

平成23年 5月 16 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592607

研究課題名(和文) 乳中ラクトフェリンの経口投与によるサイトメガロウイルス感染防御

研究課題名(英文) Inhibitory effect of lactoferrin oral administration on infection with mouse cytomegarovirus.

研究代表者

志水 恵子 (SHIMIZU KEIKO)

東海大学・健康科学部・教授

研究者番号：20056302

研究成果の概要(和文)：

ラクトフェリンは乳中に含まれる鉄結合タンパク質であり、様々な生物活性を有する。筆者らはマウスにおいて、ラクトフェリンの腹腔内投与によるサイトメガロウイルス腹腔内感染に対する顕著な防御効果を認めている。本研究では、ラクトフェリンの経口投与によるサイトメガロウイルスの感染防御効果を検討し、サイトメガロウイルスの経口感染経路において防御効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：

Lactoferrin is an iron-binding protein and has been demonstrated in milk, and has been reported to have a variety of biological functions. Lactoferrin injected intraperitoneally(ip) has exhibited the inhibitory effect on mouse cytomegarovirus ip infection in mice. In the present study, lactoferrin by oral administration exhibited inhibitory effect on oral infection with mouse cytomegalovirus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・生涯発達看護論

キーワード：ラクトフェリン、サイトメガロウイルス、感染防御

1. 研究開始当初の背景

ラクトフェリンは分子量約8万の鉄結合性糖タンパク質である。多くの哺乳動物の乳汁、涙、唾液、胆汁、腓液、精液などの外分泌液中に含まれる。最も多く含まれるのは乳汁中であり、特に、分娩後1~3日の初乳には4mg/mlと永久乳の4倍ものラクトフェリンが含まれている。

ラクトフェリンは様々な生物活性を有し、主な活性としては抗微生物活性、鉄吸収調節作用、抗酸化作用、細胞増殖作用などがある。

抗微生物活性としては、その多くは細菌に対する抗菌活性であるが、ウイルスについてもC型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルスなどに抗ウイルス効果が認められている。しかし、その報告の多くは*in vitro*条件におけるものである。

筆者らはウシ乳汁由来ラクトフェリン、およびヒト乳汁由来ラクトフェリンを用いて、マウスにおけるサイトメガロウイルス感染防御について検討し、顕著な防御効果を認め

た。その防御機序は T 細胞を介したナチュラルキラー細胞活性の上昇によるものであった。また、ヒトラクトフェリンにおけるマウスサイトメガロウイルス感染防御効果を示すペプチドの最小アミノ酸残基は N4-17 と推測され、抗菌効果を示す部分とは全く異なっていることを報告している。

2. 研究の目的

これまでのマウスにおけるラクトフェリンによるサイトメガロウイルス感染防御効果は、ラクトフェリンをマウス腹腔内に投与することによって認められた。ラクトフェリンは乳汁中に最も多く含まれていることから、経口投与によってウイルスの防御効果が認められることが望ましい。

そこで、マウスを用いて、ラクトフェリン経口投与におけるマウスサイトメガロウイルス感染防御効果とその機序について検討した。

3. 研究の方法

(1) 材料

- ①ウシラクトフェリン (LF) : 精製したウシラクトフェリンを PBS で溶解し、ミリポアフィルターでろ過滅菌した。
- ②マウスサイトメガロウイルス (MCMV) : マウスサイトメガロウイルス Smith 株をマウス唾液腺で通過させたものをストックとして用いた。
- ③マウス : 4 ~ 5 週齢 BALB/cA+/+Jc1 マウスに滅菌した飼料、水を与え SPF 環境下で飼育、実験した。1 群 10 ~ 11 匹で実験を行った。動物実験は東海大学動物実験指針に沿って行った。
- ④MCMV 接種 : ウイルスストックを PBS で希釈し、腹腔内接種、経口接種、鼻腔接種した。腹腔内には 1×10^6 PFU/マウスを接種した。
- ⑤LF のペプシン、トリプシンによる加水分解物 : 5% LF をペプシン処理用は 1MHC1 で pH3.0 に、また、トリプシン処理用は pH7.0 に調整する。基質に対して 3% のペプシン、トリプシンで 37°C、4 時間加水分解した後、80°C、15 分間加熱し、反応終了とする。各分解物を 1MNaOH で pH7.0 に調整し、15000Xg、30 分間遠心後、上清を凍結乾燥し、ストックとする。
- ⑥LF、ペプシン分解 LF、トリプシン分解 LF の腹腔内投与 : MCMV 感染前 2 日間マウス腹腔内に投与した。

(2) 方法

- ①LF の経口投与による MCMV 感染防御効果を検討するに当たり、ペプシン、トリプシンによる加水分解物の腹腔内投与による MCMV 感染防御効果の有無を検討した。具体的には、マウスの生残率、体重変化、マウ

ス臓器のウイルス量を LF 非投与群と比較して、抗ウイルス効果を検討した。

- ②10mg/ml 濃度、50mg/ml 濃度 LF 入りの飲水を自由摂取させ、2 週間後に MCMV を腹腔内接種して、体重測定、および生残率を測った。MCMV 感染後も LF 入り飲水を自由摂取させた。

胃ゾンデにて強制的に 20mg/0.2ml/マウス LF を感染 7 日前から実験終了まで毎日経口投与した。

いずれも MCMV は腹腔内接種し、体重測定、および生残率を測った。

- ③Plaque assay 法にて *in vitro* における LF の MCMV 感染阻止効果を検討した。

前処理は以下のものである。

- LF の MCMV 粒子への直接作用 : PBS で希釈した LF と MCMV を等量混合して、37°C 60 分間作用後、3T3 Swiss albino 細胞に接種した。
 - LF の細胞への作用 : PBS で希釈した LF を細胞に作用させ、37°C 5 分、または 60 分間作用させた後、LF 除去、細胞洗浄後 MCMV を細胞に接種した。
 - LF を細胞に作用後、LF 入り培養液で培養 : LF を細胞に 5 分間作用し、MCMV を細胞に接種後、LF 入り培養液で実験終了時まで培養した。
- ④LF の投与経路と MCMV 感染経路を検討した。LF を胃ゾンデで経口投与したマウスには MCMV を胃ゾンデに経口接種した。LF をゾンデで鼻腔投与したマウスには MCMV を鼻腔接種した。体重変化、生残率を測定した。いずれの実験においても、対照群 (LF 非投与群) には LF と同量の PBS を投与した。

4. 研究成果

筆者らは、マウスにおいて乳中に含まれるラクトフェリン (LF) による顕著なマウスサイトメガロウイルス (MCMV) 感染防御効果を報告した。その際の LF、MCMV は共に腹腔内経路の投与、感染であり、防御機序は T 細胞を介したナチュラルキラー (NK) 細胞活性の上昇によるものであった。LF は乳中に多く存在することから、実際的には、経口投与による MCMV 感染防御効果が望ましい。そこで、

(1) 経口投与することによって、LF が消化酵素のタンパク分解酵素により防御能が失われないかを確認した。その結果、約 70% の生残率を示す最少量は LF が 0.1mg/g 体重に対し、ペプシン処理 LF では 0.5mg/g 体重であり、トリプシン処理 LF は 0.25mg/g 体重と LF そのものより防御効果は劣るもののタンパク分解酵素によって防御効果は失われなかった。なお、LF 非投与群の最終生残率は 30% であった。抗菌効果においては、ペプシン分解物 (LFcin) は LF そのものより、強い効

果をもたらすと報告されている。抗菌効果と異なり、本結果における抗ウイルス効果は LF そのものより劣るものであった。しかしながら、タンパク分解酵素による防御能の欠失は否定されたので経口投与実験を行った。

(2) マウスに 50mg/ml, 10mg/ml 濃度 LF 溶解液を飲水として、MCMV 腹腔内感染 2 週間前から、実験終了時まで自由摂取させた。最終生残率は LF 非投与群 0%、10mg/ml 濃度 LF 投与群 20%、50mg/ml 濃度 LF 投与群 0% と防御効果は認められなかった。飲水による自由摂取では LF の正確な摂取量が不明なため、次に、胃ゾンデによる強制投与を行った。20mg/0.2ml/マウス LF を感染 7 日前より実験終了時まで投与した。LF 投与群も非投与群もウイルス接種 1 日後から体重が減少し、非投与群の最終生残率 20%、LF 投与群は 17.5% と差は見られなかった。

以前報告した LF の MCMV 感染防御効果は LF を腹腔内投与し、その防御機構は血液や臓器中の NK 細胞活性の顕著な上昇によるものであり、これによって、マウスの MCMV 腹腔内接種による感染死を完全に抑制した。

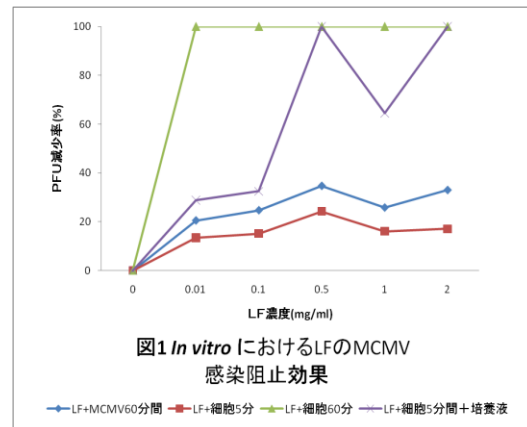
しかし、これまでの LF 経口投与実験結果より、経口投与では MCMV の腹腔内感染のような血液を介する強い感染力を阻止するまでの NK 細胞活性の上昇は起こらないものと推察される。

ヒトのサイトメガロウイルス感染症における感染経路は血液を介する経路以外にも経口や鼻腔による感染経路もある。そこで、

(3) MCMV を経口、鼻腔感染した場合において、LF の経口、鼻腔投与による MCMV 感染防御効果を検討する実験を計画した。

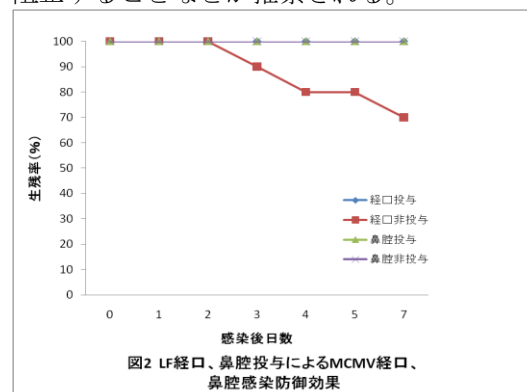
この検討に入る前に、この実験系では LF による NK 細胞活性上昇のような全身的な防御はもたらされないものと考え、LF の局所的な MCMV 感染防御効果のヒントを得るため、LF の *in vitro* における MCMV 感染阻止効果を Plaque assay 法で検討した。

LF のウイルス粒子への直接的な傷害作用をみるため、LF を MCMV と混合し、60 分間放置後、MCMV を細胞に感染させたが、LF による明らかな MCMV 感染阻止効果は認められなかった。LF を細胞側に作用後、MCMV を感染した場合、5 分の作用では顕著な効果が認められなかったが、60 分作用することによって、最少量 0.01mg/ml 濃度においても 100% の PFU (Plaque Forming Unit) 感染阻止効果が認められた。また、細胞への作用は 5 分間でも、その後、培養液中に LF を混入することによって、高濃度 LF において MCMV 感染阻止効果が認められた (図 1)。

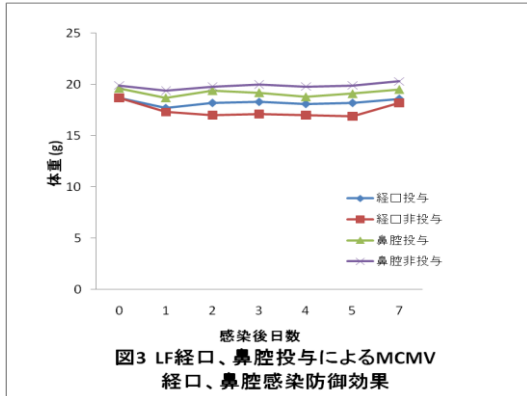


In vitro の結果から、生体の局所細胞に LF を感染前に作用させることにより、MCMV の細胞への感染を防御できるものと推察し、次の実験に取り組んだ。

(4) マウスに MCMV 感染 1 週間前から実験終了時まで毎日 LF を経口投与、または鼻腔投与した。経口投与マウスには MCMV を経口感染、鼻腔投与には MCMV を鼻腔感染した。経口投与群はゾンデにて 10mg/0.2ml/マウスの LF を、鼻腔投与群は 2.5mg/0.05ml/マウスを鼻腔に垂らし入れた。MCMV 経口接種は 1.1×10^7 PFU/マウス、鼻腔接種は 2.8×10^6 PFU/マウスを 1 回行った。その結果、図 2 に示すように経口投与、経口感染において、LF 非投与群は感染 3 日後から感染死する例が見られ、最終生残率は 70% であった。これに対し LF 投与群は感染 1 日後に、体重減少が認められたものの、その後回復し全マウスが生残した。*In vitro* 実験の LF による MCMV 感染阻止結果から推察するに、MCMV 感染前からの LF の経口投与によりマウス生体細胞に LF が作用することによって、MCMV の感染を阻止したものと考え。MCMV 感染後にも LF 投与することによって、感染前の LF 投与によって阻止しきれなかった MCMV の新たな細胞への感染を抑制したものと考え。LF の細胞への MCMV 感染阻止作用機序は不明であるが、LF が MCMV の細胞への吸着阻止、例えばウイルスレセプターに LF が結合して、細胞への MCMV 吸着を阻止することなどが推察される。



鼻腔投与においては、対照群が致死に至らず、生残率の指標では LF の感染防御効果は認められなかった。図 3 のように体重変化にも差異はなかった。この図における経口非投与群の感染 3 日以降のデータは死亡マウスを除いた平均値である。



鼻腔接種においては接種量が限られ、明らかな病原性を示すウイルス量が接種できなかったことが、差異が認められなかった一因と思われる。鼻腔感染については、致死や体重減少のような明確な病原性が認められなくとも鼻腔、気道、肺臓のウイルス量を経時的に測定することによって LF 投与によるウイルス増殖抑制の有無を検討することも可能であろう。

以上より、LF の経口投与による MCMV 感染防御効果は、これまでの腹腔投与、腹腔内感染による NK 活性上昇という全身的な防御とは異なり、局所細胞への感染阻止作用によって MCMV 感染防御効果が認められた

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志水 恵子 (SHIMIZU KEIKO)

東海大学・健康科学部・教授

研究者番号：20056302