

## ラクトフェリンの抗動脈硬化作用について

熊本大学医学部小児科 太田孝男  
森永乳業株式会社栄養科学研究所 梶川幹夫

### 【はじめに】

血清脂質レベルと動脈硬化性心疾患との関連は多くの疫学的研究から明らかである。最近、ミルク蛋白が血清脂質レベルに良い影響を与える事が報告されている。実際、母乳栄養児では脂肪摂取量が多いにもかかわらず、血清コレステロール値は上昇しない。これは、母乳の主要蛋白成分である乳清蛋白のコレステロール上昇抑制作用によると考えられている<sup>1, 2)</sup>。病理学的研究によれば、動脈硬化病変はマクロファージが変性LDLを取り込み泡沫細胞化する事からスタートする。そこで、私達は乳清蛋白がコレステロール上昇抑制作用のみならず、細胞レベルでの抗動脈硬化作用をも有している可能性を考え、マクロファージの変性LDLによる泡沫細胞化に対する乳清蛋白及び乳清蛋白に含まれる各種蛋白の影響について検討してみた。

### 【方 法】

乳清蛋白、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、ラクトフェリン及びラクトフェリン除去乳清蛋白は森永乳業株式会社より提供を受けた。LDLは超遠心法で正常血清より分離した。変性LDL [アセチル化LDL (Ac-LDL) 及び酸化LDL (Ox-LDL)] は定法に従い作成した<sup>3, 4)</sup>。

### マクロファージの泡沫細胞化及び各種蛋白の泡沫化に対する影響

ラット腹腔マクロファージをAc-LDL或いはOx-LDLと16時間インキュベーションして泡沫細胞を作成し、コントロールとした<sup>5, 6)</sup>。各種蛋白の泡沫細胞化に対する影響は最初から培養液中にそれぞれの蛋白を加えてインキュベーションを行い、細胞内に蓄積したコレステロールエステル (CE) 量を測定し、コントロールと比較

検討した。細胞内のコレステロール量は蛍光酵素法を用いて測定した<sup>7)</sup>。

### Ac-LDLのスキャベンジャーレセプターによる取り込み機構の解析

放射化ヨード標識LDLを用い定法に従い、マクロファージと標識LDLをインキュベーションし細胞との結合、細胞内での分解を検討した<sup>8)</sup>。

### 電気泳動

Pol-Eフィルムを用いてアガロース電気泳動を行った。

### 【結果と考察】

#### 1. 各種ミルク蛋白の細胞内コレステロール蓄積抑制作用（抗泡沫化作用）

ラットマクロファージをAc-LDLとインキュベーションすると細胞内CEは10倍程度増加する。図1Aに示すように、カゼイン或いは乳清蛋白(whey protein)はAc-LDL及びOx-LDLによる細胞内CEの蓄積を有意に抑制した。抑制作用は乳清蛋白の方が強力だった。そこで、本研究では乳清蛋白に焦点を絞り以下の検討を行った。

最初に蛋白としての構造が抗泡沫化作用に必要などうかを知るために加水分解しペプチドにした乳清蛋白の抗泡沫化作用を検討した。その結果、加水分解した乳清蛋白では細胞内CEの蓄積を抑制出来なかった(図1B)。周知の様に乳清蛋白は単一の蛋白ではなく、いくつかの蛋白からなっている。そこで私達はその主要蛋白である、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン及びラクトフェリンについて同様な実験を行った。図1Cに示すように $\beta$ -ラクトグロブリンには抗泡沫化作用は認められなかったが、 $\alpha$ -ラクトアルブミンには弱い抗泡沫化作用が見られた。両蛋白と異なりラクトフェリンには強力な抗泡沫化作用が認められた(図1D)。これらの結果から乳清蛋白の抗泡沫化作用はラクトフェリンによる可能性が大であると考えラクトフェリン除去乳清蛋白を用いて実験を行った。図2に示すように、ラクトフェリン含有量を減少させる事で乳清蛋白の抗泡沫化作用は有意に減弱した。この結果は、乳清蛋白の抗泡沫化作用の大部分はラクトフェリンによる事を示している。私達は次にラ

クトフェリンの抗泡沫化作用機序について検討してみた。

## 2. ラクトフェリンの抗泡沫化作用

マクロファージの泡沫化はスカベンジャーレセプターによる変性LDLの取り込みによって起こる。そこでAc-LDLのスカベンジャーレセプターによる取り込み機構に対するラクトフェリンの影響を調べてみた。図3A及びBに示すようにラクトフェリンはAc-LDLのマクロファージへの結合並びに細胞内での分解を強力に抑制した。スカベンジャーレセプターとAc-LDLの結合には荷電が関係している。周知の様にAc-LDLは陰性荷電が強く、ラクトフェリンは陽性荷電が強い。そこで、私達はラクトフェリンとAc-LDLを混ぜ、Ac-LDLのアガロース電気泳動での移動度を検討した。その結果、ラクトフェリンとAc-LDLは結合し移動度が減少していた。これは、ラクトフェリンがAc-LDLと結合し、Ac-LDLの陰性荷電が消失している事を示している。Ox-LDLを用いた場合もほぼ同様な結果が得られた。以上の結果からラクトフェリンは培養液中でAc-LDL或いはOx-LDLと結合し、その陰性荷電を奪うことでAc-LDL或いはOx-LDLのスカベンジャーレセプターへの結合を阻止している事が明らかになった。

本研究で私達は乳清蛋白特にラクトフェリンに強い抗動脈硬化作用がある事を初めて明らかにした。生体内で生理的にラクトフェリンが抗動脈硬化的に作用しているかどうかについては不明であるが、血液中には $0.2-1.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のラクトフェリンが存在している。生体内での変性LDLの量は血液中には検出できない程度であるので、実際にラクトフェリンが動脈硬化病変の進展を防止する様に働いている可能性は充分あると私達は考えています。

### 【参考文献】

1. Sautier C, Dieng K, Flament C, et al. Br. J. Nutr. 49 : 313-319, 1983.
2. Nagaoka S, Kanamaru Y, and Kuzuya Y. Agric. Biol. Chem. 55 : 813-818, 1991.
3. Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

73 : 3178-3182, 1976.

4. Yokode M, Kita T, Kikawa Y, et al. J. Clin. Invest. 81 : 720-729, 1988.

5. Ohta T, Nakamura R, Ikeda Y, et al. Biochim. Biophys. Acta. 1165 : 119-128, 1992.

6. Miyazaki A, Rahim ATMA, Ohta T, et al. Biochim. Biophys. Acta. 1126 : 73-80, 1992.

7. Heider JG, and Boyett R.L.J. Lipid. Res. 19 : 514-518, 1978.

8. Goldstein JL, and Brown MS. J. Biol. Chem. 249 : 5153-5162, 1974.

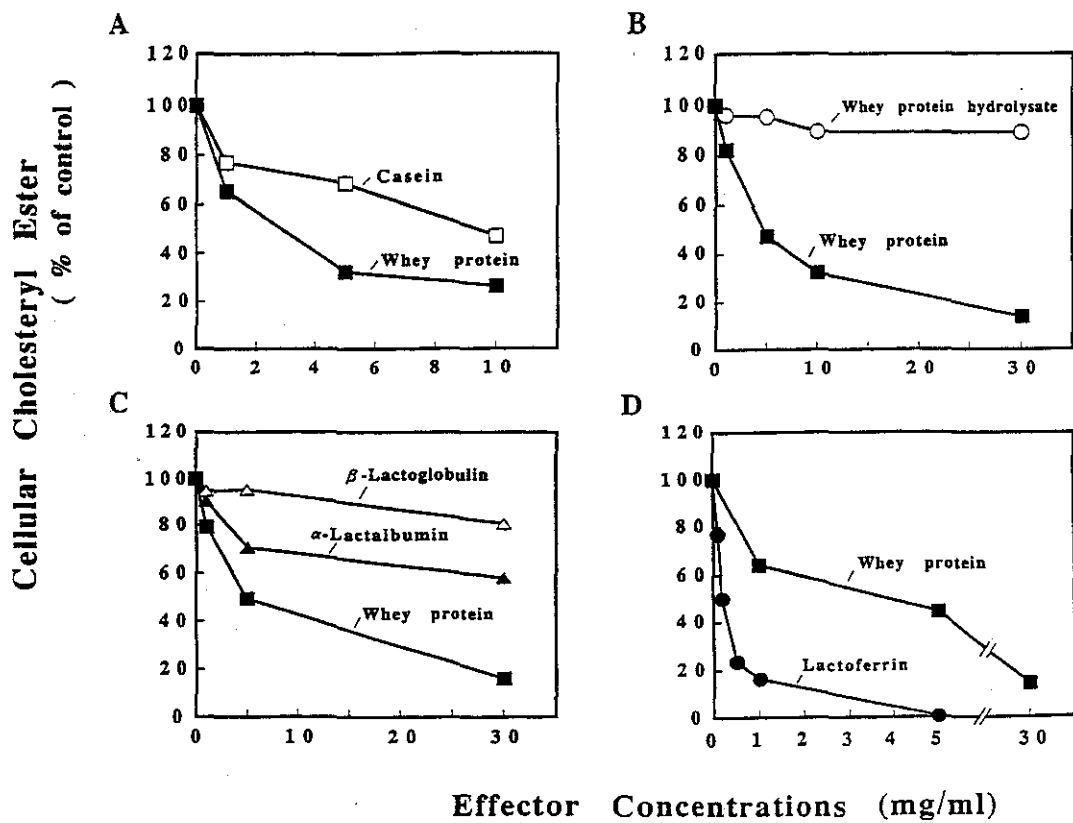


図1. カゼイン、乳清蛋白及び各種蛋白のコレステロール蓄積抑制作用

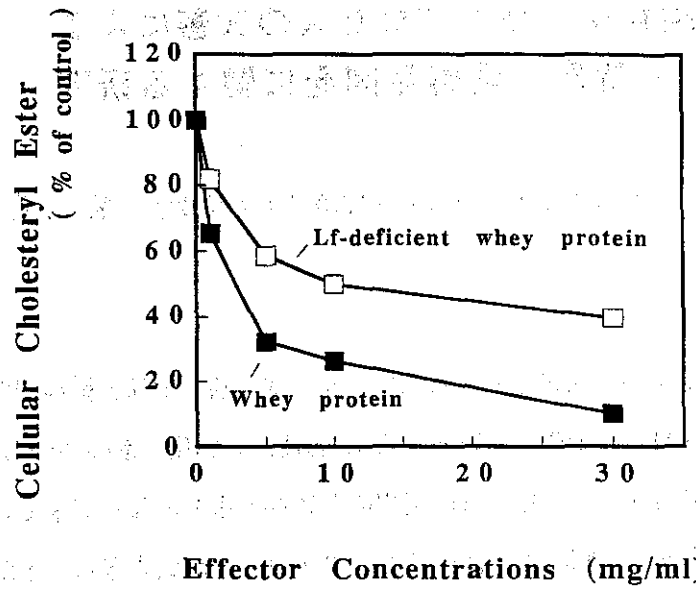


図2. ラクトフェリン除去乳清蛋白のコレステロール蓄積抑制作用

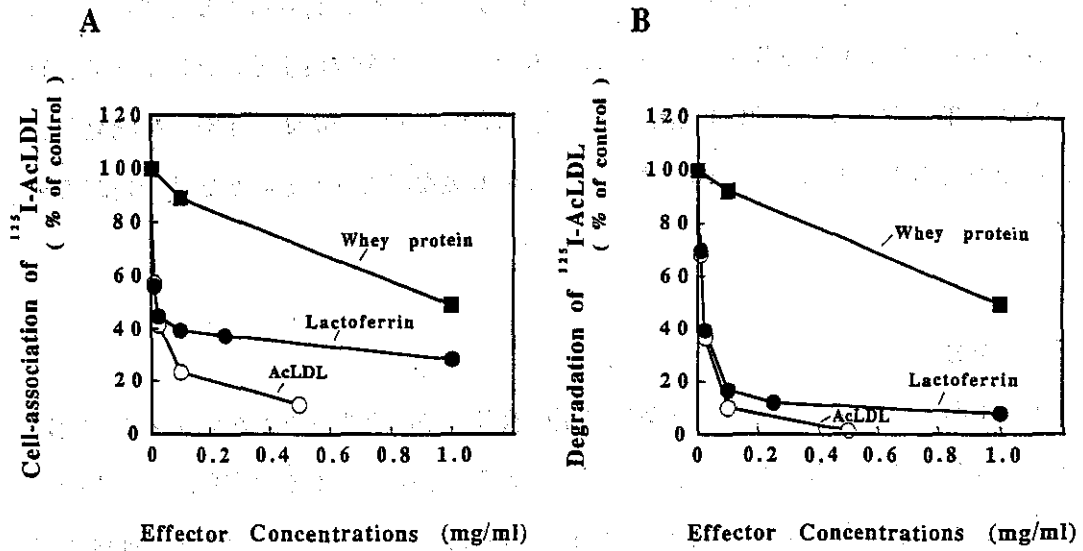


図3. Ac-LDL のスカベンジャーレセプターへの結合及び細胞内分解に対するラクトフェリンの影響