑制されることから、LFはNOSの活性化によってNO産生を増大させて血管平滑筋が拡張し、血圧が低下することが明らかとなった。

脂質代謝の改善効果

LFを1%添加した飼料でマウスを4週間飼育すると、肝臓の脂質含量は対照群とくらべて中性脂肪が42%、総コレステロールが33%減少した²¹⁾。また、血漿のHDLコレステロールは25%増加し、中性脂肪は22%減少していた。一方、胆汁

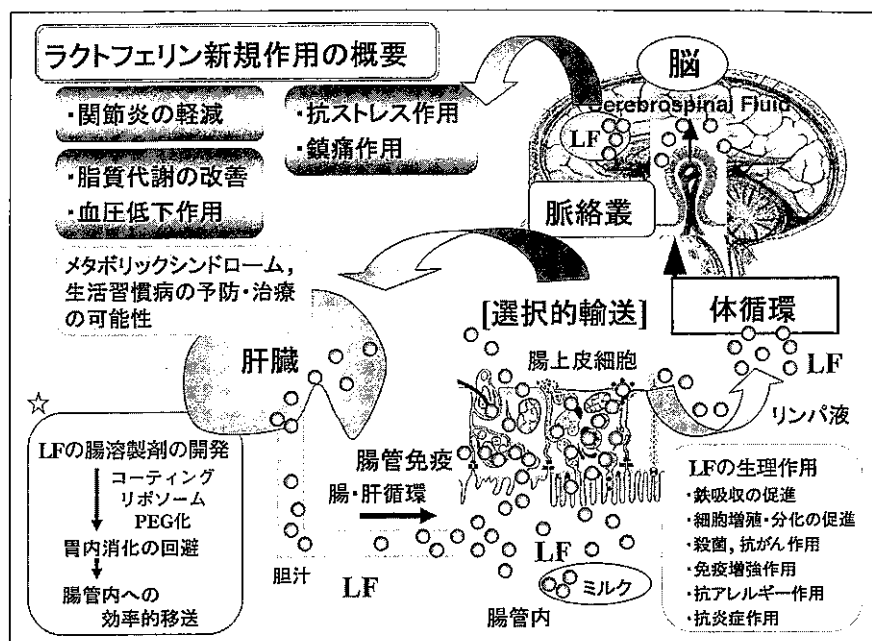


図 4

ラクトフェリン新規作用の概要
腸管腔内のLFは腸上皮細胞の受容体を介してトランスサイトosisされて粘膜固有層に運ばれてリンパ液を介して血液中へ輸送される。そのLFは腸・肝循環をする。さらにLFは脈絡叢の受容体を介して脳内に輸送される。脳内では抗ストレス、鎮痛作用など、新規機能を発揮する。既知の生理作用ならびに腸溶剤の必要性を示した。

中の胆汁酸濃度はLF投与によって変化しなかったが、糞便中への胆汁酸の排泄が増加していた。

したがって、LFは胆汁酸との結合によって胆汁酸の再吸収を妨げ、かつ胆汁酸排泄を亢進させ、その結果、肝臓ではコレステロールからの胆汁酸合成が促進される。その素材としてのコレステロールは、末梢組織に貯蔵されていたコレステロールを高密度リポ蛋白質(HDL)に取り込み、肝臓へ輸送される。このような機序によって、LFはコレステロールの排泄系を促進し、脂質代謝を改善することが示唆された(図3)。

展 望

従来からのLFの多様な機能に加えて、筆者らは、LFが腸管の上皮細胞からエンドサイトーシスによって取り込まれ、リンパ管を介して血液内へ輸送され、さらに脈絡叢を介して脳内へも輸送され、抗不安・鎮痛作用、関節炎の軽減、脂質代謝改善、血圧低下効果を示すことを明らかにした(図4)。

2005年、ハワイで開催された国際LF会議では、LFの新たな作用として骨の成長、歯周病、ドライマウス、シェーグレン症候群におけるドライアイなどの改善効果が報告され、国際的にも活発に

研究が進められている。高分子蛋白質のLFを服用したとき、いかに胃消化を少なくし、効率よく腸まで届けることが出来るか、腸溶剤の開発も進められている²²⁾。

ミルク由来で安心して利用でき、すぐれた機能を持つLFは、ストレス過多・高齢化社会においてきわめて重要な課題とされている代謝リックシンドローム、生活習慣病の予防・改善にも貢献できる機能性食品素材として、強いては医薬品としての可能性を秘めており、これら観点からの発展が期待される。

文 献

- 1) Harada E, Itoh Y, Sitizyo K, Takeuchi T, Araki Y et al.: Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets. *Comp Biochem Physiol* 124A: 321-327, 1999.
- 2) Harada E, Sugiyama A, Takeuchi T, Sitizyo K, Syuto B et al.: Characteristic transfer of colostral components into cerebrospinal fluid via serum in neonatal pigs. *Biol Neonate* 76: 33-43, 1999.
- 3) Harada E, Araki Y, Furumura E, Takeuchi T, Sitizyo K et al.: Characteristic transfer of colostrum derived biologically active substances into cerebrospinal fluid via blood in natural suckling neonatal pigs. *J Vet Med A* 49: 358-364, 2002.
- 4) Talukder MJR, Takeuchi T and Harada E: Characteristic transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *J Dairy Sci* 85: 514-524, 2002.
- 5) 原田悦守: 新生仔腸管における高分子物質の取込みと

- gut closure. 医学のあゆみ 198 : 959-964, 2001.
- 6) Talukder MJR, Takeuchi T, Harada E : Receptor-mediated transport of lactoferrin into the cerebrospinal fluid via plasma in young calves. *J Vet Med Sci* 65 : 957-964, 2003.
 - 7) Talukder MJR, Takeuchi T, Harada E : Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches. *J Vet Med A* 50 : 123-131, 2003.
 - 8) Kitagawa H, Yoshizawa Y, Yokoyama T, Takeuchi T, Talukder MJR et al. : Persorption of bovine lactoferrin from the intestinal lumen into the systemic circulation via the portal vein and the mesenteric lymphatics in growing pigs. *J Vet Med Sci* 65 : 567-572, 2003.
 - 9) Takeuchi T, Kitagawa H, Harada E : Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp Physiol* 89(3) : 263-270, 2004.
 - 10) 原田悦守, 竹内 崇, 北川 浩, 橋本善春 : ラクトフェリンの体内移行動態 : 特にリンパ系を介した腸管からの取り込みについて. *ミルクサイエンス* 53 : 328-333, 2004.
 - 11) Takeuchi T, Hayashida K, Inagaki H, Kuwahara M, Tsubone H 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.
 - 12) Kamemori N, Takeuchi T, Hayashida K, Harada E : Suppressive effects of milk-derived lactoferrin on the psychological stress in adult rats. *Brain Res* 1029 : 34-40, 2004.
 - 13) Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E : Novel central function of milk-derived lactoferrin on antinociception mediated by μ -opioid receptor in the rat spinal cord. *Brain Res* 965 : 239-245, 2003.
 - 14) Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E : Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *Am J Physiol* 285 : R306-R312, 2003.
 - 15) Tsuchiya T, Takeuchi T, Harada E : Milk-derived lactoferrin possibly block tolerance to morphine analgesia via nNOS activation in mice. *Brain Res* 1068 : 102-108, 2006.
 - 16) 原田悦守 : ミルク由来ラクトフェリンの体内移行動態とその新規作用. —抗ストレス, 鎮痛, 抗炎症作用—. *慢性疼痛* 23 : 9-23, 2004.
 - 17) 原田悦守 : ミルクに含まれるラクトフェリンの脳内移行とその新規作用. *ペインクリニック* 26 : 359-368, 2004.
 - 18) Hayashida K, Takeuchi T, Harada E : Lactoferrin enhances peripheral opioid-mediated antinociception via nitric oxide in rats. *Eur J Pharmacol* 484 : 175-181, 2004.
 - 19) Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E : Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci* 66 : 149-154, 2004.
 - 20) Hayashida K, Takeuchi T, Ozaki T, Shimizu H, Ando K et al. : Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats. *Am J Physiol* 286 : R359-R365, 2004.
 - 21) Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E : Bovine lactoferrin reduces plasma tri-acylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents. *Br J Nutr* 91 : 533-538, 2004.
 - 22) Takeuchi T, Jyonotsuka T, Kamemori N, Kawano G, Shimizu H et al. : Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats. *Exp Physiol* 91 : 1033-1040, 2006.