

In vitro における乳中ラクトフェリンの マウスサイトメガロウイルス感染阻止効果

志水 恵子

Inhibitory effect of lactoferrin in milk on infection with murine cytomegalovirus in vitro

Keiko SHIMIZU

抄録

In vitro 条件下におけるウシラクトフェリン (bLF) およびヒトラクトフェリン (hLF) の抗マウスサイトメガロウイルス (MCMV) 効果について検討した。bLF、hLF ともに MCMV 粒子に直接作用させた場合には効果が認められなかったが、MCMV 感染前に細胞側に60分間作用させることによって、顕著な MCMV 感染阻止効果が認められた。この結果から、bLF、hLF は MCMV が細胞に吸着しないしは侵入する際に阻止効果をもたらすものと推察された。顕著な抗 MCMV 効果を示す bLF、hLF の最少濃度はそれぞれ0.01mg/ml、1 mg/ml であった。人乳の LF 濃度は初乳 3～7 mg/ml、永久乳 1 mg/ml であることと本結果を考え合わせると、人乳中の LF の抗サイトメガロウイルス効果が期待される。

key words : 牛乳、人乳、ラクトフェリン、サイトメガロウイルス、感染阻止

I はじめに

ラクトフェリン (LF) は乳、涙、唾液、胆汁、腭液などの外分泌液中に含まれる (Johanson, 1960) 分子量約 80kDa の鉄結合性タンパク質である。これら外液の中でも、特に乳中に多く含まれている。また、LF は様々な生物活性を示す事が知られている。鉄吸収の促進 (Hu, 1990)、BALB/cA3T3 細胞や腸管 Crypt 細胞増殖作用 (Azuma, 1989; Nichols, 1990) 等の報告がある。これらの生物活性の中でも抗菌活性については多くの研究がなされており、そのメカニズムとしては不飽和の LF が細菌の鉄利用を妨げることによる細菌の増殖抑制 (Arnold, 1977) や、グラム陰性菌の外膜障害 (Ellison, 1990) 等の報告がある。

LF の抗ウイルス効果についての報告は数少ないが、筆者らはマウスを用いた in vivo 実験においてウシラクトフェリン (bLF) がマウスサイトメガロウイルス

(MCMV) 感染を防御することを報告した (Shimizu, 1996)。この報告は腹腔投与した bLF が T 細胞を刺激し、その結果 NK 細胞活性を上昇させた免疫増強による感染防御効果であった。このような免疫系を介する感染防御以外に、体液中 LF が直接ウイルス感染を阻止する可能性は否定できない。そこで、この点を明確にするために in vitro 系で LF による MCMV 感染阻止効果を検討した。LF は in vivo 実験 (Shimizu, 1996) で効果を示した bLF について検討し、さらにヒト生体内での LF の効果を明らかにするためにヒトラクトフェリン (hLF) についても同様の検討をおこなった。

II 材料と方法

1. ウイルス

南嶋博士 (宮崎医科大学) から恵与されたマウスサイトメガロウイルス Smith 株 (MCMV) 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。ウシラクトフェリン実験およびヒトラクトフェリン実験に用いたウイルス価はそれぞれ 5.5 PFU (log/ml)、4.9 PFU (log/ml)

* 東海大学 健康科学部 看護学科

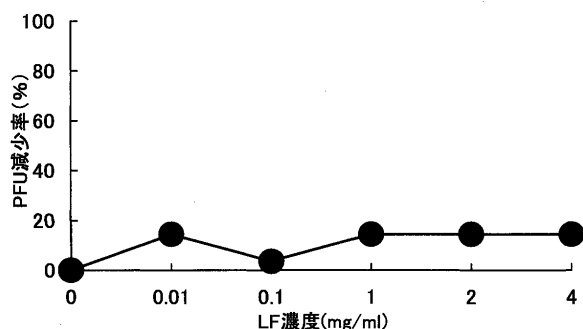


図1 bLFをMCMV粒子へ直接作用させた場合の感染阻止効果

であった。

2. ラクトフェリン

川上ら(1987)の精製によるウシラクトフェリン(bLF)(新鮮な脱脂牛乳から分離、純度97%、鉄飽和度30%)、およびヒトラクトフェリン(hLF)(Sigma、L-3770、Iron-saturated、from Human Milk)をリン酸緩衝液(PBS)で溶解し、0.45 μ 1のミリポアフィルターで濾過滅菌した。

3. ウイルス定量法

96穴マイクロプレートに培養した3T3 Swiss albino細胞にMCMVを接種後、メチルセルロース入り細胞培養液を重層し、4～5日間5%炭酸ガス培養器中で培養した後、感染細胞を固定染色し、顕微鏡下でブラック数を測定した。詳細は文献(Leung、1986)に記す。

4. LFの抗MCMV効果測定のための前処理

1) LFの抗MCMV直接作用

PBSで希釈したLFとMCMVを等量混合して、37℃60分間放置後、細胞に接種した。

2) LFの細胞への作用

PBSで希釈したLFを細胞に作用させ、37℃5分、60分間炭酸ガス培養器中に放置した。LFを除去し培養液で洗浄した後、MCMVを細胞に接種した。

3) LF入り培養液の作用

MCMVを細胞に接種後、LF入り培養液で培養した。

III 結 果

LFをMCMV粒子に直接作用させた場合の感染阻止効果

LFによるMCMV粒子への抗MCMV効果を検討するため、bLFおよびhLFをMCMVと60分間直接作用させた。その結果をそれぞれ図1、図2に示す。MCMV

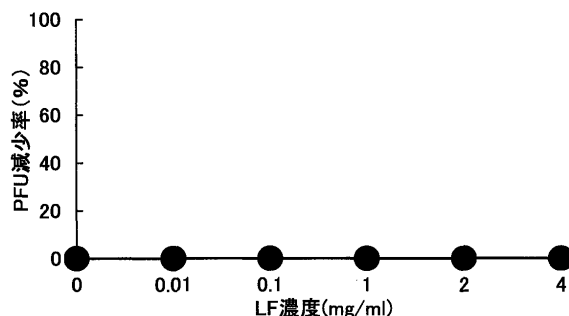


図2 hLFをMCMV粒子へ直接作用させた場合の感染阻止効果

感染阻止効果はLF無添加のウイルス価(log PFU)に対するLF添加ウイルス価の減少率で示した。なお、ウイルス価が検出限界以下(1.0 PFU/ml未満)となった場合を減少率100%とした。図1のbLFにおいては添加によって減少傾向は認められたが、最高濃度において14.5%と微少であった。図2のhLFはいずれの濃度においてもウイルス価の減少は全く認められなかった。従って、bLF、hLFともにMCMV粒子へ直接作用させた場合には、明らかな感染阻止効果は認められなかった。

LFを細胞へ直接作用させた場合のMCMV感染阻止効果

LFを細胞に直接作用させることによって、MCMV感染を阻止するかどうかを検討するためにbLFおよびhLFを感染細胞である3T3 Swiss albino細胞に5分間あるいは60分間作用させ、抗MCMV効果を測定した。その結果を図3、図4に示す。bLF低濃度においては5分間の作用でウイルス価は全く減少せず、高濃度においても7.3%とわずかな減少率であった。しかし、60分間作用した場合にはbLF最少濃度の0.01mg/mlにおいて、既に100%の減少率を示し、顕著な抗MCMV効果が認められた。hLFにおいては5分間の作用でわずかな減少はあったが、LF濃度依存的に減少し、最高濃度では24.5%の減少率であった。60分間の作用ではbLFの結果と同様に著しい抗MCMV効果を示した。但し、顕著な効果が認められるLFの最少濃度はbLFが0.01mg/mlであったのに対し、hLFは1mg/mlと100倍の差が認められた。

MCMV接種後の培養液中LFによるMCMV感染阻止効果

MCMVを細胞に接種した後、培養液中のLFが抗MCMV効果を示すかどうかを検討した結果を図5と図6に示す。bLFは0.01と0.1mg/ml添加ではほとんど効果を認めないが、1mg/ml添加では22.8%、2mg/mlでは100%の減少率であった。hLFにおいても、1mg/ml添加

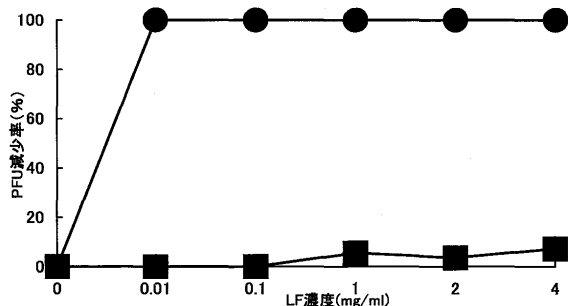


図3 bLFを細胞へ直接作用させた場合のMCMV感染阻止効果

■：bLF 5分間作用、●：bLF 60分間作用

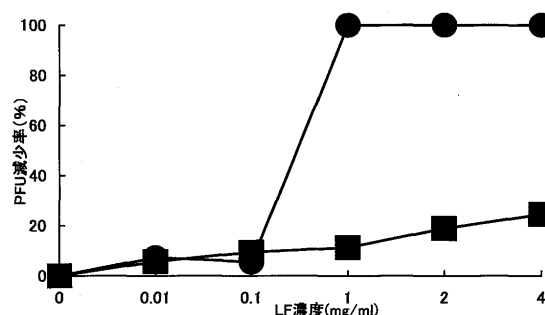


図4 hLFを細胞へ直接作用させた場合のMCMV感染阻止効果

■：hLF 5分間作用、●：hLF 60分間作用

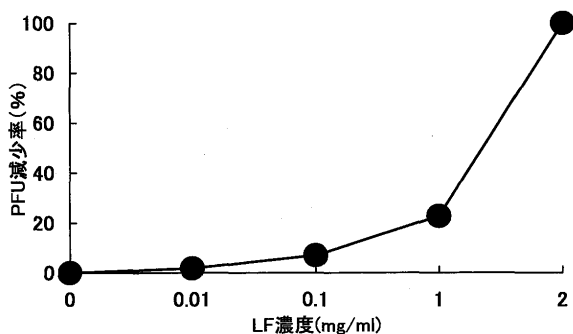


図5 培養液中bLFのMCMV感染阻止効果

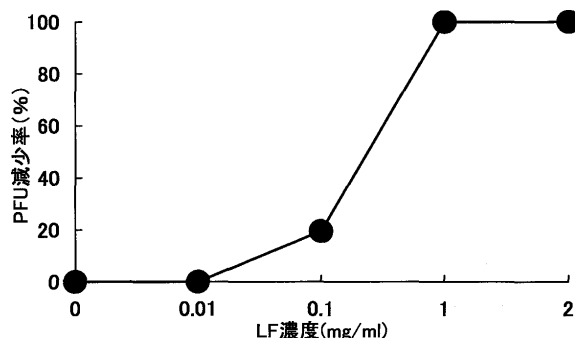


図6 培養液中hLFのMCMV感染阻止効果

で100%の減少率を示し、顕著な MCMV 抑制効果が認められた。なお、bLF、hLF 共に4mg/ml では細胞毒性を示した。

IV 考 察

In vitro 条件下における LF の抗 MCMV 効果について検討した。その結果、bLF、hLF いずれも抗 MCMV 効果を示すことが明らかとなった。その効果は bLF、hLF を MCMV 粒子に直接作用させた場合には認められないが、細胞側に60分間作用させることによって、顕著な感染阻止効果がもたらされた。本結果は長谷川ら (1994) の細胞に bLF を60分間作用した際に、bLF 濃度依存的にヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の感染阻止効果が認められるとの報告と一致するものである。作用時間についても30分以内では bLF の抗 HCMV 効果は微少であるが、30~60分で最大効果を示す Harmsen らの報告 (1995) と5分間の作用では明らかな効果が認められなかった本結果と一致するものである。この効果の機序について、Harmsen ら (1995) は HCMV が細胞に侵入した後に LF を投与しても効果が認められないことから吸着ないしは侵入の段階を抑制するものと推測してい

る。また、Mann (1994) は細胞膜上レセプターに LF が結合する事によって、ウイルスの細胞吸着を阻害すると報告している。Andersen ら (2001) も LF が HCMV の侵入を阻止すると述べている。以上の報告から、本報告の bLF および hLF による抗 MCMV 効果はウイルスの細胞吸着ないしは侵入を阻害することによるものと推察される。このように bLF、hLF が MCMV の感染を阻止する機構は、直接ウイルス粒子に作用する C 型肝炎ウイルス (野崎、2002) やヒト免疫不全ウイルス (Swart、1996) とは異なるものである。

LF は MCMV 感染前に細胞に作用することによって効果を示したが、MCMV を細胞に接種した後に LF 入り培養液で培養した実験結果においても、hLF は細胞へ作用させた結果と同様の 1 と 2 mg/ml 添加に効果が認められた。これについては、培養液中の hLF は接種時の MCMV の細胞への吸着・侵入を防ぐことはできないが、周辺の未感染細胞に作用し培養中の感染伝播を抑制し、ブラック形成に至らなかったためと考える。しかし、bLF の細胞への作用では 0.01mg/ml で既に効果を示しているが、培養液の結果では高濃度の 2mg/ml に顕著な効果を示したのみであった。これについての理由は定かでないが、bLF (0.1mg/ml) は細胞への作用時間が 2 時間を

超えると抗ウイルス効果を失う (Harmsen, 1995) ことから、bLF 1 mg/ml 以下では長時間の作用のため効果が弱まったことが一因と推察される。

以上の結果から LF による抗 CMV 効果は生体内においても、細胞側に作用することによって CMV 感染抑制に寄与しているものと推察される。特に、人乳は LF 含有量が多く初乳で3~7mg/ml、永久乳で1 mg/ml (Sanchez, 1992)とされており、本実験結果の1 mg/ml 以上で効果が認められることと考え合わせると、人乳の抗 CMV 効果が期待できるものと考ええる。

謝 辞

ウシラクトフェリンの恵みに対し、元雪印乳業株式会社の堂迫俊一氏、川崎功博氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- Andersen JH, Osbakk SA, Vorland LH, Traavik T, Gutteberg TJ (2001) Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res* 51: 141-149.
- Arnold RR, Cole MF, McGhee JR (1977) A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197: 263-265.
- Azuma N, Mori H, Kaminogawa S, Yamauchi K (1989) Stimulatory effect of human lactoferrin on DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *Agric Biol Chem* 53: 31-35.
- Ellison III RT, Marc LaForce F, Giehl TJ, Boose DS, Dunn BE (1990) Lactoferrin and transferring damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *J Gen Microbiol* 136: 1437-1446.
- Harmsen MC, Swart PJ, de Bethune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH, Meijer DK (1995) Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis* 172: 380-388.
- Hasegawa K, Motsuchi W, Tanaka W, Dosako S (1994) Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Jpn J Med Sci Biol* 47: 73-85.
- Hu W-L, Mazurier J, Montreuil J, Spik G (1990) Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry* 29: 535-541.
- Johanson B (1960) Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand* 14: 510-513.
- Kawakami H, Shinmoto H, Dosako S, Sogo Y (1987) One-Step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies. *J Dairy Sci* 70: 752-759.
- Leung WCT, Hashimoto K (1986) Modification of susceptibility to *Klebsiella pneumonia* during murine cytomegalovirus infection. *Microbiol Immunol* 30: 761-776.
- Mann DM, Romm E, Migliorini M (1994) Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J Bio Chem* 269: 23661-23667.
- Nichols BL, McKee KS, Huebers HA (1990) Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt enterocytes. *Pediatr Res* 27: 525-528.
- 野崎昭人、田中克明、長沼篤、果糖宜之 (2002) C 型肝炎治療薬としてのラクトフェリンの基礎・臨床応用の最新知見、*日本臨牀* 60: 819-829.
- Sanchez L, Calvo M, Brock JH (1992) Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Childhood* 67: 657-661.
- Shimizu K, Matsuzawa H, Okada K, Tazume S, Dosako S, Kawasaki Y, Hashimoto K, Koga Y (1996) Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell-dependent augmentation of natural killer cell activity. *Arch Virol* 141: 1875-1889.
- Swart PJ, Kuipers ME, Smith C, Pawels R, de Bethune MP, De Clercq E, Huisman JG, Meijer DKF (1996) Antiviral effects of milk proteins: acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 in vitro. *AIDS Res Human Retrov* 12: 769-775.