

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
2014年度 博士論文

ラクトフェリンの舌下からの吸収による脳への  
移行と抗酸化能との関連についての検討

2015年3月6日

林 隆司

Takashi Hayashi

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
環境病理学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科  
2014年度 博士論文

ラクトフェリンの舌下からの吸収による脳への  
移行と抗酸化能との関連についての検討

2015年3月6日

林 隆司

Takashi Hayashi

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

環境病理学講座

槻木恵一教授 指導

2014年度  
博士論文

ラクtofフェリンの舌下からの吸収による脳への移行と抗酸化能との関連についての検討

環境病理学講座  
林 隆司

## 論文内容要旨

唾液腺は、唾液の分泌を行う腺組織であり、口腔内の湿潤状態を維持し、咀嚼、会話などの口腔機能の維持に極めて重要な役割を果たす臓器である。例えば、唾液中に含まれる分泌型 IgA、リゾチーム、ラクトフェリン (LF) などの抗菌物質は感染予防に重要である。その中でも LF は、感染防御だけでなく、抗炎症作用、抗酸化作用、内臓脂肪低減作用、抗癌作用、放射線防護作用など多機能を有することが報告されており、注目されている。また、これまで腸管から吸収された LF が、循環血液中へ移行し、全身の健康科学的な意義が注目されている。一方、LF は唾液中に含まれ口腔の健康維持に重要な物質であるが、唾液 LF (sLF) の全身への影響についてはこれまで検討されていない。また、近年アルツハイマー病の原因として、脳への鉄の蓄積により発生する酸化物質であるヒドロキシルラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) が関与していることが報告され、この鉄の除去に、キレート作用の強い LF が重要な役割を果たすことが示されており、脳における LF の抗酸化能が注目されていることから、脳における LF の意義は非常に興味深い。さらに、当教室では、これまで唾液腺産生物質の全身への影響を検討してきたが、全身への移行経路として舌下部が有力であることを示してきた。

本研究では、唾液腺の摘出により血中および脳内ラット LF (rLF) 濃度に及ぼす影響を解析した。また、LF の舌下部からの吸収に着目し、実験的に麻酔下で、舌下部にウシ LF (bLF) を投与し、投与後 5 分、15 分、30 分における脳内 bLF 濃度の経時的变化を測定した。さらには、bLF のスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) および  $\text{HO}\cdot$  の除去率を電子スピン共鳴 (ESR) により測定した。以上 3 つの実験系より、LF の舌下からの吸収による全身の健康への意義を明らかにすることを目的とした。

唾液腺摘出 1 週間後の血中および脳内 rLF 濃度は、非摘出群と比較し有意に減少した。舌下部からの bLF 投与に関しては、投与後 5 分および 15 分において、control と比較し、有意に脳内 bLF 濃度の増加を認め、その濃度は経時的に減少した。また、ESR による bLF の抗酸化能の測定については、control と比較し、bLF の  $\text{HO}\cdot$  に対する有意な除去能を認めた。また本法は、過酸化水素の光分解を利用した反応により  $\text{HO}\cdot$  を発生させたため、今まで報告されてきたキレート作用によるものではなく、LF の直接的な  $\text{HO}\cdot$  除去能も示唆された。

以上の点から、LF の舌下からの吸収は、脳において抗酸化能を発揮する可能性が考えられ、全身の健康への貢献が示唆された。

## 論文審査要旨

ラクトフェリン lactoferrin (LF) は、キレート作用により静菌作用を示す物質として知られ、全身の粘膜表面を覆う粘液や母乳中に含まれ、局所の感染防止に貢献している。しかし、感染防止だけでなく、抗炎症作用、抗酸化作用、内臓脂肪低減作用、抗癌作用、放射線防護作用などを有することが報告されており、局所的な作用だけでなく多様な機能が注目されている。特に LF は唾液中に含まれ、IgA やリゾチームとともに口腔の感染防御に貢献しているが、唾液 LF (sLF) が口腔以外の臓器でどのような貢献をしているかは、これまで充分検討はされてこなかった。本研究は、sLF の全身への影響を検討した新規性の高い研究テーマと考えられる。

本研究では、ラットの両側三大唾液腺摘出モデルにより、血中および脳内ラット LF (rLF) 濃度に及ぼす影響を ELISA により解析した。また、実験的に麻酔下で、舌下部にウシ LF (bLF) を投与し、投与後 5 分、15 分、30 分における脳内 bLF 濃度の経時的変化を ELISA により測定した。さらに、bLF のスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot -}$ ) およびヒドロキシルラジカル ( $HO^{\cdot}$ ) の消去率を電子スピン共鳴 (ESR) により測定した。これらの測定法は確立されたもので、マニュアルに従い行われており、さらに統計解析も問題ないことが確かめられた。

その結果、唾液腺摘出 1 週間後の血中および脳内 rLF 濃度は、非摘出群と比較し有意に減少するという興味ある結果が得られている。舌下部からの bLF 投与に関しては、投与後 5 分および 15 分において、control と比較し、有意に脳内 bLF 濃度の増加を認め、その濃度は経時的に減少したことから、舌下部からの LF は脳内 LF 濃度に影響することが示された。また、ESR による bLF の抗酸化能の測定については、control と比較し、bLF の  $HO^{\cdot}$  に対する有意な消去能を認めている。

LF の血中濃度は、主に胆汁や腭液中の LF が腸管からの再吸収や好中球からの放出によるものと考えられてきたが、本検討により唾液腺も有力な臓器であることが初めて明らかにされた。また、唾液腺からの LF は、胃で分解されることから下部消化管からの吸収は否定的であったが、舌下部からの経路が有力であることを示した点は、その実験デザインにも斬新性があり評価できる。また、sLF が脳内 LF 濃度に影響する知見は、その効果を直接的に明らかにしてはいないが、sLF が口腔の感染防止としての役割だけでなく、遠隔臓器へ何らかの効果を示す可能性が示唆されており、sLF の新たな研究的価値を高めた。さらに、本研究は ESR による  $HO^{\cdot}$  の消去が Fe イオンに対するキレート作用によるフェントン反応ではなく、直接的なラジカルの消去機能が示唆された点は、LF の生体における生物学的作用の新たな展開を期待できるものとして高く評価できる。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して、以下の項目について口頭試問を行ったところ十分な回答が得られることを確認した。

1. ラットへの bLF の投与方法が粉末を舌下に行っているため、一部消化管経由での血中への移行も否定できない点について

消化管からの吸収も一部考えられるがそのレベルは分解より極めて低いレベ

ルであること、また、唾液腺摘出による血中および脳への移行の減少量と舌下投与 15 分後の bLF 濃度の増加量から、舌下部血管網からの吸収が主であると考えられるとの回答であった。

2. 唾液腺摘出 2 週間後での血中および脳内 LF 濃度の回復について

生体では唾液腺以外に膵臓や肝臓における代償的産生によるものと考えられるとのことであった。

3. 舌下投与後 30 分間で脳内 LF 濃度の低下が認められたことについて

申請者は LF 分子の分解によるものとしては、短時間に濃度低下がみられていることから、拡散により組織滞在時間が短くなったことによると考察していた。

4. ラット由来 rLF と、投与したウシ由来 bLF との識別について

ラットとウシの LF 分子のアミノ酸レベルの相同性については一部不明な点もあるが、本研究の ELISA で使用した抗体の特異性は高く、外来性の LF としてウシ由来の bLF を投与しているが、内在性のラット由来の rLF との識別が可能であるとのことであった。

以上より、LF の生物学的効果における新しい知見は、今後の歯科医療拡大への貢献が期待でき、LF の生体反応に関する研究の発展につながるとの結論に至った。そこで、本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分に値するものと認めた。

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2015 年 3 月 6 日

主 査： 木本 茂成 教授

副 査： 高橋 俊介 准教授

副 査： 美島 健二 教授

## 緒 言

唾液腺は、唾液の分泌を行う腺組織であり、口腔内の湿潤状態を維持し、咀嚼、会話などの口腔機能の維持に極めて重要な役割を果たす臓器である。唾液腺に関する教育は主に歯学部で行われていることから、唾液腺は歯科口腔領域に属する臓器であり、唾液腺の健康維持や疾患の治療は歯科医師が担っていると同時に、唾液腺および唾液の研究においても歯科医学が牽引してきた。

一方、唾液腺が最も注目されたのは、神経成長因子 nerve growth factor (以下、NGF) と上皮成長因子 epidermal growth factor (以下、EGF) が、唾液腺から Cohen らによって発見されたことである<sup>1)</sup>。これらの業績は 1986 年にノーベル医学・生理学賞を受賞している。これらの成長因子発見は、その後の成長因子研究の先駆けとなっており、様々な成長因子が同定されヒト生命現象に重要な示唆を与え続けている。唾液腺に関しても多数の成長因子が発見されており、線維芽細胞成長因子 fibroblast growth factor (FGF)<sup>2)</sup>、肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF)<sup>3)</sup> など数十にのぼる<sup>4)</sup>。このように多数の成長因子を産生する唾液腺は、当然、その産生物である唾液中にも多数の成長因子が含まれていることが明らかとなっている。興味深いことに、唾液中の EGF は胃酸を抑制する作用が報告されており<sup>5)</sup>、口腔の創傷の治癒の促進だけでなく胃に影響を及ぼしている。さらに、舌下部からの EGF 投与で脳をはじめとして全身の諸臓器に移行することが知られている<sup>4)</sup>。また、NGF においては舌下部からの連続投与を行うと副腎皮質の肥大が生じ、唾液腺 NGF の標的臓器は副

腎皮質が有力であることが示唆されている<sup>6)</sup>。また、唾液の機能は口腔の健康維持であり、唾液腺は積極的に様々な物質を産生し、唾液中に多数の活性物質を分泌している。特に、分泌型 IgA、リゾチーム、ラクトフェリン lactoferrin (以下, LF) などの抗菌物質は感染予防に重要である。粘膜保護としてはムチン、重炭酸塩緩衝系による pH の維持は齶蝕抑制に貢献するなど多数の役割が存在している。しかし、前述したように、これまでの NGF や EGF の研究から唾液腺産生物質が、口腔だけでなく遠隔臓器に作用し全身へ影響を与えている可能性が考えられる。この可能性の実証は、唾液腺の健康科学的意義を高めることにつながり、高齢化社会における健康長寿の実現に結びついていくことは疑いない。

当教室では、唾液腺は唾液を介して全身へ影響を与えることのできる臓器であるとの仮説に基づき、唾液腺の新たな機能の発見に向けた研究を行ってきた。特に、NGF ファミリーの一つで、NGF に続いて発見された脳由来神経栄養因子 brain derived neurotrophic factor (以下, BDNF) に注目し、ストレス時唾液腺に発現後、唾液腺依存性に血中 BDNF が増加し、副腎髄質に影響を及ぼしている可能性を報告してきた<sup>7)</sup>。さらに、近年腸管から吸収された LF は、リンパ管を經由して循環血液中へ移行し神経組織に到達後作用し、その健康科学的な意義が注目されている<sup>8)</sup>。しかし、LF は唾液中に含まれ口腔の健康維持に重要な物質であるが、唾液ラクトフェリン saliva lactoferrin (以下, sLF) の全身への影響についてはこれまで検討されていない。

LF は、1939 年 Sorensen らにより、鉄結合能の強い赤い蛋白質としてミルクから発見された<sup>9)</sup>。LF は、分子量約 80,000 の糖タンパクであり、ローブと呼ばれる 2 つのドメインからなる構造を持ち、N ローブ、C ローブの各ドメインはそれぞれ、1 分子の鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) をキレート結合することができる。この結合は強く、血液中の鉄結合性蛋白質であるトランスフェリン transferrin (Tf) より強い<sup>10)</sup>。ヒトにおける分布は、初乳、唾液、涙液などの外分泌腺から産生される液体に広く分布している。また、炎症細胞の一つである好中球の特異的な顆粒にも含まれている。これらの分泌液中の LF の役割は、主に感染防御であり、好中球からの LF の影響を含め、鉄のキレート作用による細菌の生存に必要な鉄を消費することで静菌作用を示す<sup>11)</sup>。

LF には、局所における感染防御だけでなく、抗炎症作用<sup>12)</sup>、抗酸化作用<sup>13)</sup>、内臓脂肪低減作用<sup>14)</sup>、抗癌作用<sup>15)</sup>など多機能を有することが報告されており、さらに近年では、LF の放射線防護作用に関する報告もされ<sup>16)</sup>、LF が注目されている所以である。また、LF は血液脳関門を通過することが示されており<sup>17-19)</sup>、ストレス負荷に対する不安行動が LF の投与により、 $\mu$ -オピオイド受容体を活性化することにより改善することが報告されている<sup>20)</sup>。同様の機序により鎮痛効果が認められモルヒネの効果を増強させる作用がある<sup>9)</sup>。さらに、アルツハイマーにおけるアミロイド斑部には、鉄の蓄積が認められ原因の一つと考えられている<sup>21)</sup>。このフェントン反応により産生されたヒドロキシルラジカル hydroxyl radical (以下、 $\text{HO}^{\cdot}$ ) が神経細胞を傷害している可能性がある。こ

のフェントン反応を阻害するのが LF であり，脳神経細胞における LF の  $\text{HO}^{\cdot}$  消去能は，LF の重要な役割の一つかもしれない。

このように，外分泌腺から産生される LF は，主として局所作用を示し，血中における LF は，様々な臓器に移行し多様な作用を示しているものと思われる。この血中 LF は，主に腸管からの吸収により濃度を維持していると考えられている。特に初乳中には，5-10mg/ml も含まれており乳児では 1 日 1g 以上も腸管から吸収されており<sup>22)</sup>，乳児の健康に極めて重要な役割がある。この LF は，熱やペプシンによる分解に弱く，離乳後の胃酸が分泌される段階に入ると，腸管からの吸収量が激減することから，成人に対してはサプリメントとして腸溶解性のカプセルを用いた LF の投与について関心が強い<sup>23)</sup>。

一方，唾液腺では，sLF を継続的に産生し唾液として排出している。当教室では，これまで唾液腺産生物質の全身への影響を検討してきたが，全身への移行経路として舌下部が有力であることを示してきた<sup>24)</sup>。すなわち，口腔底粘膜は菲薄な非角化上皮で被われ血管に富む<sup>4)</sup>ことから，ニトログリセリンの一般的な投与部位であり，初回通過効果を受けず即効性が期待できる投与経路である。sLF がこの舌下からの経路より全身に移行している可能性が考えられる。また，前述したように，EGF は舌下部からの投与経路で脳に集積することがラジオアイソトープを用いた検討で報告されている<sup>25)</sup>。

本研究では，唾液腺の摘出により血中および脳内ラットラクトフェリン rat lactoferrin (以下，rLF) 濃度に及ぼす影響を解析した。また，LF の舌下部か

らの吸収に着目し，実験的に麻酔下で，舌下部にウシラクトフェリン bovine lactoferrin（以下，bLF）を投与し，投与後 5 分，15 分，30 分における脳内 bLF 濃度の経時的変化を測定した．さらには，bLF のスーパーオキシド superoxide（以下， $O_2^{\cdot-}$ ）および  $HO^{\cdot}$  の消去率を電子スピン共鳴 electron spin resonance（以下，ESR）により測定した．以上 3 つの実験系より，LF の舌下からの吸収による全身の健康への意義を明らかにすることを目的とした．

## 実験材料および方法

本研究における動物実験はすべて、神奈川歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

### 1. 舌下からの sLF 吸収経路の検討

#### 1) 大唾液腺の摘出

本実験では、舌下からの sLF の吸収経路を検討するために、ラットにペントバルビタールナトリウム (65mg/kg ; 共立製薬株式会社, 東京, 日本) を腹腔内に注入し、麻酔による鎮静を確認後、顎下部に 2cm の皮膚切開を施し、両側の唾液腺を周囲の皮下脂肪組織から分離後に除去し、大唾液腺摘出 (以下, 摘出) モデルラットを作製した<sup>26)</sup>。

#### 2) 実験動物

Wistar ラット (日本クレア株式会社, 東京, 日本) , オスを使用した。ラットは固形飼料と水を自由に摂ることができる環境で、12 時間ごとに明暗を繰り返す、温度 22±3°C 条件の下において飼育した。摘出 1 週間後群、摘出 2 週間後群および非摘出群 (control) の 3 群に分けた (各群 n=5) 。摘出 1 週間後群は 6 週齢時に、摘出 2 週間後群は 5 週齢時に摘出し、各群 7 週齢時 (体重 180-220g) にサンプリングした。

#### 3) サンプリング

ラットにペントバルビタールナトリウム (65mg/kg ; 共立製薬株式会社, 東京, 日本) を腹腔内に注入し、麻酔による鎮静を確認後、開胸しシリンジ (18G 注

射針；テルモ株式会社，東京，日本）で心臓から採血した．採取した血液については，血漿は抗凝固剤（EDTA-2Na）を，血清は血清分離培地を含むベノジェクト®II真空採血管（テルモ株式会社，東京，日本）に各々分注した．前者は，5回転倒混和し，30分間氷冷の後， $1,000\times g$ ，15分， $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離した．後者は，室温にて2時間置いた後， $1,000\times g$ ，20分， $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離した．採血後は，断頭し頭蓋骨を剥離後，全脳を摘出し，直ちに液体窒素で凍結した．これらのサンプリングの時間帯はすべて，午前9時から正午の間に統一した．なお，rLF濃度測定まですべての試料は， $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した．

#### 4) rLF濃度測定

血中および脳内rLF濃度は，酵素標識イムノソルベント検定法 enzyme-linked immunosorbent assay（以下，ELISA）で定量化した．キットには，ELISA kit for rat lactoferrin（Uscn life science Inc.，Wuhan，P.R. China）を使用した．

$-80^{\circ}\text{C}$ で保管した脳は，凍結粉碎装置（クライオプレス；株式会社マイクロテック・ニチオン，千葉，日本）で粉碎した．その後，1% Triton® X-100（和光純薬工業株式会社，大阪，日本）とジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した1mMのフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）を添加したリン酸緩衝生理食塩水（PBS；0.01M，pH7.2-7.4，和光純薬工業株式会社，大阪，日本）内に混和し， $10,000\times g$ ，15分， $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し，上清を採取した．

ELISAは付属の添付文書に従い，次の通り行った．各ウェルに， $100\mu\text{l}$ のスタンダード溶液と試料を加え， $37^{\circ}\text{C}$ で2時間置いた．その後，各ウェル内の溶

液を処分し、2倍希釈した100 $\mu$ lのDetection Reagent Aを各ウェルに加え、37°Cで1時間置いた。各ウェル内の溶液を処分し、350 $\mu$ lの洗浄溶液で3回洗浄し、2倍希釈した100 $\mu$ lのDetection Reagent Bを各ウェルに加え、37°Cで30分間置いた。各ウェル内の溶液を処分し、350 $\mu$ lの洗浄溶液で5回洗浄し、90 $\mu$ lのTMB含有の基質・発色剤溶液を各ウェルに加え、遮光し37°Cで20分間置いた。各ウェルに50 $\mu$ lの反応停止溶液を加え、吸光度をマイクロプレートリーダー（Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA）を用いて、450nmの波長で測定した。

## 2. bLF 舌下投与による脳内 bLF 濃度の測定

### 1) 実験動物

Wistar ラット（日本クレア株式会社，東京，日本），オス 7 週齢（体重 200-250g）を使用した。飼育条件は方法 1-2)と同様である。

### 2) 実験材料

舌下投与には、bLF 粉末（MW. 90kDa；LKT Laboratories, Inc., St. Paul, MN, USA）を使用した。control にはウシ血清アルブミン bovine serum albumin 粉末（以下、BSA；MW. 66kDa；Sigma, St. Louis, MO, USA）を使用した。

### 3) サンプリング

麻酔下で、bLF 粉末 5mg を舌下投与し、control には BSA 粉末 5mg を舌下投与した（各群 n=5）。投与後 5 分、15 分、30 分にて、方法 1-3)と同様に全脳を

抽出し，保管した。

#### 4) bLF 濃度測定

脳内 bLF 濃度は ELISA で定量化した。キットには，bovine lactoferrin ELISA quantitation set (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) を用いた。すべての試料の上清は，方法 1-4) と同様に採取した。

ELISA は付属の添付文書に従い，次の通り行った。ヤギ抗 bLF 抗体（一次抗体）を  $100\ \mu\text{l}$  のコーティングバッファー（炭酸-重炭酸塩； $0.05\text{M}$ ， $\text{pH}9.6$ ）に希釈溶解し，それを各ウェルに  $100\ \mu\text{l}$  加え，室温で 1 時間置いた。各ウェル内の溶液を処分し，洗浄溶液（ $50\text{mM}$  Tris， $0.14\text{M}$  NaCl， $0.05\%$  Tween 20， $\text{pH}8.0$ ）で 5 回洗浄し，各ウェルに  $200\ \mu\text{l}$  のブロッキング溶液（ $50\text{mM}$  Tris， $0.14\text{M}$  NaCl， $0.05\%$  Tween 20， $\text{pH}8.0$ ）を加え，室温で 30 分間置いた。各ウェル内の溶液を処分し，洗浄溶液で 5 回洗浄し，各ウェルに  $100\ \mu\text{l}$  のスタンダード溶液と試料を加え，室温で 1 時間置いた。各ウェル内の溶液を処分し，洗浄溶液で 5 回洗浄し，各ウェルに HRP を結合したヤギ抗 bLF 検出抗体（二次抗体）を  $100\ \mu\text{l}$  加え，室温で 1 時間置いた。各ウェル内の溶液を処分し，洗浄溶液で 5 回洗浄し，各ウェルに TMB 含有の基質・発色剤溶液を  $100\ \mu\text{l}$  加え，遮光して室温で 15 分間置いた。各ウェルに  $100\ \mu\text{l}$  の反応停止溶液（ $0.18\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ ）を加え，方法 1-4) と同様に吸光度を測定した。

### 3. ESR による bLF の抗酸化能測定 (*in vitro* 試験)

$O_2^{\cdot -}$  は, 過酸化水素 (以下,  $H_2O_2$ ; 3.0%) 存在下における二酸化チタン (以下,  $TiO_2$ ; アナターゼ型, 0.3 重量%) に紫外線 ( $100mW/cm^2$ , 1 分) を照射することで生じる光触媒作用により発生させた.  $HO^{\cdot}$  は,  $H_2O_2$  (100mM) に対して紫外線 ( $100mW/cm^2$ , 10 秒) を照射することで生じる  $H_2O_2$  光分解反応を用いて発生させた. なお, これら活性酸素検出は, 特異的スピントラップ剤である CYPMPPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide) を用いて各 ESR スピンアダクトを検出した<sup>27)</sup>. CYPMPPO は  $O_2^{\cdot -}$  検出には 5.0mM,  $HO^{\cdot}$  検出には 1.0mM で用いた. ESR 測定は, JES-REX1 (日本電子株式会社, 東京, 日本) を用い, 測定条件は以下の通りとした. マイクロ波出力: 8.00mV, 磁場掃引幅: 335.5mT, 磁場変調: 0.079mT, 掃引時間: 1.0min, 応答時間: 0.03sec, bLF 濃度: 100  $\mu$ M. 測定は各 3 回行った.  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HO^{\cdot}$  消去能は, bLF 非存在下 (control) の ESR スピンアダクトのシグナル強度を 100%とし, 上記活性酸素種発生系に bLF を添加し, 得られた ESR スピンアダクトの control におけるシグナル強度の平均値を 100 として指数化し, 消去活性の評価を行った.

### 4. 統計解析

統計解析には, SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用した. 方法 1 および 2 に関しては, Kruskal-Wallis 検定を行い, そこで有意差がある場合には, 多重比較として Mann-Whitney U 検定後, Bonferroni 法を用

いた。方法 3 に関しては，Student の t 検定を行った。すべての統計解析において， $P < 0.05$  の場合を統計学的に有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 摘出による血中および脳内 rLF 濃度への影響

#### 1) 血中 rLF 濃度

血漿中（図 1 (A)）および血清中（図 1 (B)）の rLF 濃度は、control と比較し摘出 1 週間後で有意に減少し、摘出 2 週間後では摘出 1 週間後と比較し有意に増加した（\*  $P < 0.01$ ）。

中央値は以下の通りである。図 1 (A) control: 301.34ng/ml, 摘出 1 週間後: 114.40ng/ml, 摘出 2 週間後: 262.81ng/ml. 図 1 (B) control: 283.43ng/ml, 摘出 1 週間後: 123.85ng/ml, 摘出 2 週間後: 277.51ng/ml.

#### 2) 脳内 rLF 濃度

control と比較し摘出 1 週間後で有意に rLF 濃度が減少し（\*\*  $P < 0.05$ ），摘出 2 週間後で増加傾向を示した（図 1 (C)）。

中央値は以下の通りである。control: 332.33ng/g, 摘出 1 週間後: 275.13ng/g, 摘出 2 週間後: 315.01ng/g.

### 2. bLF 舌下投与による脳内 bLF 濃度の経時的変化

control では脳内 bLF の検出は認められず、bLF 舌下投与後 5 分および 15 分において、control と比較し有意に bLF 濃度が増加し、その濃度は経時的に減少傾向を示した。脳内 bLF 濃度は、control と 5 分、control と 15 分との間にそれぞれ有意差が認められた（\*  $P < 0.05$ ）（図 2）。

中央値は以下の通りである。control: 0ng/g, 5分: 3.37ng/g, 15分: 2.87ng/g,  
30分: 1.80ng/g.

### 3. bLF の抗酸化能測定

本実験により典型的な ESR スピンアダクトが得られた (図 3 (A) , 図 4 (A) ) .  
 $O_2^{\cdot -}$  に対する消去能は, control と bLF の間に有意差は認められなかった (図 3  
(B) ) .  $HO^{\cdot}$  に対する消去能は, control と bLF の間に有意差が認められた (\*P  
<0.01) (図 4 (B) ) .

グラフは, 平均値±標準偏差を示す. 数値は以下の通りである. 図 3 (B)  
control:  $100.00 \pm 1.24$ , bLF:  $103.74 \pm 2.44$ . 図 4 (B) control:  $100.00 \pm 0.83$ ,  
bLF:  $58.44 \pm 1.09$ .

## 考 察

LFは感染防御因子であり、口腔における局所の感染防止に他の抗菌因子と伴って貢献している。しかし、LFは口腔だけではなく、全身諸臓器においても検出される物質であり、多機能な役割を示し全身の健康にも重要な意義が報告されている<sup>28)</sup>。また、老化や様々な疾患の発症にも関与すると考えられているH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する産生能を抑制することが認められ<sup>29)</sup>、非常に注目されている。このように全身におけるLFの作用は、循環系による輸送により行われており、血中LFの動態は重要である。また、これまで好中球からの放出<sup>9)</sup>や腸管からの吸収<sup>8)</sup>が、その主たる起源と考えられてきたが、唾液腺の関与については充分明らかになっていない。著者の研究室では、これまで、唾液腺産生物質が血中濃度に影響することを報告し、唾液腺が全身に影響を与えることができる臓器であることを示してきた<sup>7, 24, 26)</sup>。また、LFが唾液腺から産生され、唾液中には血漿濃度より高く含まれていることに注目した<sup>22)</sup>。そこで、摘出モデルにおいて、血中濃度に影響するかどうかを検討したところ、摘出1週間後にcontrolと比較して有意に血中rLF濃度は減少した。LFは、様々な臓器で産生されることが報告されており、主には膵臓、肝臓、涙腺、唾液腺などの外分泌腺であり、これらの腺組織から産生される液体はLFを含んでいる<sup>11)</sup>。また、膵液は最も多くLFを含んでおり、膵液中のLFは、小腸のLFレセプターを介してトランスポートし血中に移行していることが考えられる。また、慢性膵炎<sup>30)</sup>や細菌感染症でも血中LFは増加するが、この場合は好中球に含まれるLFの放出が重要な役

割を果たしている」と報告されている<sup>9)</sup>。本研究では、これまでの知見に加え、唾液腺が血中濃度に影響を与える臓器であることを初めて示した。しかし、摘出2週間後では、血液中の rLF 濃度は control と同様のレベルに回復している。本研究結果は、LF の血中濃度維持のために補償する機構の存在が示唆され、LF の生体における重要性が示され興味深い。このメカニズムについて、好中球の増加や腭液の増加が生じているか等の検証が今後必要である。

次に、摘出モデルにおいて脳内 rLF 濃度を検討したところ、摘出1週間後では、control と比較して有意に rLF 濃度の減少を認めた。さらに、摘出2週間後では control と同様のレベルに回復しており、血液中の rLF の動態と同様の挙動を示した。脳を検討した理由は、<sup>125</sup>I 標識 EGF を用いて舌下部より投与し、全身における分布を検討した報告では、投与直後に頭部に集積することが認められており<sup>4)</sup>、舌下部の投与が脳への影響が強いことが考えられたからである。さらに、脳における LF の意義は、近年アルツハイマー病に鉄の蓄積が関与していることが認められ<sup>21)</sup>、この鉄の除去にキレート作用の強い LF が重要な役割を果たすことが示されており<sup>29)</sup>、脳における LF の抗酸化能が注目されている。また、小腸から吸収された LF は、小腸上皮から取り込まれリンパ系を介し血液に移行する<sup>8)</sup>。その後、脈絡叢から脳実質に到達する経路が報告されており<sup>18)</sup>、鎮痛作用や抗ストレス作用が明らかとなっている。このような作用は、LF が血液脳関門を通過し、神経細胞に到達することで発現されることから、神経変性疾患の予防への期待も高まっている<sup>11)</sup>。本研究から、唾液腺の摘出で脳内 LF

が減少したことから、唾液腺で産生された LF は、舌下部から血管網に移行し、血液を介して脳内 LF 濃度に影響を与えている可能性が示唆された。

近年、LF の様々な生物作用に興味を持たれサプリメントとして応用することが期待されてきた。特に LF を効率よく小腸で吸収させるために、腸溶性 LF の開発が行われ製品として販売されている。本研究では、ラット舌下部に bLF を投与し、脳内における bLF 濃度を検討し、外来性 LF の意義を検討した。その結果、bLF は投与後 15 分まで control と比較し、脳内 bLF 濃度は有意に増加した。

しかし、投与後 30 分で control レベルまで減少した。このことより、外来性に LF をサプリメントとして摂取させる場合は、組織内での滞在時間が短く充分効果は期待できないかもしれない。しかし、唾液腺による sLF 産生は持続的であり、唾液を介して脳内 LF 濃度に影響していると考えられ、sLF の意義は、口腔における感染防御だけでなく、遠隔臓器へも影響している可能性が示唆された。

最後に、活性酸素種の中でも  $\text{HO}^\cdot$  は極めて反応性が高いラジカルであり、活性酸素種による多くの生体損傷は  $\text{HO}^\cdot$  によるものとされ、ヒトでは  $\text{HO}^\cdot$  に対する直接的な抗酸化酵素などを合成しないことが知られている<sup>31)</sup>。この  $\text{HO}^\cdot$  が生体内で生成される反応は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と鉄イオンとの相互作用によるフェントン反応として広く知られている<sup>32)</sup>。この反応系に対して LF は、生体内で鉄イオンや銅イオンなどの金属イオンが過剰に存在する場合、LF の強力なキレート作用により金属イオンを取り除くことで、 $\text{HO}^\cdot$  の産生を間接的に抑制すると考えられる<sup>29)</sup>。本研究では、ESR により、LF の活性酸素消去能を検討した。特に、本法

では鉄を介した  $\text{HO}\cdot$  の消去系ではなく、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の光分解を利用した反応により  $\text{HO}\cdot$  を発生させた事から、これまで報告されていた鉄をキレート作用により枯渇させ、 $\text{HO}\cdot$  の発生を抑制するだけでなく、LF には直接的な  $\text{HO}\cdot$  消去作用があることが示唆される結果であり興味深い。また、これまで生体内では  $\text{HO}\cdot$  消去物質は合成されない事が知られて来たが、LF は生体内で合成する事が可能<sup>28)</sup>であり、新たな  $\text{HO}\cdot$  消去物質として重要な役割をも演じる可能性があるため、内因性物質としての作用のみならず、外因性物質としての作用を含め、今後さらなる LF の作用メカニズムの詳細を検討する必要がある。

## 結 論

本研究は、LF の舌下からの吸収に着目し、以下の 3 つの実験系を行った。

1. 唾液腺の摘出による sLF 濃度変化が血中および脳内 rLF 濃度に及ぼす影響。
2. 舌下部への bLF 投与による脳内 bLF 濃度の経時的変化。
3. ESR による bLF の抗酸化能の測定。

上記 3 つの実験系から以下の結果が得られた。

1. 摘出 1 週間後の血中および脳内 rLF 濃度は、control と比較し有意に減少した。
2. bLF 舌下投与後 5 分および 15 分において、control と比較し有意に bLF 濃度の増加を認め、その濃度は経時的に減少傾向を示した。
3. control と比較し、bLF の  $\text{HO}^\cdot$  に対する有意な消去能を認めた。

以上の点から、LF の舌下からの吸収は、脳において抗酸化能を発揮する可能性が考えられ、全身の健康への貢献が示唆された。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり，多くのご指導をいただきました神奈川県立歯科大学大学院口腔科学講座環境病理学分野 槻木恵一教授に，深く感謝申し上げます。

また，論文作成に終始ご協力いただきました神奈川県立歯科大学大学院唾液腺健康医学分野 猿田樹理准教授ならびに東雅啓特任助教に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，多くのご助言をいただきました神奈川県立歯科大学大学院口腔科学講座光歯科医学分野 吉野文彦准教授ならびに吉田彩佳特別研究員に深く感謝申し上げます。

## 文 献

1. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. **72**(4): 1317-1321, 1975.
2. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*. **109**(1):1-6, 1989.
3. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. **122**(3):1450-1459, 1984.
4. 天野 修, 井関尚一. 唾液腺における細胞増殖因子の発現と局在. *解剖誌*. **76**(2):201-212, 2001.
5. Sarosiek J, Bilski J, Murty VL, Slomiany A, Slomiany BL. Role of salivary epidermal growth factor in the maintenance of physicochemical characteristics of oral and gastric mucosal mucus coat. *Biochem Biophys Res Commun*. **152**(3):1421-1427, 1988.
6. Aloe L, Alleva E, Böhm A, Levi-Montalcini R. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**(16):6184-6187, 1986.

7. Kondo Y, To M, Saruta J, Hayashi T, Sugiyama H, Tsukinoki K. Role of TrkB expression in rat adrenal gland during acute immobilization stress. *J Neurochem.* **124**(2):224-232, 2013.
8. Takeuchi T, Jyonotsuka T, Kamemori N, Kawano G, Shimizu H, Ando K, Harada E. Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats. *Exp Physiol.* **91**(6):1033-1040, 2006.
9. 原田悦守, 竹内 崇. 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鎮痛作用, *ペインクリニック*, **26**(3), 真興交易株式会社医書出版部, 東京, 359-368, 2005.
10. Rahman M, Kim WS, Kumura H, Shimazaki K. Bovine lactoferrin region responsible for binding to bifidobacterial cell surface proteins. *Biotechnol Lett.* **31**(6):863-868, 2009.
11. 原田悦守, 竹内 崇. ミルク含有ラクトフェリンの体内移行とその新規多様機能の発見, *医学のあゆみ*, **218**(5), 医歯薬出版株式会社, 東京, 396-402, 2006.
12. Hartog A, Leenders I, van der Kraan PM, Garssen J. Anti-inflammatory effects of orally ingested lactoferrin and glycine in different zymosan-induced inflammation models: evidence for

synergistic activity. *Int Immunopharmacol.* **7**(13):1784–1792, 2007.

13. Burrow H, Kanwar RK, Kanwar JR. Antioxidant enzyme activities of iron-saturated bovine lactoferrin (Fe-bLf) in human gut epithelial cells under oxidative stress. *Med Chem.* **7**(3):224–230, 2011.

14. Kushibiki S, Shingu H, Komatsu T, Itoh F, Moriya N, Touno E, Oshibe A, Hodate K. Influence of orally administered bovine lactoferrin on lipid metabolism in lipopolysaccharide-injected preruminant calves. *Anim Sci J.* **80**(3):258–264, 2009.

15. Zhang Y, Lima CF, Rodrigues LR. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev.* **72**(12):763–773, 2014.

16. Nishimura Y, Homma-Takeda S, Kim HS, Kakuta I. Radioprotection of mice by lactoferrin against irradiation with sublethal X-rays. *J Radiat Res.* **55**(2):277–282, 2014.

17. Qiao R, Jia Q, Hüwel S, Xia R, Liu T, Gao F, Galla HJ, Gao M. Receptor-mediated delivery of magnetic nanoparticles across the blood-brain barrier. *ACS Nano.* **6**(4):3304–3310, 2012.

18. Kamemori N, Takeuchi T, Sugiyama A, Miyabayashi M, Kitagawa H, Shimizu H, Ando K, Harada E. Trans-endothelial and trans-epithelial

- transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats. *J Vet Med Sci.* **70**(3):313-315, 2008.
19. Ji B, Maeda J, Higuchi M, Inoue K, Akita H, Harashima H, Suhara T. Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats. *Life Sci.* **78**(8):851-855, 2006.
20. Kamemori N, Takeuchi T, Hayashida K, Harada E. Suppressive effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats. *Brain Res.* **1029**(1):34-40, 2004.
21. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **13**(10):1045-1060, 2014.
22. 川上 浩. ラクトフェリンの生物活性と受容体, *化学と生物*, **30**(12), 株式会社国際文献社, 東京, 807-812, 1992.
23. Ono T, Morishita S, Fujisaki C, Ohdera M, Murakoshi M, Iida N, Kato H, Miyashita K, Iigo M, Yoshida T, Sugiyama K, Nishino H. Effects of pepsin and trypsin on the anti-adipogenic action of lactoferrin against pre-adipocytes derived from rat mesenteric fat. *Br J Nutr.* **105**(2):200-211, 2011.

24. Tsukinoki K, Saruta J, Muto N, Sasaguri K, Sato S, Tan-Ishii N, Watanabe Y. Submandibular glands contribute to increases in plasma BDNF levels. *J Dent Res.* **86**(3):260-264, 2007.
25. Purushotham KR, Offenmüller K, Bui AT, Zelles T, Blazsek J, Schultz GS, Humphreys-Beher MG. Absorption of epidermal growth factor occurs through the gastrointestinal tract and oral cavity in adult rats. *Am J Physiol.* **269**(6):G867-G873, 1995.
26. Saruta J, Iida M, Kondo Y, To M, Hayashi T, Hori M, Sato S, Tsukinoki K. Chronic stress induces neurotrophin-3 in rat submandibular gland. *Yonsei Med J.* **53**(6):1085-1092, 2012.
27. Yoshino F, Yoshida A, Wada-Takahashi S, Sugiyama S, Tokutomi F, Maehata Y, Miyamoto C, Komatsu T, Takahashi SS, Kobayashi K, Lee MC. Assessments of salivary antioxidant activity using electron spin resonance spectroscopy. *Arch Oral Biol.* **57**(6):654-662, 2012.
28. Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J Infect Chemother.* **20**(11):666-671, 2014.
29. Ambruso DR, Johnston RB Jr. Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J Clin Invest.* **67**(2):352-360, 1981.

30. Jin CX, Hayakawa T, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in chronic pancreatitis. *JOP*. **10**(3):237-241, 2009.
31. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. **70**(5): 257-265, 2012.
32. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med*. **1**(1):3-25, 1985.

## 付図説明

図 1 摘出による血中および脳内 rLF 濃度への影響（各群 n=5）。

(A) 摘出による血漿中 rLF 濃度への影響. control と比較し摘出 1 週間後で有意に rLF 濃度が減少し, 摘出 2 週間後では摘出 1 週間後と比較し有意に増加した (\* P<0.01) . 中央値は以下の通りである. control: 301.34ng/ml, 摘出 1 週間後: 114.40ng/ml, 摘出 2 週間後: 262.81ng/ml.

(B) 摘出による血清中 rLF 濃度への影響. control と比較し摘出 1 週間後で有意に rLF 濃度が減少し, 摘出 2 週間後では摘出 1 週間後と比較し有意に増加した (\* P<0.01) . 中央値は以下の通りである. control: 283.43ng/ml, 摘出 1 週間後: 123.85ng/ml, 摘出 2 週間後: 277.51ng/ml.

(C) 摘出による脳内 rLF 濃度への影響. control と比較し摘出 1 週間後で有意に rLF 濃度が減少し (\*\* P<0.05) , 摘出 2 週間後で増加傾向を示した. 中央値は以下の通りである. control: 332.33ng/g, 摘出 1 週間後: 275.13ng/g, 摘出 2 週間後: 315.01ng/g.

図 2 bLF 舌下投与により, 脳内に検出された bLF 濃度の経時的変化（各群 n=5）. control では脳内 bLF の検出は認められず, bLF 舌下投与後 5 分および 15 分において, control と比較し有意に bLF 濃度が増加し, その濃度は経時的に減少傾向を示した. 脳内 bLF 濃度は, control と 5 分, control と 15 分との間にそれぞれ有意差が認められた (\* P<0.05) . 中央値は以下の通りである.

control: 0ng/g, 5分: 3.37ng/g, 15分: 2.87ng/g, 30分: 1.80ng/g.

図 3

(A)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3.0%) 存在下における  $\text{TiO}_2$  (アナターゼ型, 0.3 重量%) に紫外線 ( $100\text{mW}/\text{cm}^2$ , 1 分) を照射することで生じる光触媒作用により発生させ得られた典型的な ESR スピンアダクト. 矢印 ( $\downarrow$ ) は, bLF の抗酸化能解析に用いた ESR スピンアダクトを示す.

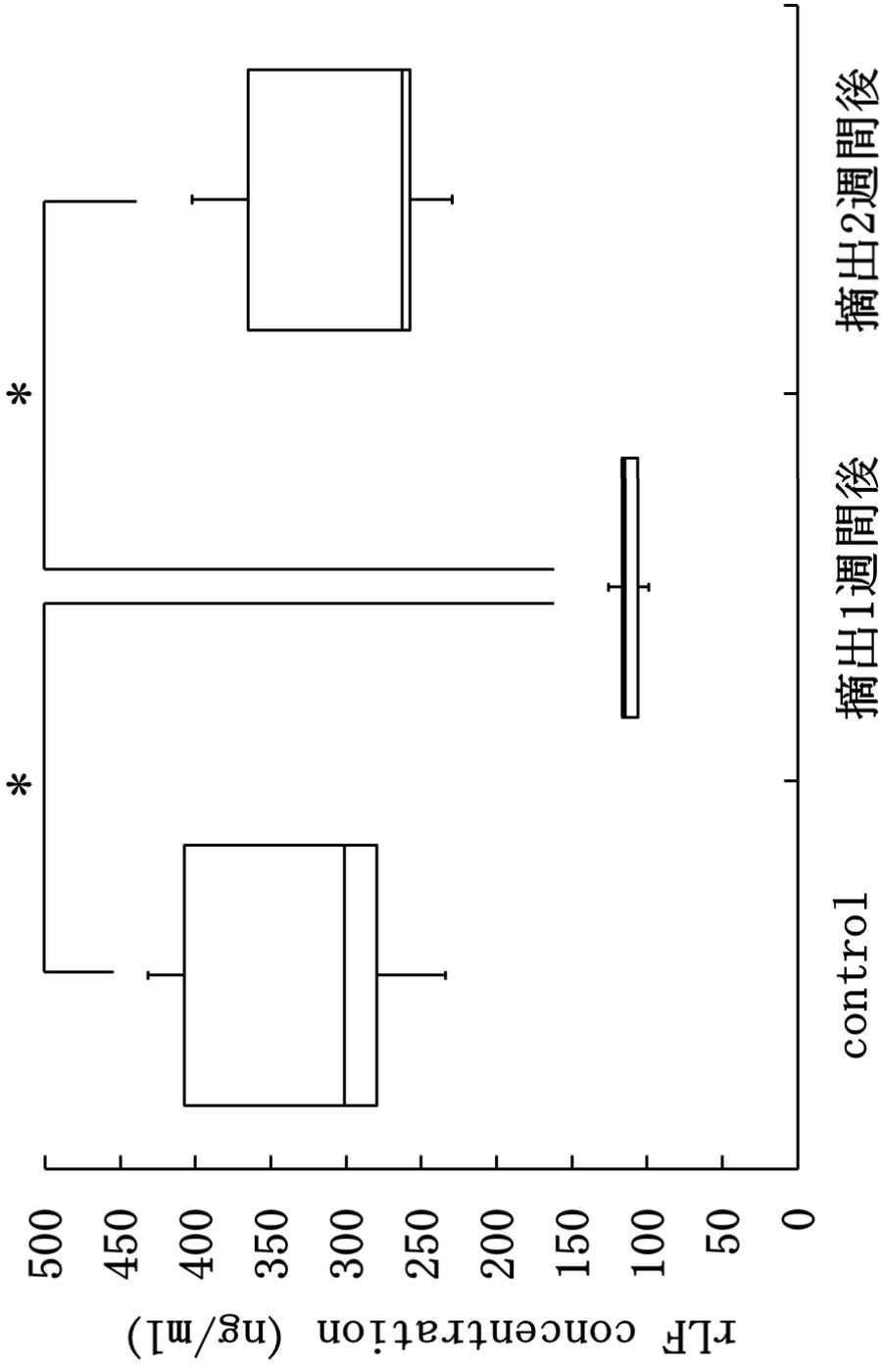
(B) bLF の  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対する消去能. グラフは, 平均値 $\pm$ 標準偏差を示す.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対する消去能は, control と bLF の間に有意差は認められなかった. 平均値 $\pm$ 標準偏差は以下の通りである. control:  $100.00 \pm 1.24$ , bLF:  $103.74 \pm 2.44$ .

図 4

(A)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100mM) に対して紫外線 ( $100\text{mW}/\text{cm}^2$ , 10 秒) を照射することで生じる  $\text{H}_2\text{O}_2$  光分解反応を用いて発生させ得られた典型的な ESR スピンアダクト. 矢印 ( $\downarrow$ ) は, bLF の抗酸化能解析に用いた ESR スピンアダクトを示す.

(B) bLF の  $\text{HO}^{\cdot}$  に対する消去能. グラフは, 平均値 $\pm$ 標準偏差を示す.  $\text{HO}^{\cdot}$  に対する消去能は, control と bLF の間に有意差が認められた (\* $P < 0.01$ ). 平均値 $\pm$ 標準偏差は以下の通りである. control:  $100.00 \pm 0.83$ , bLF:  $58.44 \pm 1.09$ .

図 1 (A)



\*  $P < 0.01$

図 1 (B)

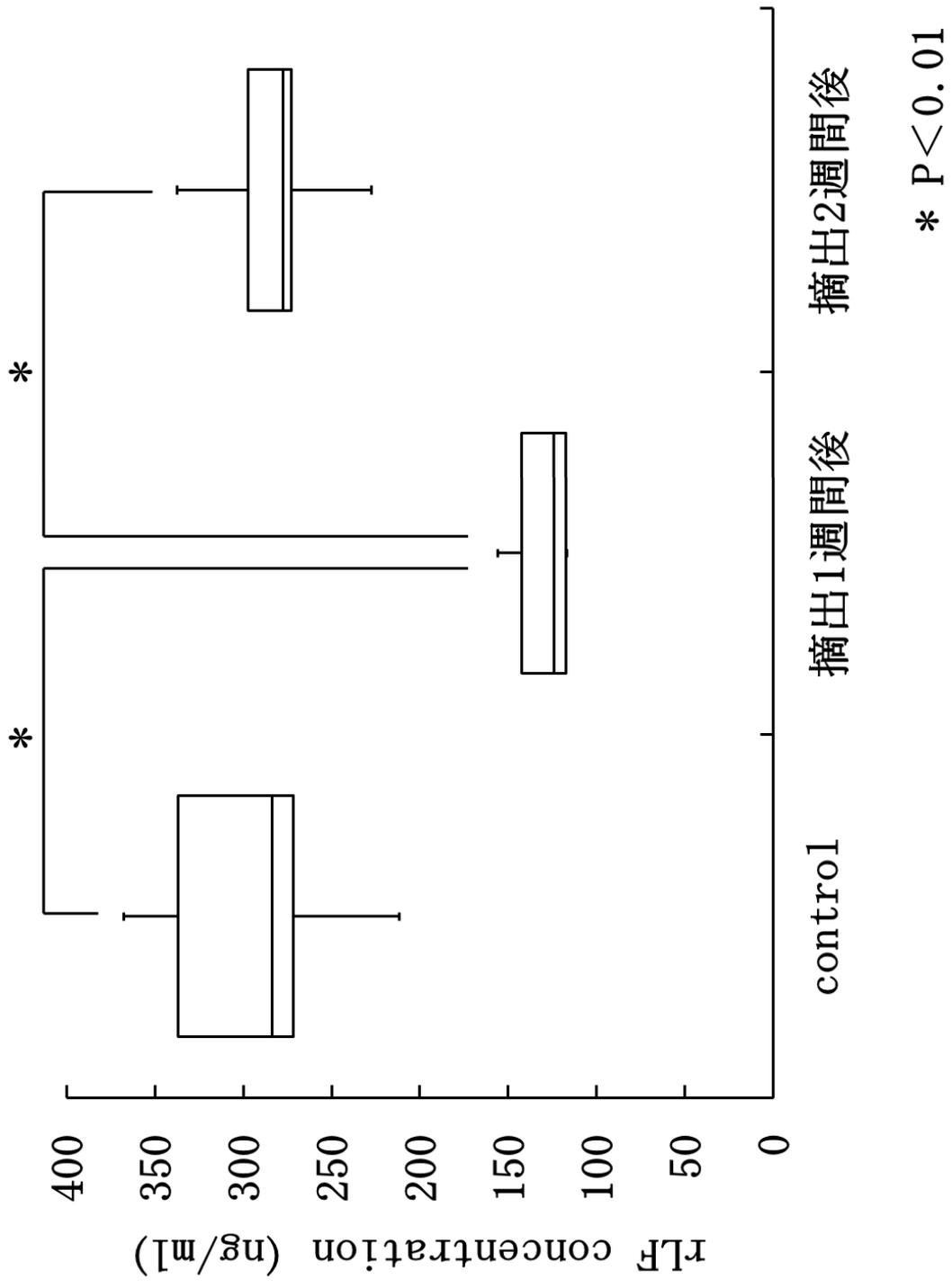


図 1 (C)

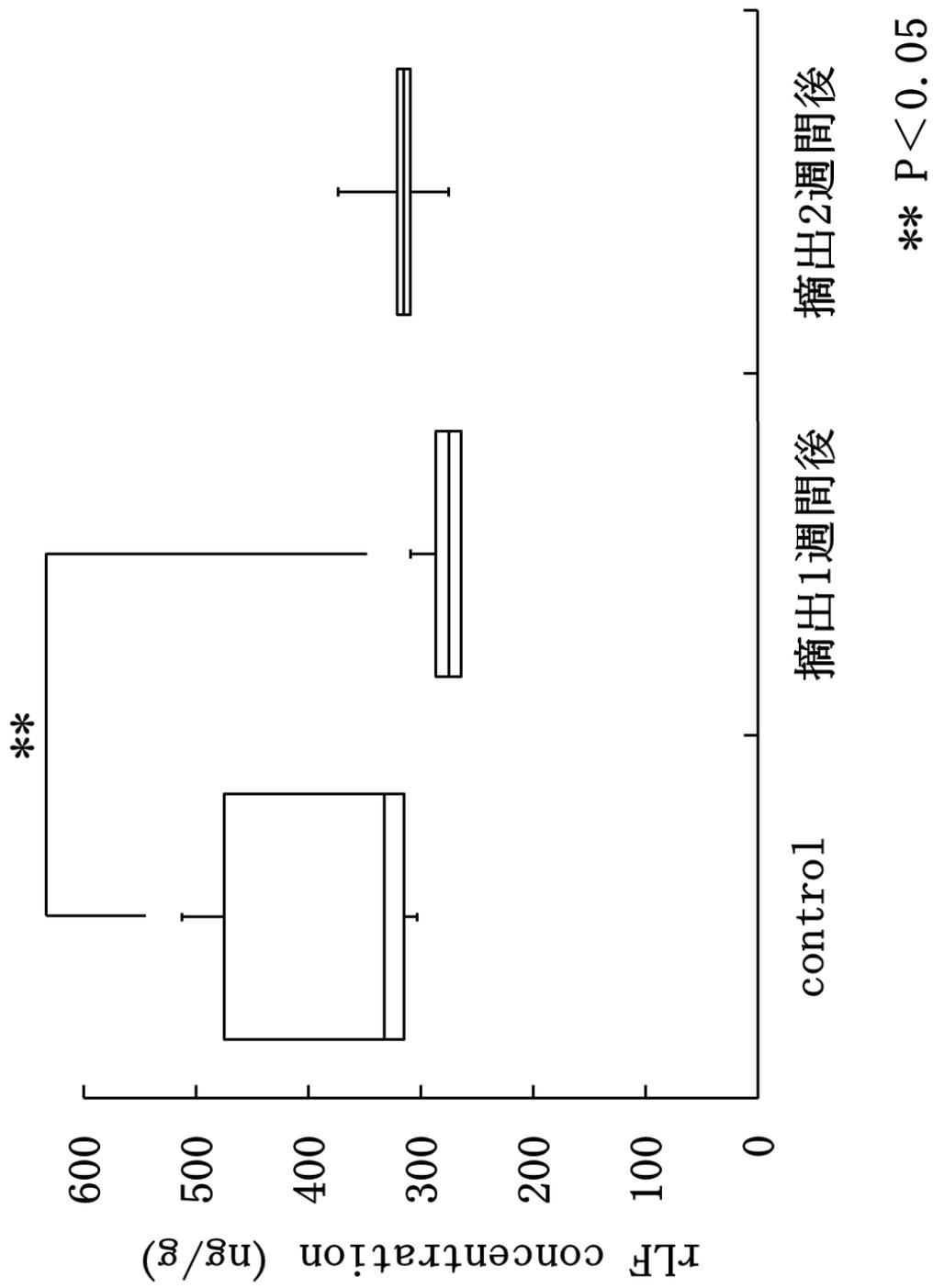
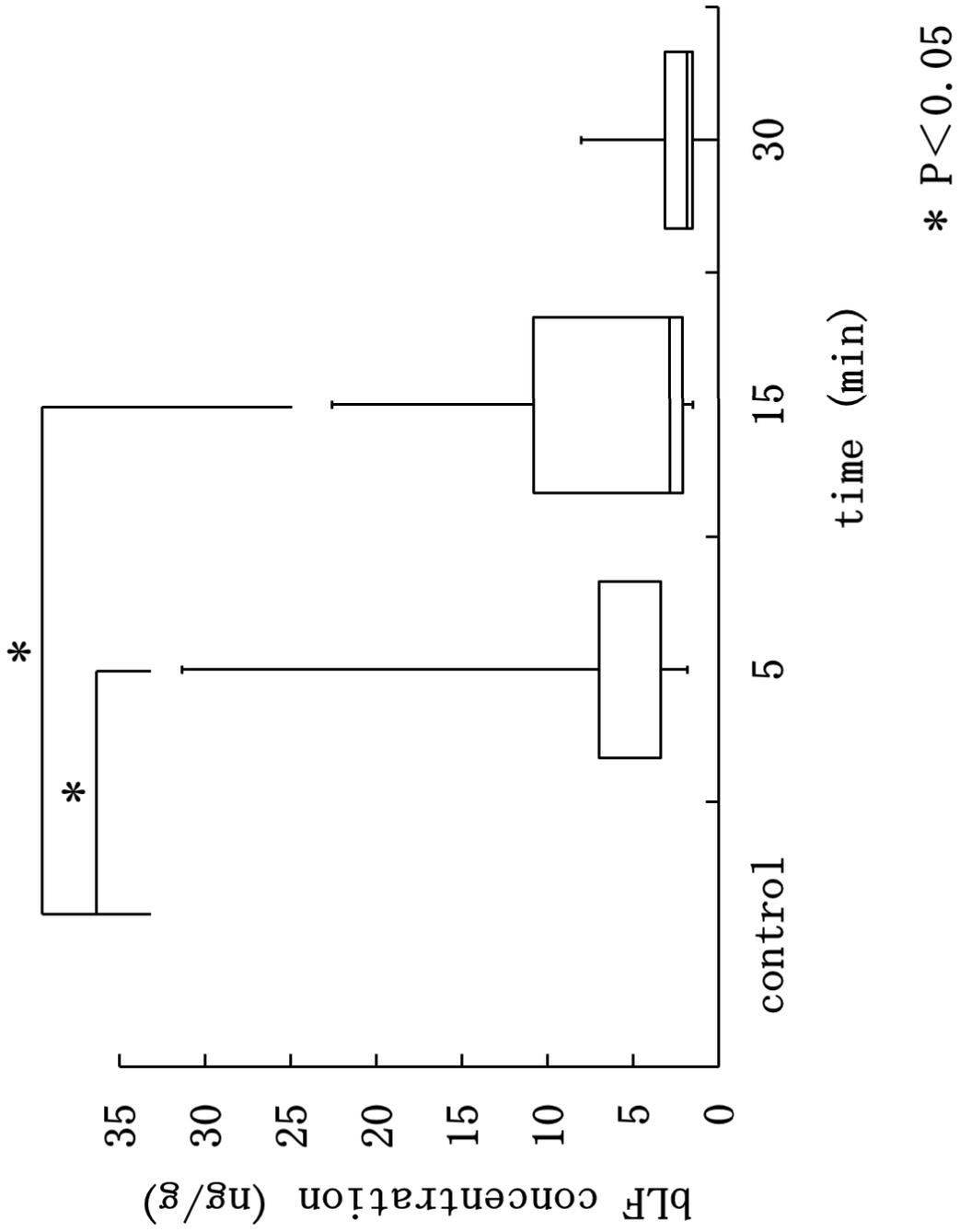
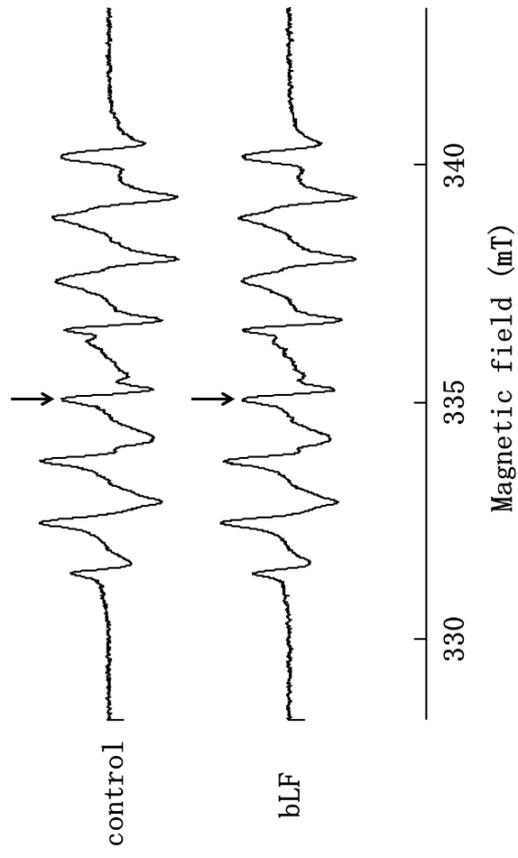


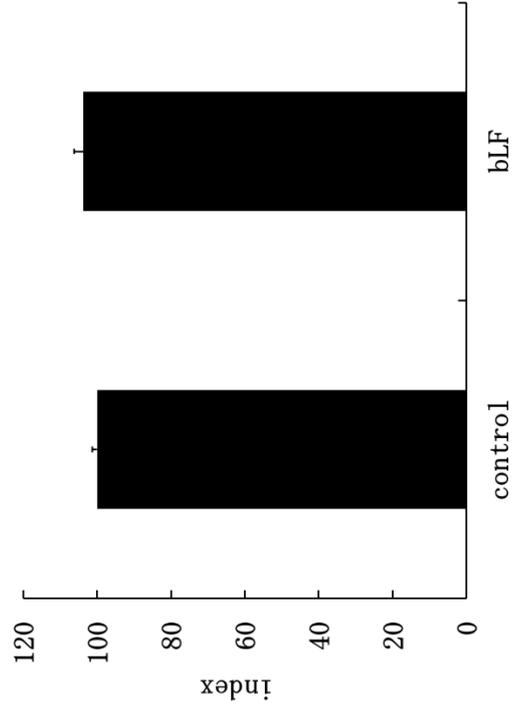
图 2



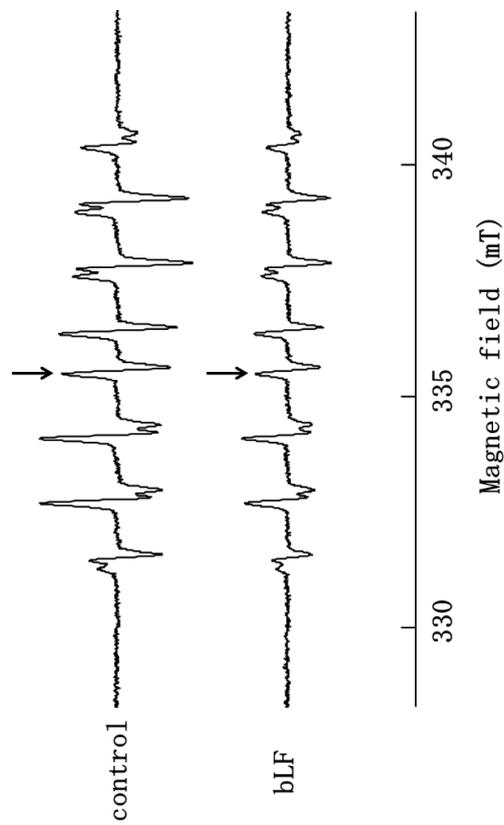
(A)



(B)



(A)



(B)

