

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17354

研究課題名(和文) 抗アレルギー性ラクトフェリンサプリメントのアレルギー機序に関する研究

研究課題名(英文) Allergic mechanism of lactoferrin as an antiallergic supplement

研究代表者

長岡 憲次郎 (Nagaoka, Kenjiro)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：40752374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：【目的と方法】機能性食品として用いられるラクトフェリン(BLF)の免疫調節機能について検討を行った。雌のBALB/cマウスにAlumを用いた腹腔内投与後、抗原の経口投与を行い、その影響について測定した。

【結果と考察】BLF特異的IgG及びIgAは、Alumを用いることにより増加した。総IgAの違いは認められなかった。Alumとの共投与によって、特に腸間膜リンパ節における免疫細胞数が顕著に増加した。糞便中の細菌の割合は、Alumを用いることにより、BLF投与が顕著にBacteroidetes門の割合を低下させた。以上より、BLFは特定の条件において腸管免疫の機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安全といわれる機能性食品成分であっても、体質によって予期しない作用を示す可能性がある。近年の健康志向の高まりにより、様々な成分を由来とする機能性食品が販売されているが、その作用メカニズムを理解することにより、市販サプリメントを安全に用いることができるようになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether bovine lactoferrin (BLF), which is a functional food, affects immune modulational functions, BALB/c female mice were intraperitoneally administered with aluminum adjuvant and BLF, followed by oral administration.

BLF-specific IgG and IgA were increased in the Alum + BLF group. There was no significant difference in total IgA. Immune cells in gut associated lymphoid tissues, especially mesenteric lymph nodes, increased in the Alum + BLF group. In addition, the ratio of Bacteroidetes phylum in the fecal microbiome was significantly decreased in the Alum + BLF group. In conclusion, BLF has possibility to affect intestinal immune systems.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：機能性食品 動物実験 食物アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラクトフェリンは主に母乳、唾液、涙などの外分泌性の糖タンパク質であるが、血液や関節液にも含まれる。このタンパク質は、腸内細菌叢の改善、ウイルスや細菌感染に対する防御、抗アレルギー作用、抗炎症作用などの多くの効果が報告されており [Lönnnerdal and Iyer, Annu Rev Nutr, 1995]、サプリメントとして市販されている。

マウスにおいて、ウシラクトフェリンを経口投与することで血清及び組織中にラクトフェリンに対する免疫グロブリンの増加が認められている [Fischer et al., Int Immunopharmacol, 2007]。当研究室では、これまでにラクトフェリンを感作させたマウスにおいて、ラクトフェリンを点鼻投与することにより、アレルギー性気道炎症 (喘息様病態) の発症、血中特異的 IgG の産生及び肺組織におけるラクトフェリンの蓄積を報告している [Nagaoka et al., Physiol Rep, 2017]。

2. 研究の目的

機能性食品成分として用いられているラクトフェリンを過剰に摂取した場合等における有害可能性についての情報はほとんどない。そこで本研究では、ラクトフェリンの安全性を明らかにするため、マウス及び培養細胞にウシラクトフェリンを曝露し、ラクトフェリンのアレルギー性の可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) BALB/c 雌マウスを用い、水酸化アルミニウムアジュバント (Alum) とウシラクトフェリン (BLF) 混合物の 2 回の腹腔内投与後 (Day 0, 7)、0.2 mg BLF の経口投与を行った (Day 14, 16, 18, 21, 28) (Alum+BLF 群)。また、Alum 及び BLF の代わりに生理食塩水を用いた群を用意し (Saline, BLF 及び Alum+Saline 群)、最終投与の次の日にマウスを安楽死後、以下の測定を行った：

ELISA 法による血漿及び糞便中の total IgA, BLF 特異的 IgG 及び IgA。フローサイトメトリー法による脾臓、腸間膜リンパ節及びパイエル板における CD4, CD8 及び B220 陽性細胞数。定量的 RT-PCR による小腸上皮細胞の遺伝子発現量及び糞便中の Bacteroidetes 及び Firmicutes 門の割合。

- (2) 曝露させる BLF は、酸性条件下においてペプシンと反応後、NaOH で中和して調製した。BALB/c 雄マウスから骨髓細胞を単離し、10%牛胎児血清/50 µM 2-メルカプトエタノール/20 ng/mL 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子含有 RPMI-1640 培地で 10 日間培養を行い、樹状細胞に分化させた (BMDC)。細胞数を調整して再播種した BMDC に、PBS、ペプシンのみ、BLF (未処理) あるいはペプシン処理 BLF をそれぞれ添加して培養した。24 時間後、細胞を回収してフローサイトメトリー法による BMDC の表面抗原マーカーを評価した。

4. 研究成果

- (1) アジュバントの有無によるマウスの BLF 曝露の影響

Alum+BLF 群において、血漿中 BLF 特異的 IgG 及び IgA の増加が認められた。Alum なしの場合、BLF の投与においてほとんど特異的抗体の検出は認められなかった。また、BLF 投与は、血漿中及び糞便中の総 IgA 量に影響を与えなかった。

脾臓及び腸間膜リンパ節において、Alum+BLF 群は Saline 群と比べて CD4、CD8 及び B220 陽性細胞数の増加が認められたが、Alum なし (BLF 群) の場合では違いは認められず、Alum によって免疫応答を活性化させることにより、異なった応答が示された。

糞便中 DNA の定量的 RT-PCR を行ったところ、Bacteroidetes 門の割合が、Alum なしでは変化しなかったが、Alum を用いた場合の BLF 投与で有意に低下した [図 1]。一方で Firmicutes 門では Alum の有無で BLF 投与による変化は認められなかった。

小腸上皮細胞における遺伝子発現量の変化を定量的 RT-PCR により調べたところ、Tslp 及び Tnf 遺伝子が Alum ありの場合の BLF 投与で発現低下が認められた。

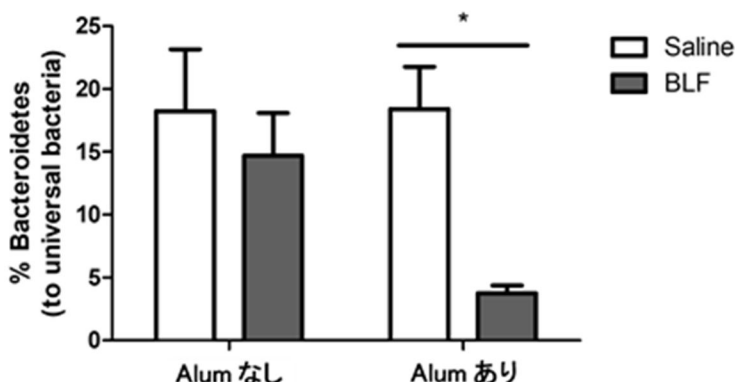


図 1 BLF 投与による糞便中 Bacteroidetes 門の割合の変化

(2) ペプシン処理による BLF の BMDC 活性化評価

BMDC の CD80 陽性細胞割合は、BLF 曝露は PBS に比べて増加した。さらに、ペプシンで処理した BLF の場合、ペプシン未処理の BLF よりも陽性細胞割合がより大きくなり、ペプシンで処理することにより BLF は BMDC をより活性化させることが示された。一方、ペプシン単独では CD80 陽性細胞割合は変化しなかった。

ラクトフェリンの摂取により特異的抗体が産生される条件では、腸内細菌叢が変化し、腸上皮組織や腸関連リンパ組織等に影響を及ぼす可能性が示された。近年では健康意識の向上により、様々な機能性食品が販売されている。中には天然を由来とすることから安全であると考えられているが、中には継続して摂取することによる影響がはっきりしないものもある。今後、さらに長期で投与を継続した場合の影響を調べていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagaoka K, Ogino K, Ogino N, Ito T, Takemoto K, Ogino S, Seki Y, Hamada H, Fujikura Y	4. 巻 34
2. 論文標題 Human albumin augmented airway inflammation induced by PM2.5 in NC/Nga mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environ Toxicol	6. 最初と最後の頁 836-843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tox.22751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito T, Ogino K, Nagaoka K, Takemoto K, Nishiyama R, Shimizu Y	4. 巻 143
2. 論文標題 Detection of 3-Nitrotyrosine in Atmospheric Environments via a High-performance Liquid Chromatography-electrochemical Detector System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JoVE	6. 最初と最後の頁 e58371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/58371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花北大輔、長岡憲次郎、伊藤達男、荻野景規、神田秀幸
2. 発表標題 ラクトフェリンによる樹状細胞の活性化及び免疫制御機能についての検討
3. 学会等名 第26回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野景規、長岡憲次郎、伊藤達男、松浦有希
2. 発表標題 PM2.5のタンパク質を介した生体影響
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィ－シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野景規、長岡憲次郎、荻野学芳、松浦有希、伊藤達男
2. 発表標題 アルギナーゼI上昇は、L-arginineを消費し、NO産生を抑制し、糖尿病の発症に関連する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡憲次郎、荻野学芳、竹本圭、伊藤達男、笹岡香織、荻野景規
2. 発表標題 PM2.5 曝露による気道上皮細胞の粘液発現
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡憲次郎、武田禎平、谷田万里、田邊知孝、荻野景規、舟橋達也
2. 発表標題 ラクトフェリンの免疫調節作用におけるタンパク質消化の影響
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	荻野 景規 (Ogino Keiki) (70204104)	高知大学・医学部・特任教授 (16401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 達男 (Ito Tatsuo) (80789123)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関