

氏名	若林 裕之
生年月日	
本籍	茨城県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第200号
学位授与の日付	平成11年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	"Antifungal effects of a host-defensive factor lactoferrin and its related compounds (生体防御因子ラクトフェリン関連物質の抗真菌作用)"
論文審査委員(主査)	櫻井 勝(理学部・教授)
論文審査委員(副査)	正宗 行人(研究科・教授) 中西 義信(薬学部・教授) 福森 義宏(理学部・教授) 岩見 雅史(研究科・助教授)

### 学位論文要旨

Antifungal effects of a host-defense protein, lactoferrin, and related compounds were investigated. Lactoferricin B, a 25-mer antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin, showed antifungal activity against 75 strains of pathogenic fungi, inhibiting growth in a species-dependent and strain-dependent manner. Lactoferricin B killed the pathogenic yeast *Candida albicans* by inducing an efflux of  $K^+$  and an influx of  $H^+$ . N-acylated peptide derivatives based on the sequence RRWQWRMKK in lactoferricin B showed even stronger antifungal activity than that of lactoferricin B, because of a high affinity for membrane phospholipids. Lactoferrin and lactoferricin B showed synergistic antifungal activity in combination with azole antifungal agents against *C. albicans* including azole-resistant strains. Lactoferrin inhibited the *in vitro* growth of dermatophyte fungi of the genus *Trichophyton*. Oral administration of lactoferrin facilitated the healing of skin lesions in guinea pigs infected with *Trichophyton*. The culture supernatant of mononuclear cells derived from guinea pigs immunized with *Trichophyton* antigen and administered lactoferrin significantly augmented the *Trichophyton*-killing activity of macrophages. The active component in the culture supernatant was identified as an IFN- $\gamma$ -like cytokine. These results indicate that innate lactoferrin or its active fragment acts as a membrane-active antifungal molecule and enhances the efficacy of antifungal agents during chemotherapy. Moreover, oral administration of lactoferrin protects the host against fungal infection possibly via modulation of cell-mediated immune responses.

ラクトフェリンは外分泌液や好中球二次顆粒中に存在する、鉄結合性の糖タンパク質である。ラクトフェリンは抗微生物活性、免疫調節活性、抗酸化活性など多様な

生物活性を示し、感染などに対する防御因子として働いていると考えられている。ラクトフェリンのペプシン分解により N 末端領域から抗菌ペプチド、ラクトフェリシンが生成することが知られている。本研究は、ウシ・ラクトフェリン、それに由来するラクトフェリシン B、ラクトフェリシン B 誘導体の生体防御因子としての役割を調べるために、主に病原真菌をターゲットとしてその作用を検討することを目的とした。はじめにラクトフェリシン B について、細菌の *Listeria monocytogenes* に対する抗菌性を確認し、病原真菌における抗菌スペクトルと病原性酵母 *Candida albicans* に対する抗菌メカニズムを調べた。次に、ラクトフェリシン B 中の塩基性コア領域である RRWQWRMCKK をベースに誘導体を合成し、真菌、細菌に対する抗菌作用と、その他の生理活性として抗酸化性を評価した。さらに抗真菌化学療法におけるラクトフェリン類の影響を知るために、抗真菌剤とラクトフェリン／ラクトフェリシン B の *C. albicans* に対する in vitro 併用効果を検討した。最後に in vitro および in vivo 抗白癬菌 (*Trichophyton*) 作用、とくに白癬動物モデルでの経口投与ラクトフェリンの効果を明らかにしその作用メカニズムについて検討した。

グラム陽性菌 *L. monocytogenes* に対するラクトフェリシン B の抗菌効果を調べた。ラクトフェリシン B は 4 株の *L. monocytogenes* に対して、菌株と培地の種類に依存して 0.3~9  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で発育を阻止し、臨床的に使用される抗生物質と同等の効果を示した。この活性は、炭水化物やタンパク質の影響は受けなかったが、一価陽イオン塩によってやや低下し、pH 5.5~7.5 の間で強い活性を示した。ラクトフェリシン B の作用は殺菌的であり、全ての試験菌株の生残能を急速に消失させた。こうした作用は、グラム陰性菌 *Escherichia coli* などに対する作用と共通していることから、細菌類に対しては概ね同様の作用様式を取ることが確認された。ただし、最小発育阻止濃度 (MIC) はペプトン・ブロス中で 1  $\mu\text{g/ml}$  以下であり、特に *L. monocytogenes* がラクトフェリシン B に対して感受性の高いことが示された。

ラクトフェリン関連物質の病原性真菌に対する作用を検討する端緒として、ラクトフェリシン B の抗真菌と抗真菌メカニズムを検討した。75 菌株の病原性真菌を用い

て寒天希釈法により抗真菌スペクトルを調べた。病原性酵母と皮膚糸状菌のラクトフェリシン B に対する感受性は、菌種と菌株により異なっていた。黒色真菌と二形性真菌は感受性を示した (MIC 値の範囲は  $0.63 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ )。非着色性真菌と接合菌では、多くの菌株が抵抗性を示した (MIC 値は  $>80 \mu\text{g/ml}$ )。次に、病原性酵母 *Candida albicans* に対するラクトフェリシン B の抗菌メカニズムを検討した。ラクトフェリシン B は *C. albicans* に対して濃度依存的に殺菌作用を示した。ラクトフェリシン B による殺菌過程において、浸透圧ストレスに対する細胞壁の抵抗性に変化は見られなかった。ラクトフェリシン B  $10 \mu\text{g/ml}$  は *C. albicans* からの急速な  $\text{K}^+$  の流出 (図 1) と細胞外液の pH の上昇、つまり  $\text{H}^+$  の細胞内への流入を引き起こした。この効果は、細胞膜の合成と機能を障害する抗真菌剤、硝酸ミコナゾールよりも強いものだった。これらの *in vitro* での観察は、ラクトフェリシン由来のペプチドの真菌に対する作用点が細胞膜であることを示している。

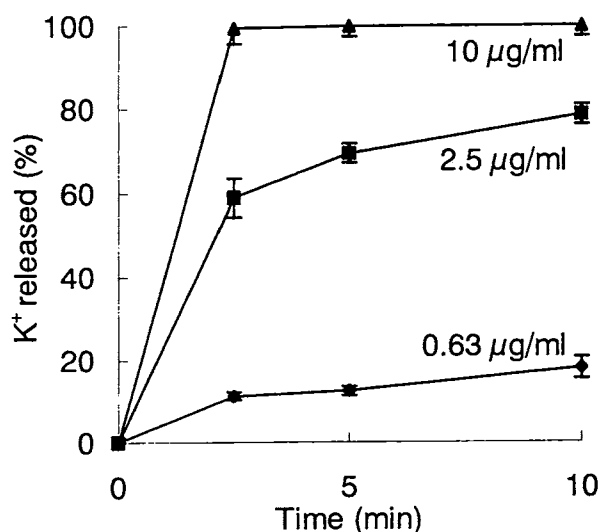


図 1. ラクトフェリシン B により誘導される *C. albicans* 細胞からの  $\text{K}^+$  流出。図中の数字 ( $\mu\text{g/ml}$ ) はラクトフェリシン B の添加濃度を示している。

ラクトフェリシン B の誘導体化ペプチドについて、抗菌性と抗酸化性を検討した。ラクトフェリシン B 中の配列 RRWQWRMCK の N アシル化、D 体化ペプチド誘導体は、真菌と細菌に対してラクトフェリシン B より強い抗菌活性を示した。最も活性の高いペプチドは炭素鎖数 11 のアシル基を結合させたもので、*C. albicans* と白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* に対して、ラクトフェリシン B の 2 から 4 倍低い MIC を

示した。一方、鉄/アスコルビン酸で誘導されるリポソームリン脂質過酸化の系において、ラクトフェリシン B はラクトフェリン同様、過酸化脂質の指標である TBARS の生成を抑制した。TBARS 生成の抑制は上記 N アシル化 9 残基ペプチドでも示され、その活性はラクトフェリシン B の 100 倍程度強いものだった。これは塩基性ペプチドへの脂質の付加によりリン脂質への親和性が高くなったためと考えられ、こうした化学的特性の変化により細胞への親和性も高くなり高い抗真菌・抗細菌活性を発揮するようになったと思われる。比較的短い塩基性ペプチドへの脂質の付加により、細胞膜リン脂質をターゲットとする生物活性の高いペプチド誘導体の創製が可能かもしれない。

真菌症の治療には各種の抗真菌剤、主としてアゾール系、ポリエン系、フルオロピリミジン系が使用されている。ラクトフェリンとその活性ペプチドのこれらの抗真菌剤との併用による *C. albicans* に対する抑制作用を酵母状発育条件下で微量液体希釈法により検討した。比較的 low 濃度のアゾール系抗真菌剤、クロトリマゾールの存在下で、ラクトフェリン、ラクトフェリン・ペプシン分解物、ラクトフェリシン B による *C. albicans* 発育阻止濃度は低下した。調べた全てのアゾール系抗真菌剤の MIC は sub-MIC レベルのこれらラクトフェリン関連物質存在下で、1/4-1/16 に低下した。ポリエン系、フルオロピリミジン系抗真菌剤はそのような共同作用を示さなかった。ラクトフェリン、あるいはラクトフェリシン B とクロトリマゾールの併用による抗 *Candida* 作用は相乗的であることがチェッカーボード法によって確認された (図 2)。  
*C. albicans* の病原因子の一つとして菌糸状にも生育しうることが挙げられている。*C. albicans* を菌糸状に発育させ菌糸の量を特異的に定量できるクリスタルバイオレット染色法を用いて、アゾール耐性菌 3 株を含む *C. albicans* 株でラクトフェリン類とアゾール系抗真菌剤の効果を検討した。高度アゾール耐性株 2 株の菌糸はアゾール感受性株と比較してラクトフェリンとラクトフェリシン B に対して高い感受性を示した。中度アゾール耐性株 1 株は菌糸状に発育できず、感受性株と比較して、ラクトフェリンには高感受性をラクトフェリシン B には同程度の感受性を示した。高度アゾール耐性

株の TIMM3317 はフルコナゾール、あるいはイトラコナゾールの存在下で尾を引くような発育を示したが、sub-MIC レベルのラクトフェリン、ラクトフェリシン B の添加によってその発育量は低下した。このように sub-MIC レベルのラクトフェリン、ラクトフェリシン B の添加は、高度耐性 2 株でのフルコナゾール、イトラコナゾールの MIC を低下させた (TIMM3317 に対するフルコナゾールの MIC はラクトフェリンによって >256 から 0.25  $\mu\text{g/ml}$  にシフトした) が、感受性株の MIC には影響しなかった。高度耐性 2 株でのトリアゾールとラクトフェリン類の併用効果は FIC index より相乗的と判定された。これらの結果は、あるアゾール耐性 *C. albicans* において、トリアゾールとラクトフェリン類の併用がその病原性に重要な菌糸状発育を抑制しうることを示している。これらの結果は、ラクトフェリン存在量の高い子宮頸管等では耐性菌の出現が報告されていないのに対して、ラクトフェリン存在量の低い口腔内では、耐性菌の出現が頻発していることとの関連性を想像させる。相乗効果のメカニズムとしてはラクトフェリン関連物質による膜作用による薬剤排出ポンプの阻害が関係しているかもしれない。

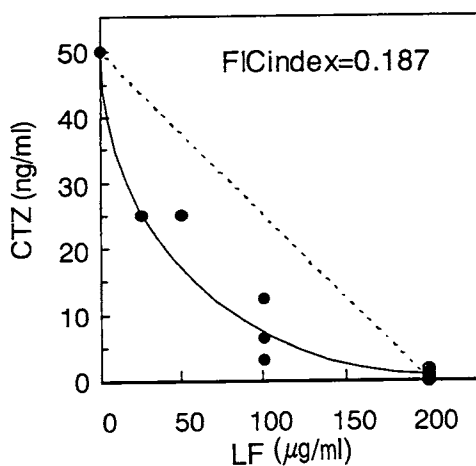


図2. ラクトフェリン (LF) とクロトリマゾール (CTZ) との抗 *Candida* 併用効果をチェッカーボード法で解析した。*C. albicans* に対するクロトリマゾールとラクトフェリンの併用時の 80% 阻止濃度を算術スケール上に黒丸でプロットした。相加的と推定される濃度を破線で示した。2 剤併用についての FIC index をグラフ内に示した。

ラクトフェリンは乳児の摂取する母乳中の大きな比率を占める成分である。またラクトフェリンを摂取することの生理的意義が動物実験により示唆されている。白癬の起因菌 *Trichophyton* に対するラクトフェリンの直接的、ならびに経口摂取による生体を介した作用を検討した。ヒトとウシのラクトフェリン、ラクトフェリシン B は in

in vitro で *T. mentagrophytes* と *T. rubrum* の発育を抑制した。*T. mentagrophytes* に感染したモルモットを白癬モデルとして用い、ウシ・ラクトフェリンの経口投与の in vivo 効果の評価した。体部白癬モルモットにおいて、ラクトフェリンは感染後期の皮膚病変の改善を促進し、病変部に残る真菌の量を顕著に低下させた（表 1）。足白癬モルモットにおいても、ラクトフェリンの投与は足の踵側に残る真菌量を低下させた。

表 1. モルモット体部白癬モデルでのラクトフェリンの治療効果

Agent	Administration period	Average intensity of infection
Experiment 1		
Untreated control		6.5
LF (0.25g/kg/d)	-7 to 18	3.0
LF (2.5g/kg/d)	-7 to 18	1.8*
Griseofulvin	-7 to 18	0.5*
Experiment 2		
Untreated control		7.5
LF (2.5g/kg/d)	-7 to 20	4.0
LF (2.5g/kg/d)	3 to 20	3.1*

モルモットの背中に *T. mentagrophytes* を植菌し、ラクトフェリン 2.5 g/kg/d または 0.25 g/kg/d、グリセオフルビン 0.025 g/kg/d を経口投与した。投与期間は感染後の日として示した。感染 21 日目に、病変部から切り出した皮膚を残留する真菌の検出のために培養した。平均感染強度はそれぞれの動物の 10 皮膚小片中の培養陽性小片数に基づいて 0~10 までスコアリングした。\*  $P < 0.05$  vs. 未処置群。

この in vivo での作用メカニズムについて、ラクトフェリンの直接的な抗菌作用が寄与しているという証拠は得られなかった。白癬に対する防御機構として細胞性免疫が重要な役割を担っていることが知られているため、*Trichophyton* 抗原で感作したモ

ルモットの脾臓単核球の免疫応答性への、ラクトフェリン投与の影響を調べた。経口投与したラクトフェリンは、感作、非感作の両者のモルモットの単核球増殖反応を抑制した。しかし、*Trichophyton* 抗原で感作しラクトフェリンを投与したモルモットの単核球培養上清は、感作のみ、あるいはラクトフェリン投与のみを受けたモルモットと比較して、腹腔の常在マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性を顕著に高めた（図3）。この活性の亢進は抗 rat IFN- $\gamma$ 抗体の添加によって阻害された。また、上清と同様のマクロファージ活性を亢進する作用は rat IFN- $\gamma$ の添加によっても見られたため、単核球培養上清中の活性本体は IFN- $\gamma$ 様サイトカインであることが示された。これらの結果は、経口投与したラクトフェリンが、直接的作用より、むしろ生体の免疫系、特に細胞性免疫を調節することで *Trichophyton* 感染に対して治療効果を示していることを示唆している。

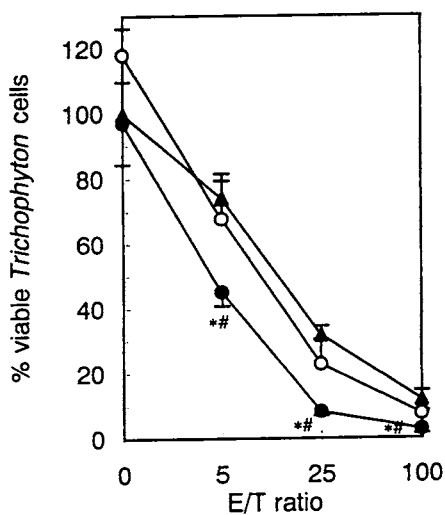


図3. 単核球培養上清のマクロファージ *Trichophyton* 殺菌活性への影響。6匹のモルモットの足蹠に *Trichophyton* 抗原を感作した。そのうち3匹にラクトフェリンを7日間経口投与し、残りの3匹には投与しなかった。感作7日目に、単核球を単離し、*Trichophyton* 抗原刺激下で培養し、2日後の培養上清を回収した。マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性は上清なし (▲)、ラクトフェリン未投与動物由来の細胞上清 10% (○)、ラクトフェリン投与動物由来の細胞上清 10% (●) 下でアッセイした。\*  $P < 0.05$  vs. 上清なしのマクロファージ。#  $P < 0.05$  vs. ラクトフェリン未投与動物由来の細胞上清 10%を加えたマクロファージ。

本研究で得られた結果を総合すると、内因性のラクトフェリンあるいはその活性フラグメントは真菌感染に対してその膜作用により抗菌性エフェクター分子として働いていることを強く示唆している。また抗真菌剤による化学療法の効果、外分泌液などに存在しているラクトフェリンが高めていると思われる。一方、経口摂取したラクトフェリンは感作ないしは感染を受けた生体の免疫系、特に細胞性免疫に働き、間

接的に生体防御機能を高める役割を持つものと考えられる。しかし現在得られている結果では、まだ十分な証明ではなく、作用経路も分かっていない。今後、免疫学的な詳細な検討が必要である。

## 学位論文審査結果の要旨

ラクトフェリンは鉄結合性タンパク質のトランスフェリンファミリーの一である。外分泌液や好中球顆粒中に存在し、抗微生物活性、免疫調節活性、抗酸化活性などを示し、生体防御因子としての作用が考えられてきた。本論文は、ウシ・ラクトフェリンの生体防御活性と病原性真菌に対する抑制作用を検討したものである。特に、ペプシン分解によりN末領域から生成するラクトフェリシン及びそれに由来するラクトフェリシンBとラクトフェリシンB誘導体を研究対象とした。結果は5章からなる。まず、細菌に対するラクトフェリシンBの抗菌性を確認した後、病原性真菌における抗菌スペクトルと病原性酵母に対する抗菌メカニズムを調べた。ついで、ラクトフェリシンBの誘導体を用いた構造活性相関について真菌と細菌を用いて検討を加え、応用面からは抗真菌剤との併用効果について *in vitro* 及び *in vivo* の双方からの検討を加えた。以上の研究により、内因性のラクトフェリン及びその活性誘導体は真菌感染に対して抗菌性エフェクターとして作用しその作用点が細胞膜であること、塩基性ペプチドのN-アシル化誘導体が高い活性を示すこと等を示した。また、経口摂取したラクトフェリンは免疫系を賦活化し間接的に生体防御機能を高める事を示唆した。これらの研究は当初のゴールには不十分であるものの、その作用経路や免疫学的な研究に途を開くものであると評価された。よって、本論文は博士(理学)の学位を授与するに十分なものであると判定した。