生体防御因子ラクトフェリン関連物質の抗真菌作用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 若林, 裕之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30596

生体防御因子ラクトフェリン関連物質の抗真菌作用

若林裕之

平成11年5月

博士論文

生体防御因子ラクトフェリン関連物質の抗真菌作用

金沢大学大学院自然科学研究科

若林裕之

目次

頁

第１章　緒言 １

第２章　ラクトフェリシンの細菌に対する作用－抗リステリア活性 １２

第３章　ラクトフェリシンの抗真菌スペクトルと抗真菌メカニズム １９

第４章　ラクトフェリシン誘導体の抗真菌・抗細菌・抗酸化活性 ３１

第５章　ラクトフェリン関連物質と抗真菌剤との相乗的抗カンジダ作用 ４４

第６章　ラクトフェリン関連物質の直接的、または生体を介した
抗白癬作用 ６５

第７章　総括 ８９

謝辞 ９２

引用文献 ９３

第１章　緒言

１．ラクトフェリンとトランスフェリン･ファミリー

ラクトフェリンは、糖鎖を結合する分子量約８万のタンパク質である。相同なアミノ酸配列を有する 2 つのローブ（N-ローブ、C-ローブ）が単一のポリペプチド鎖として存在し、それぞれのローブは 1 原子の三価鉄イオンを結合する（Lönnerdal and Iyer, 1995）。ラクトフェリンはこれらの性質とアミノ酸配列上の相同性からトランスフェリン･ファミリーに属する。ヒトにおいて、ラクトフェリンとトランスフェリンは物理化学的、生理学的諸性質から区別されうる。ラクトフェリンの等電点は約 9.0 であり、トランスフェリンのそれは約 5.9 である（Malamud and Drysdale, 1978）。ラクトフェリンの鉄に対する親和性はトランスフェリンの約 260 倍である（Aisen and Liebman, 1972）。ラクトフェリンの結合鉄の遊離は pH2～3 で起きるが、トランスフェリンのそれは pH5～6 で起きる。また、ラクトフェリンは哺乳類の外分泌液や好中球中に存在し、生体防御因子としての役割が主要な機能と考えられている（Brock, 1995）のに対し、トランスフェリンは主に血漿中に存在し、小腸から組織へ鉄を運搬することが主たる役割とされている。

1982 年、Jeltsch と Chambon によって、ニワトリのオボトランスフェリンのアミノ酸配列が決定され（Jeltsch and Chambon, 1982）、その後、ヒト･トランスフェリン（MacGillivray *et al.*, 1983）、ヒト･ラクトフェリン（Metz-Boutigue *et al.*, 1984）、ヒト･メラノトランスフェリン（Rose *et al.*, 1986）、ウシ･ラクトフェリン（Mead and Tweedie, 1990）といった脊椎動物のトランスフェリン･ファミリー･タンパク質の一次構造が報告された。無脊椎動物においては、カニ、タランチュラや原索動物で鉄結合性のトランスフェリン様タンパク質の存在が知られて

いたが、Bartfeld と Law によって、タバコスズメガのトランスフェリンがクローニングされて（Bartfeld and Law, 1990）以来、オオゴキブリ（Jamroz *et al.*, 1993）、センチニクバエ（Kurama *et al.*, 1995）、ヤブカ（Yoshiga *et al.*, 1997）といった昆虫で、脊椎動物のトランスフェリンと相同性を示す鉄結合性タンパク質が相次いで同定された。こうしたことからトランスフェリン・ファミリーは広く動物界に存在することが明らかとなった。Baldwin はヒトからタバコスズメガに至る 8 つの動物種でトランスフェリン・ファミリーのアミノ酸配列をペアワイズ・アラインメント法により比較し、系統発生を推定した（Baldwin, 1993）。それによると、トランスフェリンの系統発生は進化系統樹と一致し、N-ローブと C-ローブは哺乳類と昆虫類のラインが別れる前に遺伝子の重複によりできたこと、ラクトフェリンは約 200 万年前、哺乳類と鳥類が分かれた後に出現したこと、一方メラノトランスフェリンは哺乳類と鳥類が分かれる前にできたことが推論されている。ラクトフェリン以外のトランスフェリン・ファミリーについては、その鉄結合能から抗菌タンパク質としても働くことは容易に想像できるが、鉄運搬能以外の機能の研究は少ない。しかし、ヤブカのトランスフェリンは大腸菌やフィラリア原虫の刺激によって発現が亢進することから病原体に対する急性期タンパク質としての役割が推測されている。トランスフェリン・ファミリーは、複雑な抗原認識機構を介した特異免疫が脊椎動物で出現する以前から存在し、非特異的な感染防御機構を構成する一員として、その役割を担ってきたのかもしれない。

2．ラクトフェリンの遺伝子、発現、分布

ヒト・ラクトフェリン遺伝子は第三染色体の 3q21-23 領域に存在する。トランスフェリン、メラノトランスフェリン、トランスフェリン・レセプターの遺伝子

は、それぞれ同じ染色体の 3q21、3q24-qter、3q26.2-qter に存在し、ラクトフェリンとトランスフェリンの遺伝子が別れてから同じ領域に留まっていることが示されている（Teng *et al.*, 1987; McCombs *et al.*, 1988）。ラクトフェリン遺伝子のプロモーター領域中には、エストロジェン･レスポンシブ･モジュール（ERM）、マイトージェン・レスポンス・ユニット（MRU）など、多くのポジティブ、あるいはネガティブ調節領域が同定されている（Liu and Teng, 1991; Teng, 1994; Teng *et al.*, 1998）。ラクトフェリン遺伝子の発現は、発生時期特異的に、また組織特異的に制御されている。マウス･ラクトフェリンの cDNA、あるいは抗体を用いた組織学的研究により、マウス胚発生過程でのラクトフェリンの発現パターンが調べられた（Ward *et al.*, 1998）。ラクトフェリンの発現は着床前の 2 細胞期から始まり胚盤胞期に止まる。その後、妊娠後期にミエロイド細胞において再び発現が始まる。それは、胚発生 11 日目に肝臓で始まり、次いで脾臓と骨髄で起きる。最終的にラクトフェリンは様々な腺上皮細胞やその分泌液でも検出されるようになり、その発現パターンは成体でも維持される。ラクトフェリン遺伝子を破壊したマウスは、胚発生過程で着床する前に死亡することから、この時期に産生されるラクトフェリンは栄養外胚葉上皮の増殖と生存に必要なサイトカインとして働いていることが示唆されている（Conneely *et al.*, 1997）。

ラクトフェリンは血球の中では好中球の二次顆粒（特殊顆粒）に局在する。ラクトフェリンの合成は前骨髄球では見られないが、骨髄球期に二次顆粒の形成に伴なって行われ、その後合成は止まり好中球二次顆粒中のコンポーネントとして保持される（Rado *et al.*, 1984）。MPRO や EML といった、前骨髄球の形質を示したり分化多能性を持つセル･ラインは、レチノイン酸と GM-CSF の刺激により好中球の形質を持った細胞に分化し、同時にラクトフェリンの合成も行う（Lawson *et al.*, 1998）。血漿中には通常低濃度のラクトフェリン（0.1～0.4

μg/ml）が存在し、これは好中球に由来する（Sawatzki and Rich, 1989）。感染、炎症などにより好中球が活性化されると脱顆粒によってラクトフェリンは細胞外へ放出される（Lash *et al.*, 1983）。感染時には血漿中のラクトフェリン量が 200 μg/ml に達することもあることが報告されている（Gutteberg *et al.*, 1984）。

ラクトフェリンは腺上皮細胞によって合成･分泌され乳汁などの外分泌液中に存在する。ヒト（Johansson, 1960; Montreuil *et al.*, 1960）、ウシ（Groves, 1960）、ブタ（Roberts and Boursnell, 1975）、マウス（Kinkade *et al.*, 1976）、ヒツジ（Baer *et al.*, 1979）、ウマ（Jolles *et al.*, 1984）、リーザスモンキー（Davidson and Lönnerdal, 1986）、ウサギ（Dayal *et al.*, 1989）など様々な哺乳動物において、乳汁からラクトフェリンが単離されているが、その含量は動物種および泌乳時期によって異なる。ラットの乳汁にはラクトフェリンはほとんど検出されないが、トランスフェリンが存在する（Masson and Heremans, 1971）。ヒトの乳汁中のラクトフェリンは非常に多く、初乳中の濃度は 6～8 mg/ml に達し、常乳では 2 mg/ml になる（Nagasawa *et al.*, 1972）。ウシの初乳中にも 5 mg/ml の濃度で存在し、常乳では 0.02～0.35 mg/ml まで低下するが（Suzuki *et al.*, 1977）、退行期には 20～100 mg/ml の高濃度にまで達する（Welty *et al.*, 1976）。ウシ乳腺の細菌感染時には、他の乳タンパク質の濃度は変化しないが、ラクトフェリンのそれは通常の約 30 倍に増加する（Harmon *et al.*, 1976）。乳腺でのラクトフェリンの合成はプロラクチンによって促進されるが、エストロジェンの影響は受けない（Teng *et al.*, 1989）。

子宮分泌液中には 0.5～1.0 mg/ml と比較的高濃度のラクトフェリンが含まれている。その発現はエストロジェンとプロジェステロンのバランスによって制御されている。エストラジオールは子宮上皮細胞のラクトフェリンの合成を誘導するが、プロジェステロンは逆に抑制する（McMaster *et al.*, 1992; Walmer *et al.*, 1992）。ヒト･ラクトフェリンはまた涙液（約 0.4～1.2 mg/ml）中に多く含まれ、

他にも精液、唾液、鼻汁、気管支粘液、胆汁、胃液、十二指腸液、膵液、羊水、尿などに存在する（Levay and Viljoen, 1995）。

3．ラクトフェリンの生体防御における役割

ラクトフェリンは in vitro で抗菌性、免疫調節作用、抗酸化性など多彩な生物活性を示す（Sánchez *et al.*, 1992）。ラクトフェリンは、ほとんど全ての外皮粘液中に存在すること、感染時に免疫細胞として最初に集積してくる好中球から放出されること、in vitro で抗菌性を示すことなどから、病原体の侵入に対する初期防衛因子であると考えられる（Levay and Viljoen, 1995）。好中球中のラクトフェリンを欠損している患者は繰り返し感染症を罹患することからも、このタンパク質の感染防御における重要性が示唆される（Boxer *et al.*, 1982）。さらにラクトフェリンが乳汁中の主要なコンポーネントであることは、免疫系が未熟な乳児を感染から守るために、経口摂取を介して何らかの役割を果たしていることもうかがわせる（Chierici and Vigi, 1994）。

ラクトフェリンの抗菌性は、過剰な鉄の存在下で、あるいは鉄を結合した状態では発揮されないことから、微生物が栄養として必要とする鉄をキレートにより奪う静菌的なものと考えられてきた（Reiter, 1983）。しかしラクトフェリンの抗菌メカニズムは鉄キレート能以外の作用もあることが他の研究で示された。真菌については後述するが、細菌についての研究では、ラクトフェリンが細胞表面に直接結合すること（Arnold *et al.*, 1977）、鉄を結合していないラクトフェリン（アポラクトフェリン）は殺菌的に作用すること（Arnold *et al.*, 1981）、グラム陰性菌に対しては外膜を傷害しリポポリサッカライド（LPS）を遊離させること（Ellison *et al.*, 1988）が示された。実際の生体内には、多くの抗菌物質、食細胞が存在しこれらが協力して、効果的に侵入微生物の発育阻止、殺菌を行っ

ていると考えられ、これらの相互作用を知ることは重要である。ラクトフェリンは特に外皮粘液中に共存するリゾチーム（Perraudin and Prieels, 1982; Ellison and Giehl, 1991）、分泌型 IgA（Rogers and Synge, 1978）、好中球（Okutomi *et al.*, 1997）のほか、β-defensin 2（Bals *et al.*, 1998）、bactenecin（Skerlavaj *et al.*, 1990）などの抗菌ペプチドと相加的、あるいは相乗的に微生物の発育を抑制することが in vitro の試験により明らかにされている。

ラクトフェリンは免疫細胞に直接結合し、これらの機能、分化を調節する。ラクトフェリンの免疫系への作用については in vitro で非常に多くの研究がなされているが、主として次のようなものがある。食細胞系では、好中球の運動性、活性酸素産生能（Gahr *et al.*, 1991）、貪食能（Miyauchi *et al.*, 1998）を高める。単球に対しては、LPS で誘導される炎症性サイトカイン IL-1、IL-6、TNF-αの産生を抑制する（Zucali *et al.*, 1989; Machnicki *et al.*, 1993）。ラクトフェリンは単球に取り込まれて細胞内寄生菌の増殖を抑制する（Byrd and Horwitz, 1991）。リンパ球系に対する作用としては、$CD4^-CD8^-$胸腺細胞の $CD4^+CD8^-$ヘルパーT 細胞への誘導（Zimecki *et al.*, 1991）、抗原やマイトージェンに対するリンパ球増殖反応の抑制（Zimecki *et al.*, 1996; Miyauchi *et al.*, 1997）、アロジェネイックな混合リンパ球反応の抑制（Slater and Fletcher, 1987）などがある。炎症時に好中球から放出されたラクトフェリンは、単球の GM-CSF 産生を抑制して好中球などの造血を抑えるというネガティブ･フィードバック・レギュレイターとしての役割が示唆されている（Broxmeyer *et al.*, 1980）が、逆に造血を高めるという報告もある（Sawatzki and Rich, 1989）。全体としては、免疫系に対して促進的というより抑制的なものの報告が多い。

比較的多量の入手が可能なウシ・ラクトフェリンを生体に投与してその感染防御作用を調べる試みは、初め静脈内（iv）、あるいは腹腔内（ip）への投与経

路を介して行われた。Zagulski らはマウスの大腸菌による致死感染のモデルを用いて、感染の 24 時間前にラクトフェリンを iv 投与することでマウスの生存率が高まることを報告した（Zagulski *et al.*, 1989）。彼らは、この効果は大腸菌が放出する LPS によって誘導される TNF-αの産生量をラクトフェリンが低下させるためだと説明した（Machnicki *et al.*, 1993）。つまり TNF-αによる全身性の炎症の抑制、抗炎症作用がラクトフェリンによる大腸菌感染防御機構と考えられた。しかしその後に、血液や臓器内の菌数も低下していることが明らかになり、生体の殺菌系の働きが高まっていることが示唆された（Zagulski *et al.*, 1998）。近年、ラクトフェリンの経口投与によっても感染防御効果の得られることが、各種感染動物モデルを用いた研究によって明らかになってきた。例えば、マウス腸管内大腸菌の異常増殖・トランスロケーション（Teraguchi *et al.*, 1995a; Teraguchi *et al.*, 1995b）、マウスの *Klebsiella pneumoniae* や大腸菌による全身感染（Miyazaki *et al.*, 1991）、さらに魚類であるタイの白点虫感染（Kakuta and Kurokura, 1995）に対してラクトフェリン経口投与による防御効果が示されたが、そのメカニズムはほとんど分かっていない。

ラクトフェリンのレセプターは腸管上皮細胞、単球・マクロファージ、好中球、リンパ球、肝細胞上に存在し、その特性が調べられている（Hu *et al.*, 1988; Birgens *et al.*, 1984; Legrand *et al.*, 1992）。しかし、タンパク質として同定されたものは、肝細胞上のレセプター、LDL-receptor related protein（Huettinger *et al.*, 1998）と asialoglycoprotein receptor subunit のみである（McAbee *et al.*, 1998）。

ラクトフェリンが抗菌活性あるいは免疫調節活性を示す作用濃度と、体内での存在濃度レベルを比較した（図 1）。抗菌活性の作用濃度はほぼ外分泌液中のレベルと一致する。主要な免疫調節活性の作用濃度は、外分泌液中レベルと特に炎症時の血中レベルに一致する。ラクトフェリンを経口摂取したときの腸管

内での消長が、SELDI アフィニティ質量分析法により調べられた（Kuwata *et al.*, 1998）。やや高濃度のウシ･ラクトフェリン（490 μM）を自由摂取したマウスの腸管内で検出されるラクトフェリシン（後述）含有フラグメントの濃度は、概ねラクトフェリンが免疫調節活性を示す濃度に一致する。このことから、経口摂取したラクトフェリンまたはそのフラグメントは腸管内で一定の濃度レベルを維持し、上皮細胞や免疫細胞に結合してこれらに刺激を与え、そのシグナルが何らかの経路を経て全身免疫系に影響して、感染防御作用を発揮していることが想像される。

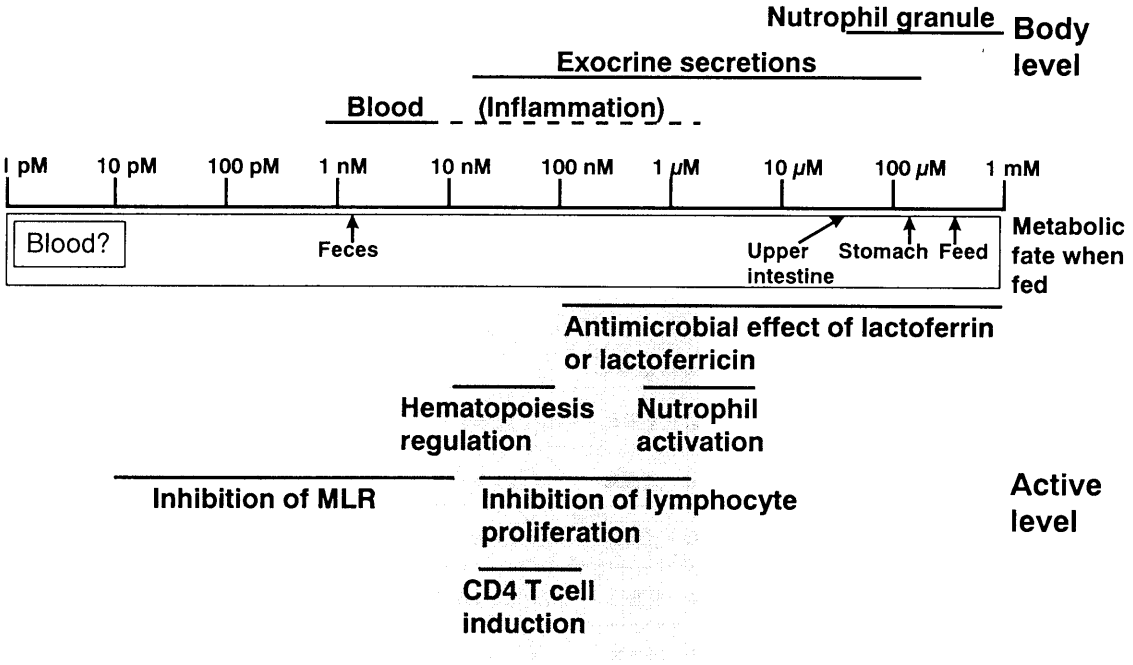


図１．ラクトフェリンの体内での存在レベル、活性発現濃度、摂取した時の消化管内レベルの比較

４．ラクトフェリンの活性フラグメント、ラクトフェリシン

ラクトフェリンの抗菌性が単純に鉄キレート作用だけに帰されるものでは

ないことは、前節に示した通りだが、鉄キレート作用以外の抗菌メカニズムがどういうものであるのか詳細には判ってなかった。ラクトフェリンを種々のプロテアーゼで分解し、その生理活性を調べる過程で、ペプシンなどの酸性プロテアーゼによるウシ・ラクトフェリン分解物が分解前より強い抗菌活性を示すことが明らかとなった（Tomita *et al.*, 1991）。ラクトフェリンのペプシン分解物の中から、抗菌活性を示すペプチドが単離され、そのアミノ酸配列が決定された（Bellamy *et al.*, 1992a）。ヒト・ラクトフェリン由来の抗菌ペプチド、ラクトフェリシンHは、ラクトフェリンのN末端47残基に相当する。ウシ・ラクトフェリン由来の抗菌ペプチド、ラクトフェリシンBは、ラクトフェリンのN末端側の25残基に相当し、ラクトフェリシンHと相同な部位を有することが示された。いずれのペプチドも塩基性アミノ酸を多く含んでおり、これまでに報告されてきた塩基性の抗菌ペプチドと同様に、膜障害作用により抗菌性を発揮することが示唆された。

Peptide	Sequence
Lactoferricin H	..EATKCFQWQRNM--RKVRG-PPV-SCI---KRD....
Lactoferricin B	FKCRRWQWRM--KKL GAPSI-TCV---RRAF
Dermaseptin I	ALWKTML--KKL-GTMAL-HAGKAALGA....
Magainin I	EVRGIGKFLHSA--GKF-GKAFV-GEIMKSKRD
Magainin II	EVRGIGKFLHSA--KKF-GKAFV-GEIMKSKRD
MCP-1	VVCACRRALCLPRERRA-GFCRIRGRIHP
MCP-2	VVCACRRALCLPLERRA-GFCRIRGRIHP

図2．ラクトフェリシンとその他の抗菌ペプチドのシークエンス・アラインメント。類似のアミノ酸（塩基性、疎水性、芳香族）をボールドで示した。

ラクトフェリシンと他の抗菌ペプチドの間でシークエンス･ホモロジーはみられないが、カエルの dermaseptin や magainin、ウサギの MCP との間で塩基性アミノ酸や疎水性アミノ酸の配列に類似性がある（図 2）。これは遺伝子の起源が同一なのではなく、進化の過程で同一の機能を獲得した結果であると思われる。

ラクトフェリシン B はグラム陰性、グラム陽性細菌、真菌に対して広い抗菌スペクトルを示し、その作用様式は殺菌的であり、菌体に結合し、膜機能を障害することが明らかとなった（Bellamy *et al.*, 1992b; Bellamy *et al.*, 1993a; Bellamy *et al.*, 1993b; Bellamy *et al.*, 1994）。糖尿病患者は感染症に罹患する率が高いが、これらの人たちではタンパク質が糖で修飾された産物 Advanced glycation end product (AGE)が血中で増加していることが知られている。AGE はラクトフェリンの抗菌活性を阻害し、それは AGE がラクトフェリン分子中のラクトフェリシン領域に結合して活性をブロックするためであることが報告された（Li *et al.*, 1995）。この報告により、ラクトフェリシンがペプチドとして働くとともに、ラクトフェリシン部位がラクトフェリン分子自体の抗菌活性にとっても重要な領域であることが証明された。

ラクトフェリン分子中でラクトフェリシン領域はαヘリックスとβシートからなっているが、ラクトフェリシン B はペプチドとしてはやや歪んだアンチパラレルβシート構造を取ることが、NMR による解析で示された（Hwang *et al.*, 1998）。この構造の変換が、ラクトフェリシンが元のタンパク質より強い抗菌活性を示すことに関係しているかもしれない。ラクトフェリンを摂取すると、消化管内でラクトフェリシン様ペプチドが生成する（Kuwata *et al.*, 1998）。同様なペプチドが生体内の他の部位でも生成するのか、ラクトフェリシンが抗菌性以

外にどのような生理活性を示すのか興味が持たれる。

5．本研究の目的

病原性真菌には、ヒトにおける最も罹患率の高い感染症の一つである白癬の原因菌、皮膚糸状菌や、ヒトの常在菌である病原性酵母 *Candida albicans* の他、多くの種類が知られている。細菌類と異なり、強い病原性を示す真菌は少ないが、疾病やガン化学療法によって免疫力の低下した易感染性患者における日和見感染菌として問題化している。特に AIDS 患者では二次感染として高い率で *Candida* などの真菌類に感染する。また腸管内での *C. albicans* の異常増殖がアトピー性皮膚炎の増悪因子となることや、歯肉炎と *C. albicans* との関連性も指摘されている。このため真菌に対する生体防御機構の解明、新しい予防法、治療法の確立は重要な課題である。

本研究はラクトフェリン、ラクトフェリシン、ラクトフェリシン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について、第 2 章では細菌の *Listeria monocytogenes* に対する抗菌性を確認し、第 3 章では病原真菌における抗菌スペクトルと *C. albicans* に対する抗菌メカニズムを調べた。第 4 章ではラクトフェリシン中の 9 残基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、第 5 章では抗真菌剤とラクトフェリン類の *C. albicans* に対する in vitro 併用効果を検討した。最後に第 6 章では 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。

第２章　ラクトフェリシンの細菌に対する作用－抗リステリア活性

１．はじめに

Listeria monocytogenes は食品産業において大きく問題化している病原菌である（Fleming *et al*., 1985; Gellin *et al*., 1989; Mclaughlin, 1987; Schlech *et al*., 1983）。この菌は髄膜炎や菌血症などのリステリア症の起因菌である（Gellin *et al*., 1989）。*L. monocytogenes* は自然界に存在し様々な食品や食品添加物から検出され（Fleming *et al*., 1985; Mclaughlin, 1987; Weis and Seeliger, 1975）、低温でも生存、生育できるため（Rosenow and Marth, 1987; Ryser and Marth, 1987）、冷蔵保存では乳製品などに存在するこの菌の発育を阻止するのに不十分である。そのためこの菌の発育と生存をコントロールする新しい手段を見出すことが重要である。

ラクトフェリシンが *L. monocytogenes* の発育や生存をコントロールするのに効果的かどうかを調べるために、臨床分離株を含めたいくつかの菌株に対するラクトフェリシンＢの阻止作用を調べた（Wakabayashi *et al*., 1992）。

２．材料と方法

２－１．ラクトフェリシンＢの調製

ウシ･ラクトフェリンは Law and Reiter の方法により､脱脂乳から精製し（Law and Reiter, 1977）、5% (w/v) の濃度で蒸留水に溶解し、1 N の HCl を添加して pH を 3.0 に調整した。ペプシン（10 units/mg; #B151, Difco Laboratories, Detroit, MI）を基質ラクトフェリンに対して 3%の濃度で加え、37℃で 4 時間、加水分解を行った。反応は 80℃で 15 分加熱することで停止し、1 N の NaOH を加えて pH を

7.0 にした。沈殿（全タンパク質の 10%以下）は、15,000 x *g*、30 分の遠心で除去し、上清を回収して凍結乾燥した（Tomita *et al*., 1991）。

ラクトフェリシン B は、2 段階の逆相 HPLC により精製した（Bellamy *et al*., 1992a）。1 段階目では、ラクトフェリン･ペプシン分解物を、TSK-GEL 120T（6.0 x 150 mm; Tosoh, Japan）カラムで、溶出液 A（0.05%トリフルオロ酢酸）と溶出液 B（90%アセトニトリル、0.05%トリフルオロ酢酸）のリニア･グラジエント A:B = 80:20～40:60、30 分、流速 0.8 ml/分により分画した。得られた活性画分を、2 段階目では、CSMOSIL 5CN-R（4.6 x 150 mm; Nacalai Tesque, Japan）カラムで、溶出液 A と溶出液 B のリニア･グラジエント A:B = 100:0～55:45、40 分、流速 0.8 ml/分で分画し、活性ペプチドを得た。ペプチドは、Applied Biosystems Model 470A 気相タンパク質シーケンサーにより同定した。ラクトフェリシン B の純度は HPLC により 99%以上を示した。

２－２．菌株

以下の 4 株の *L. monocytogenes* を使用した。IDF-1b（血清型 1b, International Dairy Federation, Tokyo, Japan）と、臨床分離株 JCM7672、JCM7673、JCM7674（それぞれ血清型 2, 3, 4a, Japan Cellection of Microorganisms, RIKEN, Wako, Japan）。

２－３．抗菌活性の測定

L. monocytogenes は 1% Bactopeptone (Difco Laboratories)、pH 6.8、または PYG 培地（1% Bactopeptone, 1% glucose, 0.05% yeast extract）、pH 6.8、37℃で培養した。実験により、種々の炭水化物、タンパク質、塩を培地に加えた。菌の発育は、600 nm の吸光度を測定することで検出した。ラクトフェリシン B は蒸留水に溶

解しフィルター滅菌したものをストック液として培地に加えた。発育阻止活性の測定のために、種々の濃度のラクトフェリシンB(0~60 μg/ml)を添加した2 mlの培地の入ったチューブに、対数期の細胞（10^6 CFU/ml）を接種し、16~20時間培養した。最小発育阻止濃度（MIC）は発育を完全に阻止した最も低いラクトフェリシンBの濃度とした。殺菌活性の測定のために、接種菌液を1% Bactopeptone培地に加え、振盪恒温槽で37℃で培養した。一定時間後に、培養液を回収し、1% Bactopeptoneで10倍希釈系列を作り、標準寒天培地（Eiken Chemical Co., Japan）上に塗布、培養し、コロニー数を計測した。それぞれの実験はn=2以上で行った。

３．結果

３－１．発育阻止活性

異なる培養条件下で*L. monocytogenes*の発育を阻止するのに必要なラクトフェリシンBの最小濃度を測定した。1% Bactopeptone培地またはPYG培地でラクトフェリシンBのMICは、菌株と使用培地によって0.3~3 μg/mlの範囲を示した（表２－１）。様々な炭水化物、タンパク質、塩を1% Bactopeptone培地に加えて、ラクトフェリシンBの*L. monocytogenes* IDF-1bに対する抗菌効果への影響を調べた。グルコース、ガラクトース、フルクトース、マンノース、キシロース、マルトース、シュークロース、ラクトース、デンプンは10 mg/mlまでラクトフェリシンBの活性に全く影響を与えず、MICは0.6 μg/mlのままであった。ゼラチン、BSAを10 mg/ml加えたときのMICはそれぞれ3 μg/mlと1μg/mlであり、影響は少なかった。一方、NaCl、KCl、NH_4Clをそれぞれ100 mM、$MgCl_2$、$CaCl_2$をそれぞれ5 mM添加するとラクトフェリシンBの効果はより低下した（表２－２）。pHの影響を調べるために、種々のpHに調製した1% Bactopeptone

培地で IDF-1b 株を培養した。pH を 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 としたときの MIC はいずれも 0.6 μg/ml であった。この pH 域より低い、または高い pH では菌が発育できなかった。

表２－１．*L. monocytogenes* のラクトフェリシン B に対する感受性

	MIC (μg/ml)	
L. monocytogenes	1% Bactopeptone	PYG medium
IDF-1b	0.6	3
JCM-7672	NG[a]	2
JCM-7673	0.3	1
JCM-7674	0.6	3

a 発育せず

表２－２．ラクトフェリシン B の *L. mocytogenes* IDF-1b に対する阻止活性における塩類の影響

	MIC (μg/ml)				
Salt	2.5 mM	5.0 mM	25 mM	75 mM	100 mM
NaCl	0.6	1	3	6	6
KCl	0.6	1	3	6	9
NH_4Cl	0.6	1	3	6	9
$MgCl_2$	3	3	NG[a]	NG	NG
$CaCl_2$	3	6	NG	NG	NG

a 発育せず

３－２．抗菌活性

ラクトフェリシン B の *L. monocytogenes* に対する殺菌活性を調べるために、4 つの試験株を 1% Bactopeptone 培地に懸濁し、37℃、60 分の培養後の生菌数を計測した。表２－３に示すように、ラクトフェリシン B の作用は強い殺菌的なものであり、全ての株に対して生残能を消失させた。殺菌活性のカイネティックスを IDF-1b を用いて調べた。図２－１に示すように、ラクトフェリシン B による殺菌は急速に起こり、濃度に依存していた。

表２－３．ラクトフェリシン B 31 μg/ml (10 μM)で 60 分処理後の *L. monocytogenes* の生残率

	Survival[a] (CFU/ml)	
L. monocytogenes	Control	Lactoferricin B
IDF-1b	2.5×10^6	<100
JCM-7672	2.0×10^5	<100
JCM-7673	1.3×10^6	300
JCM-7674	5.2×10^4	<100

a Control はラクトフェリシン無添加。検出限界は 100 CFU/ml。

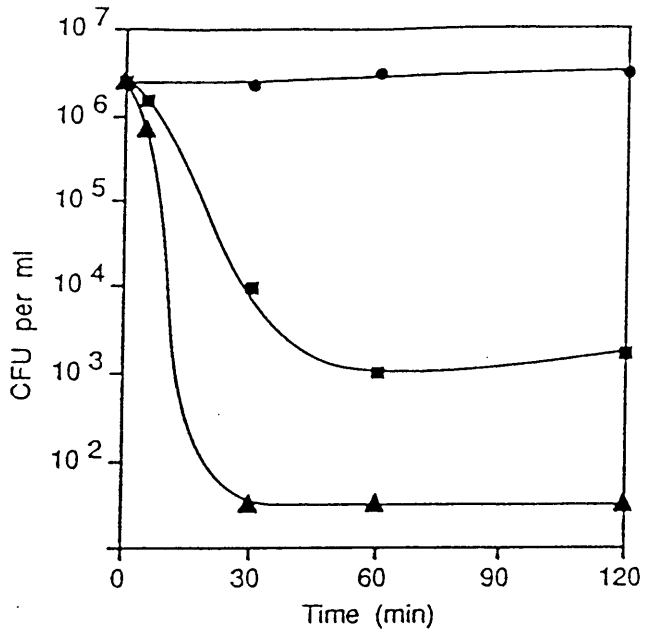


図２－１．ラクトフェリシンＢによる *L. monocytogenes* IDF-1b の殺菌カイネティックス。1% Bactopeptone 培地中で 37℃で培養した。添加したラクトフェリシンＢ濃度は 0 μg/ml (●)、6 μg/ml (■)、31 μg/ml (▲)。

４．考察

本試験により *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。ラクトフェリシン B の他の細菌に対する MIC は 1% Bactopeptone 培地中で概ね数μg/ml であり、*L. monocytogenes* に対する MIC 0.3~0.6μg/ml はかなり低い。臨床的に使用されている多くの抗生物質は *L. monocytogenes* の発育を 10 μg/ml 以下で阻止するが（Larsson *et al.*, 1985）、ラクトフェリシン B の効果は様々な条件下でそれに匹敵するものだった。さらにラクトフェリシンＢは 4 菌株全てに対して、急速で非可逆的な生残能の消失を引き起こした。これらの観察結果は、この抗菌物質が *L. monocytogenes* という食品由来の病原菌の発育と生存をコントロールするのに有用であることを示唆している。しかし食品の保存料としてどの程度の濃度が必要となるかは予測できな

い。pH、温度、水分、微生物や様々な食品成分の存在などの多くの環境条件は、ラクトフェリシンBの効果に影響を与える可能性もある。

5．まとめ

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より0.3～9 μg/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、種々の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、全ての試験菌株に対して生残率を急速に低下させた。

第３章　ラクトフェリシンの抗真菌スペクトルと抗真菌メカニズム

１．はじめに

ラクトフェリンの in vitro 抗菌作用は、主として細菌を用いて調べられてきたが、一部の病原性真菌、とくに *C. albicans* について多くの研究報告がある。1971 年に、Kirkpatrick らは母乳中のラクトフェリンが鉄結合性タンパク質として働くことによって *C. albicans* の発育を阻止することを報告した（Kirkpatrick *et al.*, 1971）。その後、ラクトフェリンの抗 *C. albicans* 活性については、発育に必要な鉄を奪うだけでなく細胞に直接結合することが加わってより強力に発育を阻止すること（Valenti *et al.*, 1986）、殺菌的に作用すること（Soukka *et al.*, 1992）、細胞表層の構造を変化させてタンパク質の漏出を引き起こすこと（Nikawa *et al.*, 1993）、などが次々に報告された。また、好中球の *C. albicans* 発育阻止作用には、活性酸素の産生以外に、放出されたラクトフェリンが大きく寄与していることも示されている（Palma *et al.*, 1992a; Palma *et al.*, 1992b）。さらに実際の生体でのラクトフェリンの役割に関する研究として、健常成人の糞便において、内因性のラクトフェリン濃度と *Candida* 菌数が負の相関を示したという報告がある（Tomoda and Takai, 1993）。

ラクトフェリシン B はいくつかの真菌に対して強力な抗菌性を示すこと（Bellamy *et al.*, 1994）、*C. albicans* に結合すること（Bellamy *et al.*, 1993b）、皮膚糸状菌 *Trichophyton rubrum* におけるグルコースの取り込みを阻害すること（Bellamy *et al.*, 1994）が示されている。本試験では、広範囲の病原性真菌における、ラクトフェリシン B に対する in vitro での感受性を調べた。また抗真菌メ

カニズムを明らかにするために、*C. albicans* の細胞膜と細胞壁に対するラクトフェリシン B の作用を検討した（Wakabayashi, *et al.*, 1996a）。

2．材料と方法

2－1．ラクトフェリシン B と硝酸ミコナゾールの調製

ラクトフェリシン B は第 2 章に示した方法で調製した。硝酸ミコナゾールは Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)より購入した。

2－2．菌株

帝京大学医真菌研究センター（Tokyo, Japan）に保存されている 75 菌株の病原性真菌を試験に用いた。病原真菌株のストック・カルチャーは当センターにて行われている方法で調製した（Itoyama *et al.*, 1993）。

2－3．最小発育阻止濃度（MIC）の測定

変形サブロー・グルコース・寒天培地（1% Bactopeptone, 2% glucose, 0.75% isogel agarose [FMC BioProducts, Rocklans, ME, USA], pH 5.0）を試験培地とした寒天希釈法を用いた。ラクトフェリシン B は蒸留水に溶解、フィルター濾過し、最終濃度 0.31～80 μg/ml となるように、60℃保温下で試験培地に加えた。病原性酵母の細胞はストック・カルチャーから分取し、生理食塩水に懸濁した。細胞数は血球計算版を用いて計数し 10^6 細胞/ml に調整した。糸状菌の胞子はストック・カルチャーから分取し、0.05% (w/v)入り生理食塩水に懸濁した。胞子懸濁液は 530 nm の吸光度が 0.02 となるように調製したものを接種菌液とした。それぞれの試験寒天培地上に 5 μl の菌液を接種し、27℃で培養した。病原性酵母、接合菌、非着色性真菌は 4 日間、その他の糸状菌類は 7 日間培養した。最小発育阻

止濃度（MIC）は、視覚的に発育を認めない薬剤の最小濃度とした。

２－４．浸透圧ストレスに対する抵抗性の測定

C. albicans TIMM0144 はペプトン･イースト･グルコース（PYG）ブロス（2% Bactopeptone、1% yeast extract、2% glucose: Yamaguchi *et al.* (1982)を改変）中、振蕩恒温槽で、37℃、18 時間培養した。細胞を生理食塩水で洗浄し、細胞数を血球計算板により計数した。10^5 細胞/ml の *C. albicans* 細胞を、0.8 M のソルビトールを浸透圧安定剤として加えたサブロー･グルコース･ブロス（1% Bactopeptone、2% glucose）中で（Yamaguchi *et al.*, 1982）、0~80 μg/ml のラクトフェリシン B により処理した。細胞懸濁液は振蕩恒温槽で、37℃、6 時間培養し、サンプリングした。浸透圧ストレスを与える群は、サンプリングした細胞を生理食塩水中で希釈し、PYG 寒天培地（2% Bactopeptone、1% yeast extract、2% glucose、2% agar）上に塗布した。浸透圧ストレスを与えない群は、サンプリングした細胞を浸透圧安定剤を加えた生理食塩水中で希釈し、浸透圧安定剤入りの PYG 寒天培地（2% Bactopeptone、1% yeast extract、2% glucose、2% agar）上に塗布した。

２－５．細胞外液の pH 変動の測定と流出した K^+量の測定

上に示した方法で調製した *C. albicans* TIMM0144 細胞を、最終細胞濃度 10^8 細胞/ml となるように水に懸濁し、37℃で撹拌した（Hiratani and Yamaguchi, 1984）。ラクトフェリシン B 溶液を最終濃度 0.63、2.5、10 μg/ml となるように細胞懸濁液に加えた。硝酸ミコナゾールは DMSO に溶解し、溶液の量が細胞懸濁液に対して 2%になるように加えた。DMSO 単独は実験結果に影響を示さなかった。硝酸ミコナゾールの最終濃度は 2.5、10、40 μg/ml とした。細胞懸濁液の pH を測

定し、継続的に記録した。K^+ 流出量の測定のために、一定のインターバルで細胞懸濁液を分取し、直ちに 0.45 μm セルローズ・アセテート・フィルター（Advantec, Tokyo, Japan）で濾過した。濾液中の K^+ 量は誘導共役プラズマ分光光度計（Leeman labs, Lowell, MA, USA）を用いて測定した。細胞内のトータル K^+ は 5% トリクロロ酢酸で 5℃、30 分の処理によって抽出した。薬剤を加えたことで流出した K^+ 量は細胞内トータル K^+ 量に対する%として計算した。

３．結果

３－１．抗真菌スペクトル

各種の病原性酵母と糸状菌に対してラクトフェリシンBが効果を示す濃度を決定した（表３－１）。広い範囲の MIC 値が病原性酵母と皮膚糸状菌で観察され、菌種と菌株によって異なる感受性を示した。*Candida tropicalis*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Cryptococcus neoformans*、*Epidermophyton floccosum* は比較的低い MIC 値（0.31～2.5 μg/ml）を示した。非着色性真菌と接合菌の多くの菌株はラクトフェリシン B に対して抵抗性（MIC: >80 μg/ml）を示した。黒色真菌と二形性真菌は中程度の感受性（MIC: 0.63～80 μg/ml）を示した。

表３－１．ラクトフェリシンＢの病原性真菌に対する in vitro 抗菌活性

Fungal species	Number of tested strains	MIC range (μg/ml)	Arithmetic mean MIC[a] (μg/ml)
I. Pathogenic yeasts			
Candida albicans	6	10 to 40	21.67
C. tropicalis	2	0.31, 1.25	0.78
C. parapsilosis	2	20, 80	50.00
C. glabrata	2	80, >80	120.00
C. guilliermondii	2	5, 40	22.50
C. kefyr	2	2.5, 10	6.25
C. krusei	2	10, 20	15.00
Saccharomyces cerevisiae	1	0.63	0.63
Cryptococcus neoformans	2	0.63	0.63
Trichosporon cutaneum	2	1.25, 2.5	1.88
II. Nonpigmented hyphomycetes			
Aspergillus fumigatus	4	>80	160.00
A. niger	2	>80	160.00
A. flavus	2	>80	160.00
A. versicolor	1	10	10.00
A. clavatus	1	>80	160.00
Penicillium notatum	1	>80	160.00
P. expansum	1	>80	160.00
Fusarium moniliforme	2	2.5, 5	3.75

III. Zygomycetes			
Absidia corymbifera	2	40, >80	100.00
Mucor circinelloides	1	>80	160.00
M. racemosus	1	>80	160.00
Rhizopus oryzae	2	>80	160.00
IV. Dermatophytes			
Trichophyton mentagrophytes	5	10 to >80	62.00
T. rubrum	3	>80	160.00
T. tonsurans	2	5, 40	22.50
T. shoenleinii	1	>80	160.00
T. violaceum	2	40, >80	100.00
Microsporum canis	1	40	40.00
M. gypseum	2	20, 40	30.00
Epidermophyton floccosum	3	0.31 to 2.5	1.15
V. Dematiaceous fungi			
Fonsecaea pedrosoi	2	5	5.00
Exophiala dermatitidis	2	2.5	2.50
Phialophora verrucosa	2	5, 10	7.50
Cladosporium trichoides	2	5	5.00
VI. Dimorphic fungi			
Paracoccidioides brasiliensis	2	0.63, 1.25	0.94
Sporothrix schenckii	3	2.5 to 10	5.83

a Arithmetic mean; 算術平均、>80 μg/ml は 160 μg/ml として計算した。

３－２．細胞の浸透圧抵抗性

ラクトフェリシンBによる*C. albicans*の殺菌のメカニズムを調べるために、浸透圧を保護した細胞と浸透圧ストレスを与えた細胞を用いて実験を行った（図３－１）。ラクトフェリシンBを添加しないで6時間培養したものは細胞数が約10倍に増加した。一方、ラクトフェリシンBで処理したものは濃度依存的に細胞数の減少を示した。細胞数の減少率は、浸透圧を保護した細胞と浸透圧ストレスを与えた細胞でほぼ同じであった。この結果はラクトフェリシンBが細胞の浸透圧に対する脆さを誘導しないことを示唆している。

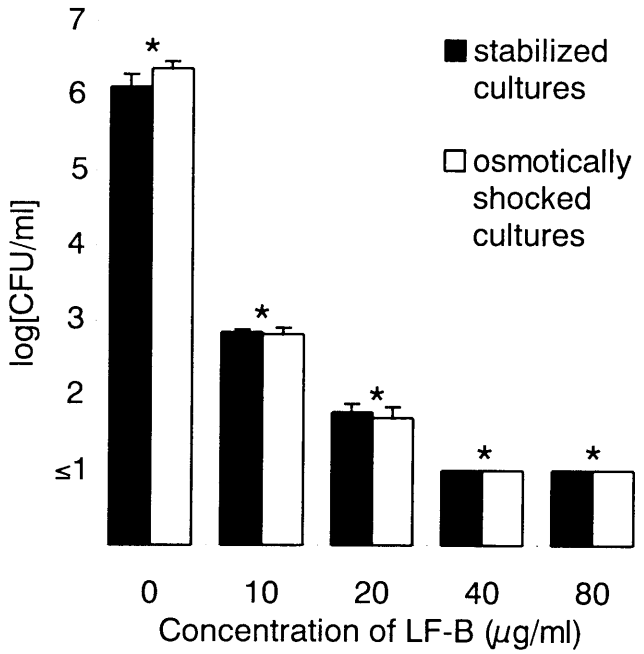


図３－１．浸透圧を保護、または浸透圧ストレスを与えた*C. albicans*細胞のラクトフェリシンB（LF-B）処理による生残率CFUの比較。データは3サンプルの平均±SDで表した。バーの上の*印は、浸透圧を保護した細胞と浸透圧ストレスを与えた細胞の間でCFUに有意差がないこと（$P>0.05$, Student's *t*-test）を示す。

３－３．細胞懸濁液の pH 変動

ラクトフェリシン B で誘導される *C. albicans* 細胞懸濁液の pH 変動を測定した（図３－２）。薬剤添加前の細胞懸濁液の pH は約 5.3 であった。ラクトフェリシン B 添加直後に、濃度に依存して pH が上昇した。10 μg/ml（3.2 μM）のラクトフェリシン B を添加後 5 分で、pH が約 6.0 になった。同じレベルの pH 変化は硝酸ミコナゾール 40 μg/ml (83.5 μM) の添加で見られた。

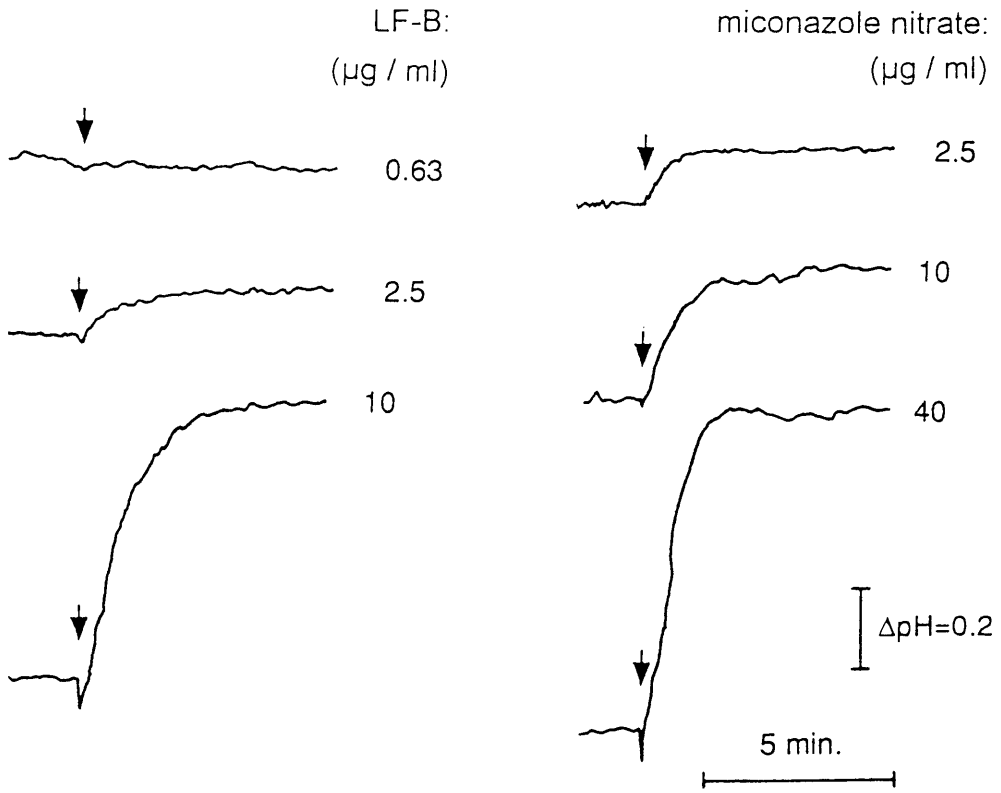


図３－２．ラクトフェリシン B（LF-B）と硝酸ミコナゾールで誘導される *C. albicans* 細胞懸濁液の pH 変動。薬剤は矢印で示した時点で添加した。上向きのカーブは pH の上昇を示す。

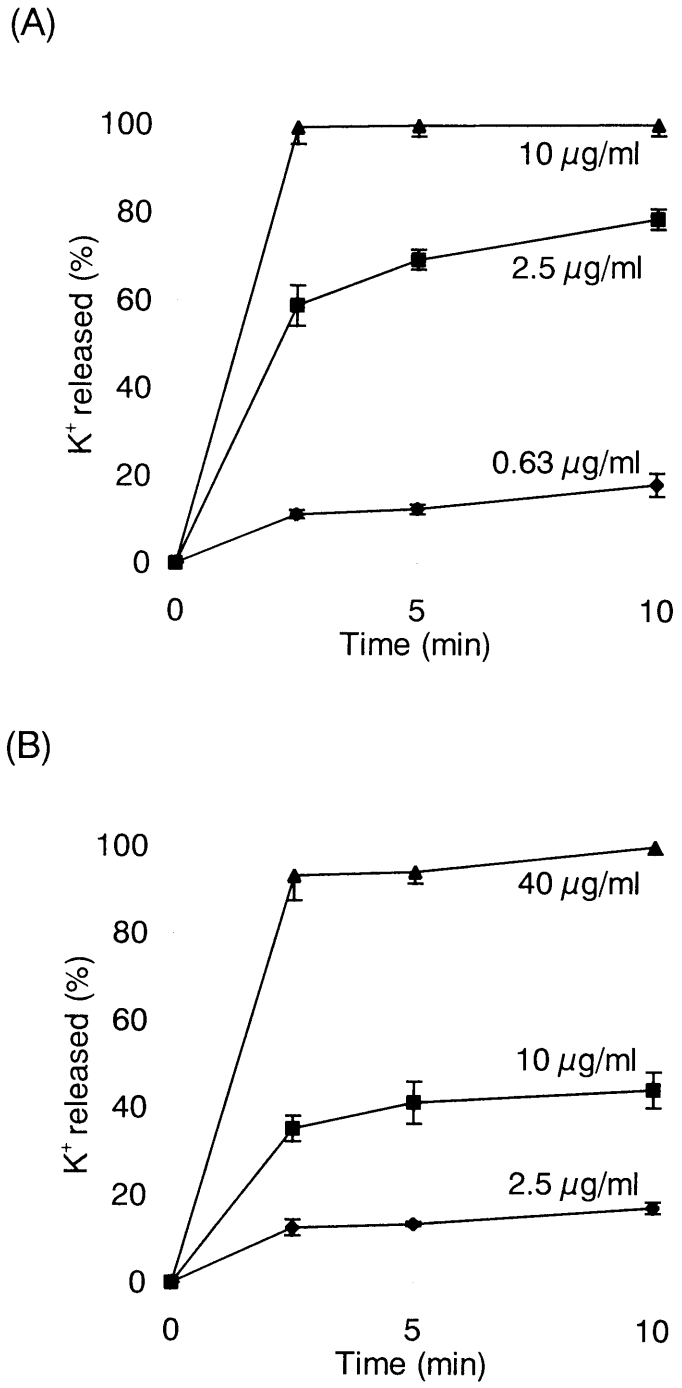


図３－３．ラクトフェリシン B（A）と硝酸ミコナゾール（B）により誘導される *C. albicans* 細胞からの K^+流出。図中の数字（μg/ml）はそれぞれの薬剤の最終濃度を示している。データは 3 サンプルの平均±SD で表示した。

３－４．細胞からの K^+ の流出

ラクトフェリシン B 10 μg/ml は 2.5 分でほとんど全ての細胞内 K^+ の流出を引き起こした（図３－３）。K^+ の流出量は添加したラクトフェリシン B の濃度に依存した。10 μg/ml のラクトフェリシン B によるのと同等の効果は 40 μg/ml の硝酸ミコナゾール処理で観察された。K^+ の流出量はラクトフェリシン B と同様、硝酸ミコナゾールの濃度に依存していた。

４．考察

本試験においてラクトフェリシンBの広い範囲の病原性真菌株に対する抗菌スペクトルと、抗真菌メカニズムを検討した。ラクトフェリシン B の *C. albicans*（Bellamy *et al.*, 1993b）と他のいくつかの真菌株（Bellamy *et al.*, 1994）に対する効果についての以前の報告では、MIC の測定のために液体希釈法が用いられていた。本研究では寒天希釈法を用いた。*C. albicans*、*Aspergillus fumigatus*、*A. niger*、*Rizopus oryzae*、*Trichophyton mentagrophytes*、*T. rubrum* に対する MIC は、PYG 培地（1% Bactopeptone, 0.05% yeast extract, 1% glucose）を用いた以前の報告とほぼ同じであった。しかし *Trichophyton cutaneum* に対する MIC は以前の報告より低かった。この違いは用いられた菌株の違いによるものと思われる。

C. albicans を用いた試験で、ラクトフェリシン B で誘導された生残能の低下は浸透圧保護剤が存在してもブロックされなかった。このことから、ラクトフェリシン B の殺菌作用は、細胞壁構造の破壊や細胞壁合成の阻害を介して、浸透圧ストレスにより壊れやすい細胞を誘導することによっているのではないことが示される。

ラクトフェリシン B は *C. albicans* 細胞からの K^+ 流出を誘導し、細胞懸濁液の pH 上昇を引き起こした。この pH の上昇は、K^+ の細胞外への流出とそれに伴

なう細胞外 H^+の細胞内への流入の結果であると思われる。同様の作用はミコナゾールのようなイミダゾール類でも報告されている（Cope, 1980）。これらの薬剤は真菌細胞膜の構成因子であるエルゴステロールの合成を阻害するだけでなく、高濃度では細胞膜障害を引き起こす。そのため本試験では、ラクトフェリシン B の作用を硝酸ミコナゾールと比較した。ラクトフェリシン B は硝酸ミコナゾールの約 4 倍（モル・ベースでは約 26 倍）の活性を示した。これらの結果はラクトフェリシン B が *C. albicans* 細胞膜に対して強い障害作用を示すことを示唆している。

細胞外から細胞内への H^+の流入は、細胞の proton motive force を破壊し、以前に *T. rubrum* で示されているように、グルコースなどの proton motive force に依存したトランスポートを抑制する可能性がある（Bellamy *et al.*, 1994）。ラクトフェリシン B の真菌細胞への結合（Bellamy *et al.*, 1993b）は細胞膜機能の障害へと続く最初の過程であるだろう。以前の報告はまた、ラクトフェリシン B が真菌の構造的変化、autolysis のように見える細胞質内の凝集物の出現を引き起こすことも示している（Bellamy *et al.*, 1993b; Bellamy *et al.*, 1994）。H^+の細胞内流入は細胞質を酸性化する。これが細胞質内のプロテアーゼやヌクレアーゼを活性化し、autolysis を引き起こすのだろう。通常、真菌細胞の autolysis は細胞壁の lysis を伴なわない。このことはラクトフェリシン B が浸透圧ストレスで壊れやすい細胞壁を誘導しなかったことと辻褄が合う。

本研究で、広範囲の病原性真菌に対するラクトフェリシン B の抗菌活性を調べ、黒色真菌、二形性真菌、病原性酵母のいくつかの菌種が感受性を示すことを明らかにした。今後、in vivo での真菌感染に対するラクトフェリシン B の防御効果を評価する必要がある。また、細胞膜障害を含む *C. albicans* に対するラクトフェリシン B の殺菌メカニズムを示した。ラクトフェリシン B の配列に含

まれる 6 残基のペプチド RRWQWR-NH_2 は抗菌活性を有することがすでに報告されている（Tomita *et al*., 1994）。このためラクトフェリシン B の構造と活性に基づいた新しい膜障害性抗菌剤をデザインすることが可能だろう。

5．まとめ

ラクトフェリシン B の抗真菌スペクトル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 0.63～10 μg/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 μg/ml）。ラクトフェリシン B は病原性酵母 *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 μg/ml は *C. albicans* からの急速な K^+の流出と細胞外液の pH の上昇を引き起こした。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、ラクトフェリン由来のペプチドがこの酵母に対して強い膜障害活性を示すこと、in vivo において酵母感染に対する治療剤として有用かもしれないことを示唆している。

第４章　ラクトフェリシン誘導体の抗真菌･抗細菌･抗酸化活性

１．はじめに

ラクトフェリシン B やラクトフェリシン H より短いアミノ酸配列を有するラクトフェリシン関連ペプチドがいくつか報告されているが、その抗菌活性はもとのラクトフェリシン B、H と同程度か弱いものである（Chapple *et al.*, 1998; Hoek *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1996; Odell *et al.*, 1996）。そのため、本研究ではより抗菌性の高いラクトフェリシン関連ペプチドを合成することを試みた。これまで抗菌ペプチドの抗菌活性の向上のために、アミノ酸、特に疎水性、塩基性アミノ酸を置換するという方法が取られてきた。本章では、脂肪酸を比較的短いペプチドに導入するという全く新しいアプローチにより、膜との親和性を高め、第３章に示したような膜障害性による抗菌活性を高められると考えた。ラクトフェリシン B のコア部分の９残基ペプチドを N アシル化、D 体化することで抗菌性が向上することを示す（Wakabayashi *et al.*, 1999a）。

一方、ラクトフェリシン B は抗菌性以外にもいくつかの生物活性を示すことが報告されている。ラクトフェリシン B は腫瘍の転移や LPS に誘導される単球からの IL-6 産生を抑制する（Yoo *et al.*, 1997; Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996）。また好中球からの IL-8 産生を高める（Shinoda *et al.*, 1996）。これらの活性はラクトフェリン自体でも見られるものであることから、ラクトフェリシンがラクトフェリンの様々な機能を代表するペプチドであることが示唆される。またラクトフェリン分子内のラクトフェリシン部位はある種の生理活性物質や細胞との結合に関わっている（Elass-Rochard *et al.*, 1995; Legrand *et al.*, 1992）。

これまでの研究で、Fe^{3+}とアスコルビン酸により誘導されるリポソームリン脂質の過酸化の系において、ラクトフェリンが酸化抑制効果を示すことが報告されている（Gutteridge *et al.*, 1981; Shinmoto *et al.*, 1992）。この系における脂質過酸化のメカニズムは次のように推測される。Fe^{3+}はアスコルビン酸によって還元されて Fe^{2+}になる。ラクトフェリンは Fe^{3+}をキレートして触媒作用をブロックするため、これ以降の反応が抑制される。Fe^{2+}が存在すると、O_2 は O_2^-や H_2O_2 を産生し、H_2O_2 と LOOH（lipid hydroperoxide）は HO·と LO·に変換する（Nakano and Sakurai, 1990; Halliwell, 1991）。これらの産物は最終的に細胞毒性のある lipid aldehyde となり、チオバルビツール酸反応物質（TBARS）やマロンジアルデヒド（MDA）として検出されるようになる。Matsue ら（1995）はペプシンなどのプロテアーゼで処理したラクトフェリン分解物は、ラクトフェリンと同様に、DNA、ブレオマイシン、Fe^{2+}またはアスコルビン酸を含む溶液中の MDA 酸生を抑制することを報告した。ラクトフェリシンはラクトフェリンの鉄結合部位を含まないが、多機能性を示すペプチドである。このため、本試験において鉄/アスコルビン酸誘導性のリポソームリン脂質過酸化の系でラクトフェリシン B がラクトフェリン同様、TBARS 産生を抑制するかどうかを確かめた。また同時に、上述した 9 残基ペプチドをアシル化した誘導体についても本実験系での効果を調べ、より高活性のペプチド誘導体が得られるかどうか検討した（Wakabayashi *et al.*, 1999b）。

２．材料と方法

２－１．ペプチドの調製

本試験で用いたラクトフェリシン関連ペプチドとコントロールとして用いた他の抗菌ペプチドを表４－１に示す。ラクトフェリシン B は第２章で示した

方法で調製した。(Ala^{8,13,18})-magainin II-NH_2（Chen *et al.*, 1988）は Sigma Chemical Co.より購入した。他のペプチドは自動合成機（433A, Perkin-Elmer Japan Co. Applied Biosystems Divison, Chiba, Japan）を用いて化学合成した。9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)による固相法により、4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-animomethyl) phenoxyacetamido-ethyl レジンまたはプレロード HMP レジン（Perkin-Elmer）上に合成した。ペプチドの N アシル化のために、レジンを HOBt/HBTU エステルとして活性化した目的の脂肪酸で処理した。レジンと側鎖保護基を除去した後、クルードのペプチドを逆相 HPLC で精製した。最終産物の構造は質量分析（LCQ, Finnigan Mat）により確認した。全てのペプチドは水に溶解性を示した。

表４－１．本試験に用いたペプチド誘導体の構造

Peptide name	Structure [a]
LFcin B	**FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF**
LFcin H(25mer)	**TKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDS**
(4-12)-NH_2	**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl6-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_4CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl10-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_8CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl11-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_9CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl14-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{12}CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl16-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{14}CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl18-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{16}CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
D(4-12)-NH_2	D-(**RRWQWRMKK**)-NH_2 [b]
Acyl10-D(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_8CO$-D-(**RRWQWRMKK**)-NH_2 [b]
Ac-RRWWCR-NH_2	CH_3CO-**RRWWCR**-NH_2
(Ala^{8,13,18})-magainin II-NH_2	**GIGKFLHAALLFAKAFVAEIMNS**-NH_2

a アミノ酸は太字の一文字表記で示した。b D は D 体化ペプチドを示す。

２－２．試験菌株

Escherichia coli IID861、*Pseudomonas aeruginosa* IFO3445、*Staphylococcus aureus* JCM2151 (ATCC6538P)は標準寒天培地（Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan）スラント上で維持した。ストックカルチャーを 1% Bactopeptone に分取し、37℃、7 時間培養して試験菌液を得た。*Candida albicans* TIMM0144 と *Trichophyton mentagrophytes* TIMM1189 は試験前に、サブロー･グルコース寒天スラント上で 27℃で培養した。

２－３．抗菌感受性試験

MIC は 96 穴マイクロプレートを用いた微量液体希釈法により測定した。培地として、1% Bactopeptone とミューラーヒントンブロス（Difco）を細菌用に、サブロー･グルコース･ブロスを真菌用に用いた。細菌細胞は最終細胞濃度 10^6/ml となるようにマイクロプレートに添加し、37℃で 17 時間培養した。C. *albicans* 細胞はスラントから回収し培地に懸濁し、10^5/ml となるようにマイクロプレートに添加し 37℃で 17 時間培養した。*T. mentagrophytes* の分生子はスラントから 0.05% Tween 80 入り生理食塩水に回収し、10^4/ml となるようにマイクロプレートに添加し 27℃で 4 日間培養した。MIC は n=3 で測定した。

２－４．抗酸化性試験

TBARS 産生のアッセイは Gutteridge の方法を改変して行った（Gutteridge, 1977）。10 mM HEPES、0.15 M NaCl (pH7.4)中で 5 mg/ml の卵黄レシチンを窒素大気下、37℃、5 分激しく撹拌し、4℃、1 時間放置することでリポソームを得た。上清 0.5 ml ずつを試験管に分注した。試験管に、50 μl の 112 μM

$FeNH_4(SO_4)_2$、50 μl の 532 μM アスコルビン酸、100 μl の試験サンプル液を加え、5 秒間激しくミックスした。試験液は 37℃で 1 または 2 時間インキュベートした。それぞれの試験管に、3 ml の 1.0% 亜ヒ酸入り 2.9 M HCl を加えた。試験管をミックスし、15 分、2500 *g* で遠心し、3 ml の清澄な上清を除去し、1 ml の 0.05 M NaOH 中 1%チオバルビツール酸に加え、沸騰水中で 15 分間加熱した。冷却後、濁りをフィルターにより除去し、532 nm の吸光度を計測することで TBARS 値を求めた。有意差検定は unpaired two-tailed の *t* 検定によって行った。

3．結果

2－1．抗菌性

ペプトン培地中での 5 菌種に対するラクトフェリシン関連ペプチドの MIC を表４－２に示す。ラクトフェリシン B と相同なアミノ酸配列部分に対応する LFcin H(25mer)は全ての試験菌に対してラクトフェリシン B より低活性を示した。ラクトフェリシン B 中の塩基性アミノ酸の多い領域 RRWQWRMKK（R4-K12 に相当）をもとにペプチド誘導体を合成し、抗菌活性をアッセイした。炭素鎖 6-11 の N アシル化誘導体はラクトフェリシン B と同等かより高い活性を示した。炭素数 11 のペプチドは最も活性が高く、ラクトフェリシン B の 1/2 から 1/4 の MIC を示した。(4-12)-NH_2 の D 体である D(4-12)-NH_2 も、Acyl11-(4-12)-NH_2 と同等の高い活性を示した。しかし、D 体ペプチドを N アシル化することでさらに活性を高めることはできなかった。Ac-RRWWCR-NH_2 は合成ペプチド混合ライブラリーから最も抗菌性の高い 6 残基ペプチドとして同定され（Houghten *et al.*, 1991）、ラクトフェリシン B の RRWQWR 領域とシークエンス相同性を有する。このペプチドはラクトフェリシン B よりやや低い活性を示した。(Ala^{8,13,18})-magainin II-NH_2 はオリジナルの magainin II より数百倍高い抗菌性

を示す23残基のペプチドとして報告された（Chen *et al.*, 1988）。このペプチドの活性は Acyl11-(4-12)-NH_2 と同等であった。ミューラーヒントンブロス中で、ラクトフェリシン B は特にグラム陰性菌に対する活性を低下させたが、N アシル化誘導体の高活性と炭素鎖に依存した活性はより明確に示された（表４－３）。Acyl10-(4-12)-NH_2 と Acyl11-(4-12)-NH_2 はラクトフェリシン B より 4 から 8 倍低い MIC を示した。

表４－２．ペプトン･ブロス中でのラクトフェリシン関連ペプチドの in vitro 抗菌活性

Agent	MIC (μg/ml)				
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*C. albicans*	*T. mentagrophytes*
LFcin B	6	12	12	25	12
LFcin H(25mer)	25	50	25	100	50
(4-12)-NH_2	6	25	6	25	6
Acyl6-(4-12)-NH_2	3	25	6	25	6
Acyl10-(4-12)-NH_2	3	6	6	25	6
Acyl11-(4-12)-NH_2	3	6	3	12	6
Acyl14-(4-12)-NH_2	6	12	12	25	12
Acyl16-(4-12)-NH_2	6	12	12	50	12
Acyl18-(4-12)-NH_2	6	25	12	100	12
D(4-12)-NH_2	3	12	3	6	6
Acyl10-D(4-12)-NH_2	3	6	3	12	6
Ac-RRWWCR-NH_2	12	25	12	50	6
($Ala^{8,13,18}$)-magainin II-NH_2	3	6	3	25	12

表４－３．ミューラーヒントン･ブロス中でのラクトフェリシン関連ペプチドの in vitro 抗菌活性

Agent	MIC (μg/ml)		
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
LFcin B	50	>200	25
LFcin H(25mer)	>200	>200	>200
Acyl6-(4-12)-NH_2	100	>200	100
Acyl10-(4-12)-NH_2	6	50	6
Acyl11-(4-12)-NH_2	12	50	3
Acyl14-(4-12)-NH_2	12	50	12
Acyl16-(4-12)-NH_2	25	50	12
Acyl18-(4-12)-NH_2	50	100	25
D(4-12)-NH_2	50	>200	12
Acyl10-D(4-12)-NH_2	12	100	6
Ac-RRWWCR-NH_2	100	>200	25

２－２．抗酸化性

リポソームリン脂質の 2 時間インキュベーションによる過酸化の系で、TBARS 産生に対するラクトフェリン関連物質の効果を調べた（図４－１）。Fe^{3+}とアスコルビン酸をこの系に添加することで TBARS が産生された。Fe^{3+}とアスコルビン酸の存在下で、ラクトフェリンとポジティブコントロール、DL-α-トコフェロールはこれまでの報告通り（Gutteridge *et al.*, 1982; Shinmoto *et al.*, 1992）反応を抑制した。ラクトフェリシン B はラクトフェリンより効果は弱いが TBARS 産生量を低下させた。

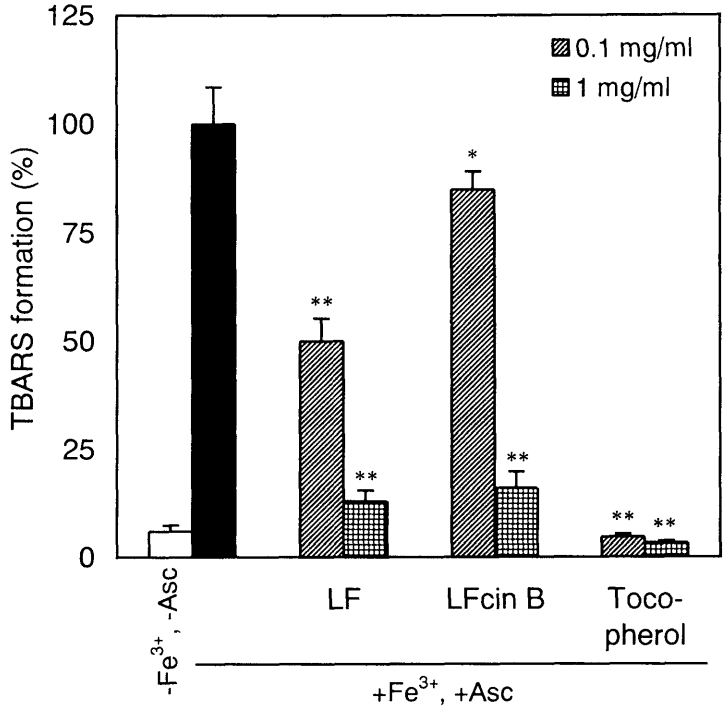


図４－１．リポソームリン脂質でのTBARS生成に対するラクトフェリンとラクトフェリシンBの効果。試験物質はFe^{3+}イオンとアスコルビン酸(Asc)と共にリポソーム系で2時間インキュベートした。生成したTBARSは532 nmの吸光度により測定し、5テストの平均±SDを、Fe^{3+}イオンとアスコルビン酸のみのコントロールに対する%で表示した。データはコントロールとの間で統計学的に解析した。* $P<0.05$、** $P<0.005$。

表４－４．ラクトフェリシン誘導ペプチドと参照物質のTBARS生成への効果

Compounds	TBARS formation (%) at indicated concentration (mg/ml)			
	0.001	0.01	0.1	1
LFcin B	ND [a]	ND	93.1	25.2
LFcin B(14-25)	ND	ND	129.9	159.9
Acyl6-(4-12)-NH_2	102.5	88.1	45.1	12.7
Acyl10-(4-12)-NH_2	96.0	40.8	13.3	8.1
Acyl14-(4-12)-NH_2	92.0	40.8	9.8	12.1
Acyl16-(4-12)-NH_2	91.0	37.3	10.4	12.1
Acyl18-(4-12)-NH_2	83.8	24.3	11.3	14.6
D(4-12)-NH_2	ND	ND	85.5	83.3
Acyl10-D(4-12)-NH_2	89.3	49.5	13.9	7.7
Ac-RRWWCR-NH_2	ND	ND	64.6	10.2
DL-α-Tocopherol	49.5	16.7	6.4	4.2
o-Phenanthroline	27.7	31.6	16.9	11.5
Quin 2	47.6	7.3	6.7	6.1
SOD	99.0	109.4	119.5	115.2

試験物質はFe^{3+}イオンとアスコルビン酸(Asc)と共にリポソーム系で1時間インキュベートした。生成したTBARSは532 nmの吸光度により測定し、Fe^{3+}イオンとアスコルビン酸のみのコントロールに対する%で表示した。

a ND: 測定せず。

ラクトフェリシン関連ペプチドの酸化反応への効果を調べるために、表４－１に示した合成ペプチドを試験した。表４－４は、1 時間のインキュベーシ

ョンでの TBARS 産生へのこれらのペプチドと参照物質の効果を示す。DL-α-トコフェロールと 2 つの金属キレート剤、o-phenanthroline、Quin 2 は顕著な抑制効果を示したが、O_2^-スカベンジャーの SOD はむしろ促進効果を示した。合成ペプチドの中で、塩基性アミノ酸の少ないラクトフェリシン B の C 末端側に相当する LFcin B(14-25)は TBARS 産生を増加させた。ラクトフェリシン B のコア部分 9 残基の N アシル化誘導体は反応を効果的に抑制し、その効果はラクトフェリシン B の 100 倍程度低い濃度でも明らかだった。これらのペプチドの抑制効果はアシル基の炭素鎖の長さに依存し、長い炭素鎖を持つものがより高い効果を示した。LFcin B(4-12)-NH_2アシル化体の D 体は L 体と同等の効果を示した。参照物質として調べた塩基性抗菌ペプチド、Ac-RRWQWR-NH_2 も TBARS 産生を抑制した。

3．考察

3－1．ラクトフェリシン誘導体の抗菌活性

N アシル化によりラクトフェリシン B 誘導体と微生物細胞膜との相互作用が高まり、強い抗菌活性に結びついたと思われる。適切なアミノ酸の置換が抗菌ペプチドの活性を高めることが知られている（Chen *et al.*, 1988; Kang *et al.*, 1996）。しかし、比較的短いペプチドを用いた N アシル誘導体化のアプローチは比較的長いペプチドと比較して合成過程を簡略化させることができる。Ca^{2+}と Mg^{2+}イオンは 2 mM 以上でラクトフェリシン B の活性を低下させることが知られている（Bellamy *et al.*, 1992b）が、これらのイオンは、ミューラーヒントン・ブロス中でのこのペプチドの MIC の上昇とは関係ないと思われる。ミューラーヒントン・ブロス中の Ca^{2+}と Mg^{2+}の濃度は低く（それぞれ 0.15, 0.21 mM）、1% Bactopeptone 中のそれとほぼ同じである。他の成分がミューラーヒントン・

ブロス中でのラクトフェリシン B の活性の低下に関わっている可能性がある。そして N アシル化誘導体はこうした培地成分によるブロッキング効果に影響を受けにくいものと思われる。D 体ペプチドは微生物から分泌されるプロテアーゼにより分解されないだろう。本試験の結果は以前の報告と同様 D 体化誘導体の抗菌作用における有効性を示している（Alvarez-Bravo, 1994; Chapple *et al.*, 1998; Wade *et al.*, 1990）。

11 残基のラクトフェリシン B アナログの赤血球溶血活性は非常に低いことが報告されている（Kang *et al.*, 1996）。また予備的評価で、D(4-12)-NH_2 は微生物を抑制する濃度では動物細胞に対して毒性を示さなかった。経口投与は、本試験の誘導体を臨床使用する場合の投与経路の 1 つの候補である。N アシル化、D 体化誘導体のマウスへの経口投与は、100 mg/kg body の高いドーズでも致死的毒性は示さなかった（未発表データ）。

３－２．ラクトフェリシン誘導体の抗酸化活性

本試験において、ラクトフェリシン B はラクトフェリンと同様に抗酸化活性を示した。これはこれまでに報告のあった他の生物活性での知見と一致する（Yoo *et al.*, 1997; Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996; Shinoda *et al.*, 1996）。本試験の結果はラクトフェリシンがラクトフェリンの多機能性ドメインとして働くという仮説を支持する。1 分子のラクトフェリンはラクトフェリシン部位とは異なる結合部位で 2 原子の Fe^{3+}を結合する。しかし、ラクトフェリンは過剰量の Fe^{2+}を溶液中で可溶にし、ラクトフェリンが多数の Fe^{2+}イオンを結合しうることが報告されている（Nagasako *et al.*, 1993）。またラクトフェリンのペプシン分解物は DNA、ブレオマイシン系で Fe^{2+}により誘導される MDA 生成を抑制する（Matsue *et al.*, 1995）。これらの知見は、ラクトフェリシン B が厳密なキレート

とは異なる方法で Fe^{2+}と相互作用し、脂質の過酸化を抑制していることを考えさせる。Matsue らはまた、ラクトフェリンがアスコルビン酸と結合することが、鉄/アスコルビン酸による過酸化系での抗酸化作用のメカニズムの 1 つになっていることを示唆している（Matsue *et al.*, 1995）。ラクトフェリシン B の抗酸化作用のメカニズムを明らかにするために、このペプチドの鉄やアスコルビン酸との相互作用を調べる必要がある。参照物質として調べた塩基性抗菌ペプチドの Ac-RRWWCR-NH_2 も TBARS 生成を抑制した。本試験ではラクトフェリシン B のコア･シークエンス RRWQWRMKK に疎水性基を付けたものについても抗酸化活性を調べた。N アシル化ペプチドは強く TBARS 生成を抑制した。ペプチドのアシル化によってリポソームリン脂質と強いアフィニティーが生まれたことが理由として考えられる。多くの生理学的に重要なペプチドやタンパク質は脂肪酸を共有結合していることが知られており、そのことはしばしば生物活性や、細胞膜との安定した結合のために必要である（Towler and Gordon, 1988; Branton *et al.*, 1993）。非アシル化ペプチドへのアシル基の導入はリン脂質膜との強い相互作用を引き起こすことが報告されている（Niidome *et al.*, 1996）。本研究の結果はアシル化ペプチドのこれまでに知られていない生物活性、抗酸化性を示すものである。

5．まとめ

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 RRWQWRMKK の N アシル化、D 体化ペプチド誘導体は、細菌と真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、ラクトフェリシン B の 2 から 8 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 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。

第５章　ラクトフェリン関連物質と抗真菌剤との相乗的抗カンジダ作用

１．はじめに

C. albicans はヒトにおいて全身性あるいは皮膚粘膜の感染症を引き起こす日和見感染菌である。粘膜の *Candida* 感染の中で、口腔咽頭カンジダ症は AIDS 患者のような免疫不全の宿主における重大な臨床上の問題となっている（Odds *et al.*, 1990）。*C. albicans* は酵母状細胞と菌糸状細胞の二形性を示す。*C. albicans* の菌糸状細胞は酵母状細胞より粘膜細胞への接着性が高いため、宿主の組織に侵入し病変を起こしやすいと考えられる（Odds, 1988）。このため菌糸状発育をターゲットとした抗菌剤による治療法が必要である。

アゾール系抗真菌剤は表在性および深在性の真菌症の化学療法に最も広く使われる、主として静菌的に働く薬剤である。イミダゾール環を有する薬剤、イミダゾール系抗真菌剤は、主として表在性真菌症に対する外用剤として用いられている。トリアゾール環を有するトリアゾール系抗真菌剤は、主に深在性真菌症に対する経口、注射剤として用いられている。なかでもトリアゾール系抗真菌剤のフルコナゾールとイトラコナゾールは、その有効性の高さと低い毒性のために *Candida* 属による深在性感染症の治療によく使われる（Hay, 1990）。アゾール系抗真菌剤は、発育を部分的に阻止するような低濃度で *C. albicans* の菌糸状発育に影響を与えることが知られている（Odds *et al.*, 1985）。しかし、末期の AIDS や慢性皮膚粘膜カンジダ症のような極度に免疫力の低下した患者では、フルコナゾールによる断続的な治療がこれらの薬剤に耐性の *Candida* を出現させている（Rex *et al.*, 1995）。ある種の抗真菌剤はアゾール耐性 *C. albicans* に有効

性を示すことが報告されているが、これらの研究は主として酵母状に発育する条件下で得られた結果である（Martinez-Suarez and Rodriguez-Tudela, 1996; Ruhnke *et al.*, 1997）。菌糸状に発育する細胞に焦点を当てた研究が、この形態の病原性における重要性から必要と考えられる。

ある種の抗菌剤は生体防御因子と協力して生体に侵入した病原菌を抑制するようである。粘膜分泌中や血中（感染時）に存在するラクトフェリンが、投与された抗真菌剤の効果に影響を及ぼすのか、ラクトフェリンやその活性ペプチドと抗真菌剤との併用療法は有効なのかを検討するために、本試験では、初めに *C. albicans* 臨床分離株の酵母状発育条件下で、ラクトフェリンやそのペプチドと、各種抗真菌剤との間の in vitro 併用効果を調べた（Wakabayashi *et al.*, 1996b）。これにより、ラクトフェリン類とアゾール系抗真菌剤の間で相乗効果が確認されたため、次ぎにアゾール耐性株を含む *C. albicans* 臨床分離株の菌糸状発育条件下で、ラクトフェリン類とトリアゾール系抗真菌剤との併用効果を調べた（Wakabayashi *et al.*, 1998）。

２．材料と方法

２－１．ラクトフェリシン関連物質

ウシラクトフェリン、ウシラクトフェリン･ペプシン分解物、ラクトフェリシン B は、第 2 章に示す方法で調製した。ラクトフェリン分解物からラクトフェリシン B を除いた画分、LF(-)は、ラクトフェリン分解物から HPLC により繰り返しラクトフェリシン B を除去することで得た。全てのラクトフェリン関連物質は滅菌水に溶解させた。

２－２．抗真菌剤

アンホテリシンBとクロトリマゾールはSigma Chemical Co.より購入した。ナイスタチンとフルシトシンはNakalai Tesque Co. (Kyoto)より購入した。ケトコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾールはそれぞれNizoral® Cream (Kyowa Hakko Co., Tokyo)、Itrizole® Capsules 50 (Kyowa Hakko)、Diflucan® Capsules (Pfizer Pharmaceutical Japan, Tokyo) から抽出した。フルシトシン、イトラコナゾール、フルコナゾールはそれぞれ滅菌水、0.1 N HCl 添加 DMSO、PBS に溶解させた。他の抗真菌剤は、DMSO に溶解させた。

２－２．*C. albicans* 株

アゾール感受性菌として次の菌株を用いた。ATCC90028（National Committee for Clinical Laboratory Standards document M27-T, 1995 による推奨株）、TIMM1768（血清型 A の臨床分離株、帝京大学医真菌研究センター、Tokyo, Japan）。アゾール耐性菌として次の菌株を用いた。TIMM3164（中等度の耐性株、AIDS 患者より分離）、TIMM3315、TIMM3317（高度耐性株、血液病患者から継続して分離）。使用前に菌株をストックカルチャーからサブロー･グルコース寒天（1% Bactopeptone, 2% glucose, 1.5% agar）に移し 28℃で培養した。それぞれの株の抗真菌剤に対する感受性は document M27-T にしたがって確認した（National Committee for Clinical Laboratory Standards document M27-T, 1995）。

２－３．酵母状発育条件下での抗 *Candida* 活性の測定

抗真菌剤とラクトフェリン関連物質の酵母状発育条件下での *C. albicans* TIMM1768 に対する発育阻止活性は微量液体希釈法により測定した（Uchida, 1991）。*C. albicans* の酵母状細胞をサブロー･グルコース寒天スラントから分取し、生理食塩水で洗浄、サブロー･グルコース･ブロス（1% Bactopeptone, 2% glucose,

pH 6.5）に 10^5 細胞/ml の菌数で懸濁した。20 μl の *Candida* 懸濁液、10 μl のラクトフェリン関連物質ストック液、2 μl の抗真菌剤ストック液、168 μl のサブロー・グルコース・ブロスを混合し、37℃で 17 時間培養した。試験濃度のラクトフェリン関連物質の添加は培地の pH をやや上昇させた（⊿0.1-0.2）。抗真菌剤の溶解に用いた溶媒の培地への添加（1%）は *Candida* の発育に影響しないことを確認した。培養開始時と終了時に、n=3 のサンプルの 630 nm での吸光度を測定し、その差を *Candida* 発育量とした。*C. albicans* の発育阻止%は次のように計算した：[（1－薬剤存在下での *C. albicans* 吸光度／*C. albicans* 単独での吸光度）×100]（%）。80%発育阻止濃度を最小発育阻止濃度（MIC）とした。

２－４．菌糸状発育条件下での抗 *Candida* 活性の測定

2.5% 非働化 FCS、20 mM HEPES、2 mM L-glutamate、16 mM sodium hydrogen carbonate を添加した RPMI1640 を *C. albicans* の菌糸状発育を促進する培地として使用した（RP medium）。*C. albicans* の酵母状細胞をサブロー・グルコース寒天スラントから分取し、生理食塩水で洗浄、RP medium に 10^5 細胞/ml となるように懸濁した。96 穴平底マイクロプレートのウェルに 20 μl の *Candida* 懸濁液、10 μl のラクトフェリンまたはラクトフェリシン B ストック液、2 μl の抗真菌剤ストック液、168 μl の RP medium を加え、5% CO_2 大気中、37℃で、15 時間培養した。*C. albicans* の菌糸状発育量を測定するために、文献に示す方法でクリスタル・バイオレット（CV）染色法を行った（Abe *et al.*, 1994; Okutomi *et al.*, 1997）。その方法を略記すると、ウェル中の培地を除去し、接着している *Candida* の菌糸を 70% エタノールで固定する。菌糸を 0.02% CV で染色し、水で洗浄する。マイクロプレートを乾燥し、0.04 N HCl 入りイソプロパノール 150 μl と 0.25% SDS 50 μl をウェルに添加し、混合する。n=3 のサンプルで 550-630 nm の吸光度を測

定する。フルコナゾールとラクトフェリン関連物質については、薬剤無添加での発育に対して80%発育を阻止した最小濃度をMICとした。イトラコナゾールはアゾール耐性 *C. albicans* に対して部分的発育阻害を起こしたので、90%発育阻止濃度をMICとした。

２－５．チェッカーボード法による解析

併用効果の評価のために、標準法にしたがってチェッカーボード法を使用した（Eliopoulos and Moellering, 1991）。併用した薬剤それぞれのMIC値を算術スケール上にプロットした。fractional inhibitory concentration (FIC) index は次のように計算した：（併用下での薬剤Aの最小阻止濃度／薬剤A単独でのMIC＋併用下での薬剤Bの最小阻止濃度／薬剤B単独でのMIC）。FIC index 値が<1、1 - 4、>4をそれぞれ相乗的、相加的、拮抗的とした。

３．結果

３－１．酵母状発育条件下での抗真菌剤とラクトフェリンの併用効果

３－１節から３－５節まで、酵母状発育条件下で、*C. albicans* TIMM1768に対する、ラクトフェリン、ラクトフェリン分解物、ラクトフェリシンBと、各種抗真菌剤との併用効果を検討した。*Candida* の発育をほとんど阻止しないラクトフェリン100 μg/ml の存在下で、2種類のポリエン類（アンホテリシンB、ナイスタチン）、1種類のフルオロピリミジン類（フルオロシトシン）、2種類のイミダゾール類（クロトリマゾール、ケトコナゾール）、2種類のトリアゾール類（フルコナゾール、イトラコナゾール）の抗 *Candida* 活性を調べた（表５－１）。アンホテリシンB、ナイスタチン、フルシトシンのMICはラクトフェリンを加えても変化しなかった。一方、ケトコナゾールのMICはラクトフェリン存在下

で非存在下での 1/16 に低下した。また他の 3 種のアゾール剤の MIC もラクトフェリンによって 1/4 に低下した。

表５－１．各種抗真菌剤の抗 *Candida* 活性へ及ぼすラクトフェリンの影響

	MIC (ng/ml)	
Antifungal agent	Alone	+LF
AMPH	62.5	62.5
NYS	1000	1000
5-FC	4000	4000
CTZ	50	12.5 (1/4)
KCZ	50	3.1 (1/16)
FLCZ	4,000	1,000 (1/4)
ITCZ	50	12.5 (1/4)

MIC 値はそれぞれの薬剤の 80%発育阻止濃度として決定した。ラクトフェリン（LF）は sub-MIC レベル（100 μg/ml）添加した。薬剤単独時に対するラクトフェリン添加時の MIC の割合をカッコ内に示した。アンホテリシン B（AMPH）、ナイスタチン（NYS）、フルシトシン（5-FC）、クロトリマゾール（CTZ）、ケトコナゾール（KCZ）、フルコナゾール（FLCZ）、イトラコナゾール（ITCZ）。

３－２．抗真菌剤とラクトフェリン分解物の併用効果

Candida の発育をほとんど阻止しないラクトフェリン分解物 50 または 200 μg/ml の存在下での各種抗真菌剤の MIC 値を比較した（表５－２）。アンホテリシン B とナイスタチンの MIC はラクトフェリン分解物の添加で変化しなかった。ラクトフェリン分解物 200 μg/ml の併用により、フルシトシンと 4 種類のアゾー

ル剤でMICが1/4から1/16に低下した。さらにフルコナゾールのMICは50 μg/mlのラクトフェリン分解物存在下でも1/4に低下した。

表５－２．各種抗真菌剤の抗 *Candida* 活性へ及ぼすラクトフェリン分解物の影響

	MIC (ng/ml)		
Antifungal agent	Alone	+LFhyd 50	+LFhyd 200
AMPH	62.5	62.5	62.5
NYS	1,000	1,000	1,000
5-FC	4,000	4,000	1,000 (1/4)
CTZ	50	50	3.1 (1/16)
KCZ	50	50	3.1 (1/16)
FLCZ	16,000	4,000 (1/4)	1,000 (1/16)
ITCZ	50	50	3.1 (1/16)

MIC値はそれぞれの薬剤の80%発育阻止濃度として決定した。ラクトフェリン分解物（LFhyd）はsub-MICレベル（50または200 μg/ml）添加した。薬剤単独時に対するラクトフェリン分解物添加時のMICの割合をカッコ内に示した。

３－３．抗真菌剤とラクトフェリシンの併用効果

Candida 発育に影響しないラクトフェリシンB 3.1 μg/ml存在下で、各種抗真菌剤のMICの変動を調べた（表５－３）。ラクトフェリシンB添加によってアンホテリシンB、ナイスタチン、フルシトシンのMICは変化しなかった。対照的に4種のアゾール系抗真菌剤のMICは1/4に低下した。

表５－３．各種抗真菌剤の抗 *Candida* 活性へ及ぼすラクトフェリシンの影響

Antifungal agent	MIC (ng/ml)	
	Alone	+LF-B
AMPH	62.5	62.5
NYS	1,000	1,000
5-FC	4,000	4,000
CTZ	50	12.5 (1/4)
KCZ	50	12.5 (1/4)
FLCZ	16,000	4,000 (1/4)
ITCZ	50	12.5 (1/4)

MIC 値はそれぞれの薬剤の 80%発育阻止濃度として決定した。ラクトフェリシン B（LF-B）は sub-MIC レベル（3.1 μg/ml）添加した。薬剤単独時に対するラクトフェリシン B 添加時の MIC の割合をカッコ内に示した。

３－４．クロトリマゾールとラクトフェリシンの併用効果における濃度依存性

クロトリマゾールの各濃度存在下での、ラクトフェリン、ラクトフェリン分解物、ラクトフェリシン B、LF(-)による *Candida* 発育阻止活性を調べた（図５－１a-d）。クロトリマゾール単独での *Candida* 発育阻止活性は、12.5 ng/ml では部分的であり、50 ng/ml で 80%阻止を示した。ラクトフェリン単独では 200 μg/ml で完全に発育阻止した。クロトリマゾール 3.1 ng/ml または 12.5 ng/ml 存在下で、ラクトフェリンそれぞれ 100 μg/ml、50 μg/ml の併用で発育が阻止された（図５－１a）。ラクトフェリン分解物、ラクトフェリシン B 単独で、それぞれ 400 μg/ml、12.5 μg/ml で 80%発育阻止を引き起こしたが、3.1-12.5 μg/ml のクロトリマゾールとの併用で、それらは 1/2 から 1/4 に低下した（図５－１b, c）。対照的に LF(-)

は濃度依存的に *Candida* の発育を促進し、その傾向はクロトリマゾール 3.1-50 ng/ml 存在下でも同様に観察された（図５－１d）。

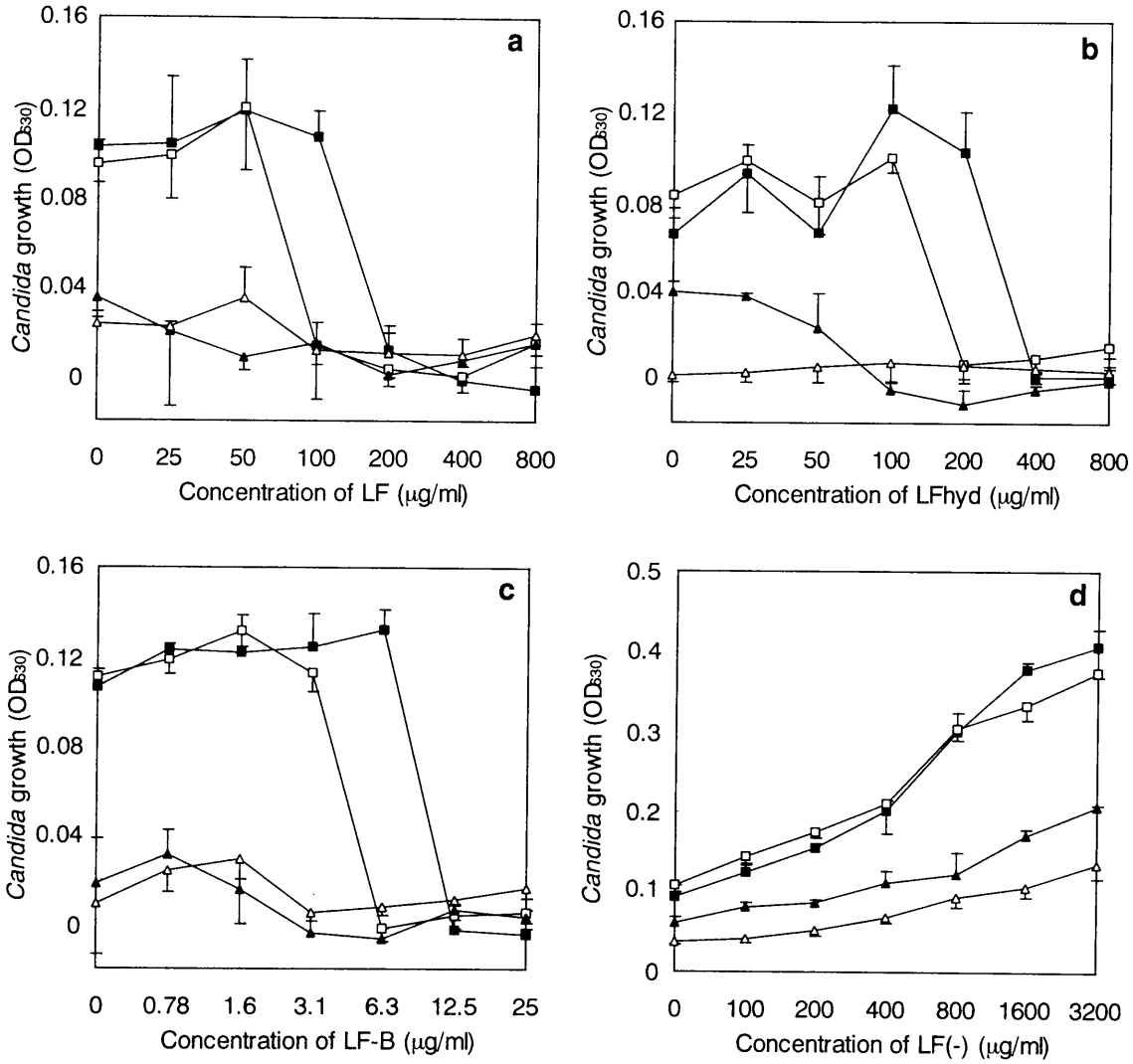


図５－１．クロトリマゾール存在下・非存在下での、ラクトフェリン（LF、パネル a)、ラクトフェリン分解物（LFhyd、パネル b)、ラクトフェリシン B（LF-B、パネル c)、LF(-)（パネル d）による発育阻止効果。*C. albicans* TIMM1768 の発育は OD630 の測定によりモニターした。データは 3 サンプルの平均±SD で表した。クロトリマゾール濃度は 0（■）、3.1（□）、12.5（▲）、50（△）ng/ml。

３－５．チェッカーボード法による併用効果の解析

ラクトフェリン関連物質とクロトリマゾールとの併用効果についてチェッカーボード法により検討した。ラクトフェリンとクロトリマゾールの併用による抗 *Candida* 活性を調べ、80%発育阻止を示すそれぞれの薬剤の濃度をプロットした。図５－２a に示すように、プロットしたカーブは「相乗的」な併用効果を示唆するものだった。この併用による FIC index は 0.187 であり、相乗効果（<1）を示す値であった。ラクトフェリシン B とクロトリマゾールについても同様にプロットしたポイントは相乗性を表すカーブを描いた（図５－２b）。このときの FIC index は 0.190 であり、相乗効果を示した。

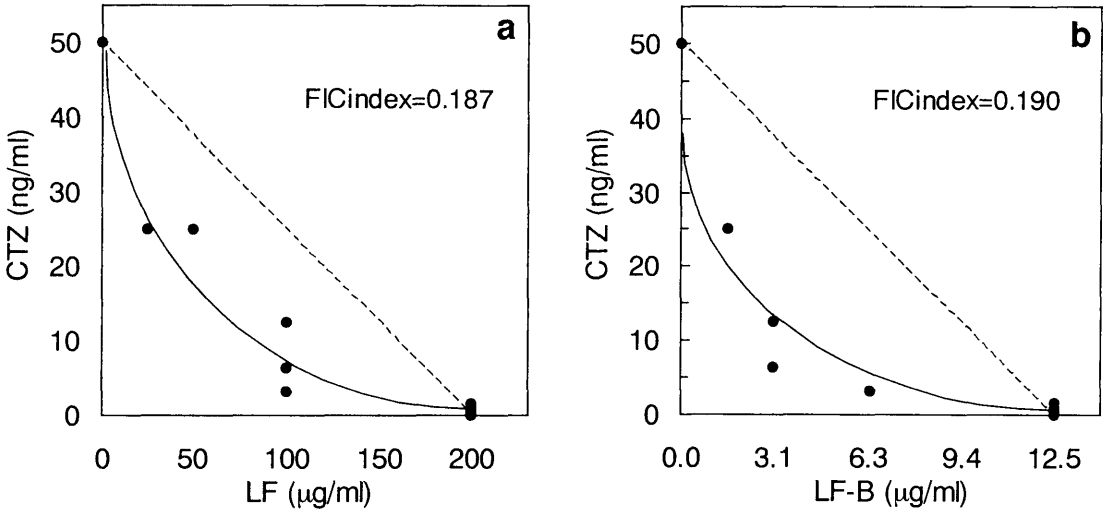


図５－２．ラクトフェリン（LF、パネル a）、ラクトフェリシン B（LF-B、パネル b）とクロトリマゾール（CTZ）との抗 *Candida* 併用効果をチェッカーボード法で解析した。*C. albicans* TIMM1768 に対するクロトリマゾールとラクトフェリン類の併用時の 80%阻止濃度を n=3 で測定し、算術スケール上で黒丸をプロットした。相加的と推定される濃度を破線で示した。それぞれの 2 剤併用についての FIC index をそれぞれのグラフ内に示した。

表５－４．CV 染色法による抗真菌剤、ラクトフェリン（LF）、ラクトフェリシン B（LFcin B）の MIC の測定

	MIC(μg/ml)				
C. albicans strain	Amphotericin B	Fluconazole	Itraconazole	LF	LFcin B
Azole-susceptible					
ATCC90028	0.13	0.25	0.0063	>6400	400
TIMM1768	0.13	0.25	0.0063	6400	400
Azole-resistant					
TIMM3164[a]	0.13	1	0.05	1600	400
TIMM3315	0.25	128	>51	200	50
TIMM3317	0.13	>256	>51	1600	200

a この株の MIC は 630 nm での吸光度により測定した。

３－６．抗真菌剤、ラクトフェリン、ラクトフェリシン B による菌糸状発育の抑制

以下の節において、アゾール感受性および耐性の *C. albicans* 株について、RP medium 中での菌糸状発育に対する抗真菌剤、ラクトフェリン、ラクトフェリシン B の発育阻止効果を CV 染色法により測定した。ただし、TIMM3164 株は菌糸状に発育しなかったため 630 nm の吸光度による発育のモニタリングによって MIC を決定した（表５－４）。TIMM3315 と TIMM3317 の、フルコナゾールとイトラコナゾールに対する高度の耐性がこのアッセイにより観察された。TIMM3164 は中度の耐性を示した。アゾール耐性株の TIMM3164、TIMM3315、TIMM3317 に対するラクトフェリンの MIC はアゾール感受性株 ATCC90028、

TIMM1768 に対するそれより低かった。TIMM3315 と TIMM3317 に対するラクトフェリシン B の MIC もアゾール感受性株より低かった。

３－７．トリアゾール抗真菌剤、ラクトフェリン関連物質の併用による *C. albicans* TIMM3317 への効果

アゾール耐性株 TIMM3317 の菌糸状発育のフルコナゾールおよびイトラコナゾールによる発育阻止作用をラクトフェリンまたはラクトフェリシン B の存在下、非存在下で観察した（図５－３）。高濃度のフルコナゾールまたはイトラコナゾール存在下でも、この菌株は尾を引くような発育を示し、エンドポイントは見られなかった。ラクトフェリンまたはラクトフェリシン B はフルコナゾールあるいはイトラコナゾール存在下でのこの尾を引くような発育の度合いを低下させた。特に、ラクトフェリシン B 100 μg/ml はそれ自身菌糸状発育に影響を全く与えなかったが、フルコナゾールやイトラコナゾールと共存下でこれを完全に阻害した。ラクトフェリン、またはラクトフェリシン B の TIMM3317 発育に対する影響を顕微鏡により観察した（図５－４）。薬剤無添加で 15 時間培養すると菌糸状での発育を示し、酵母状細胞は観察されなかった。1 μg/ml のフルコナゾール存在下では、少なくなった菌糸と同時に酵母状細胞が見られた。ラクトフェリン 200 μg/ml では少ない菌糸が観察された。フルコナゾールとラクトフェリンの両者で処理すると、それぞれ単独での処理時よりさらに菌糸は少なくなっていた。ラクトフェリシン B 単独ではほとんど菌糸状発育に影響しなかったが、フルコナゾールと共存すると少数の酵母状細胞が存在し、菌糸はほとんど認められなかった。これらの顕微鏡による観察結果は CV 染色法による菌糸の定量結果（図５－３）とよく一致していた。

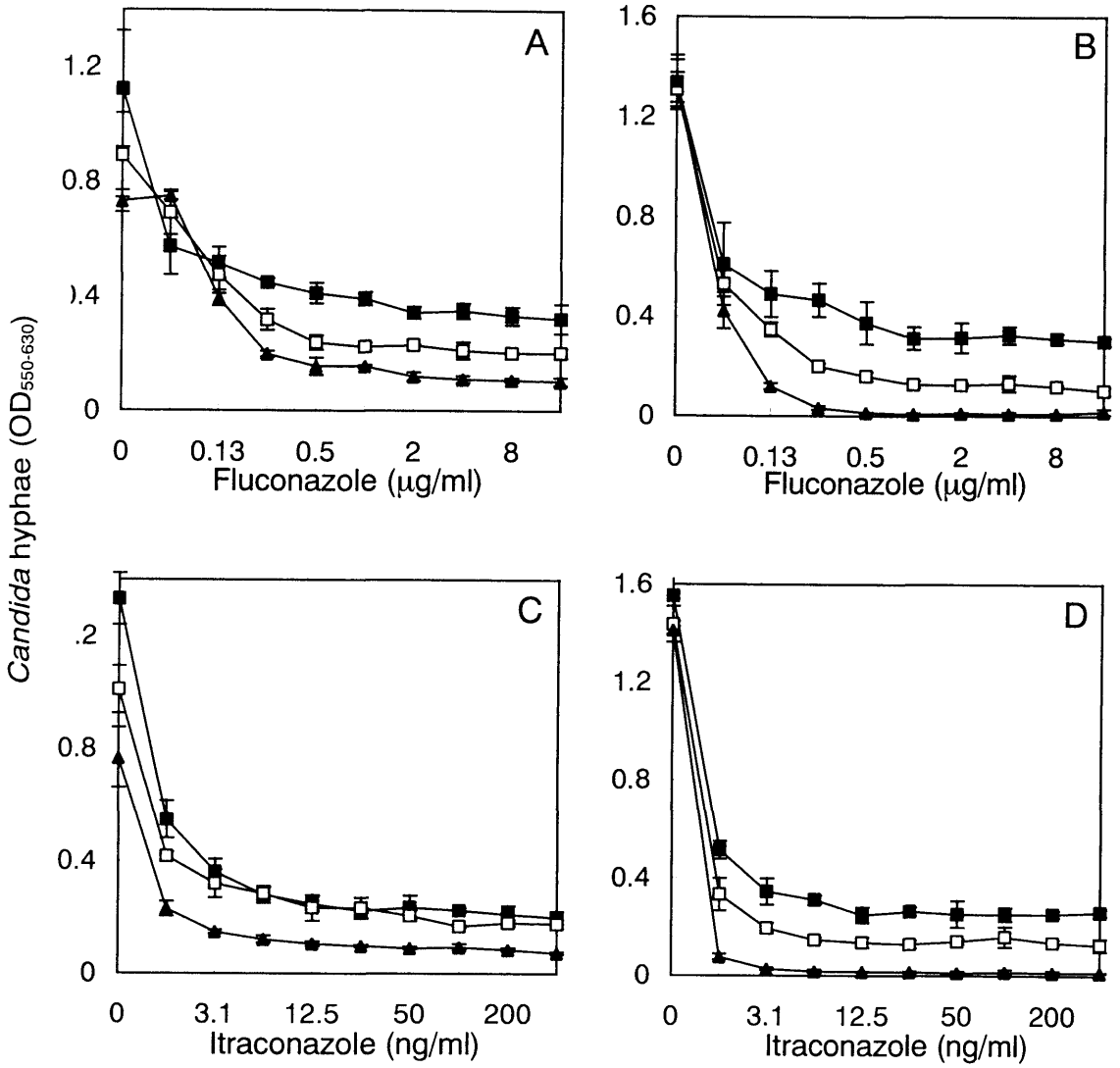


図５－３．ラクトフェリン、またはラクトフェリシン B 存在下でのトリアゾール抗真菌剤による *C. albicans* TIMM3317 の菌糸上発育の阻止。フルコナゾール（A）とイトラコナゾール（C）をラクトフェリン非存在下（■）、存在下（□、200 μg/ml；▲、800 μg/ml）でテストした。フルコナゾール（B）とイトラコナゾール（D）をラクトフェリシン B 非存在下（■）、存在下（□、25 μg/ml；▲、100 μg/ml）でテストした。値は 3 テストの平均±SD で表示した。

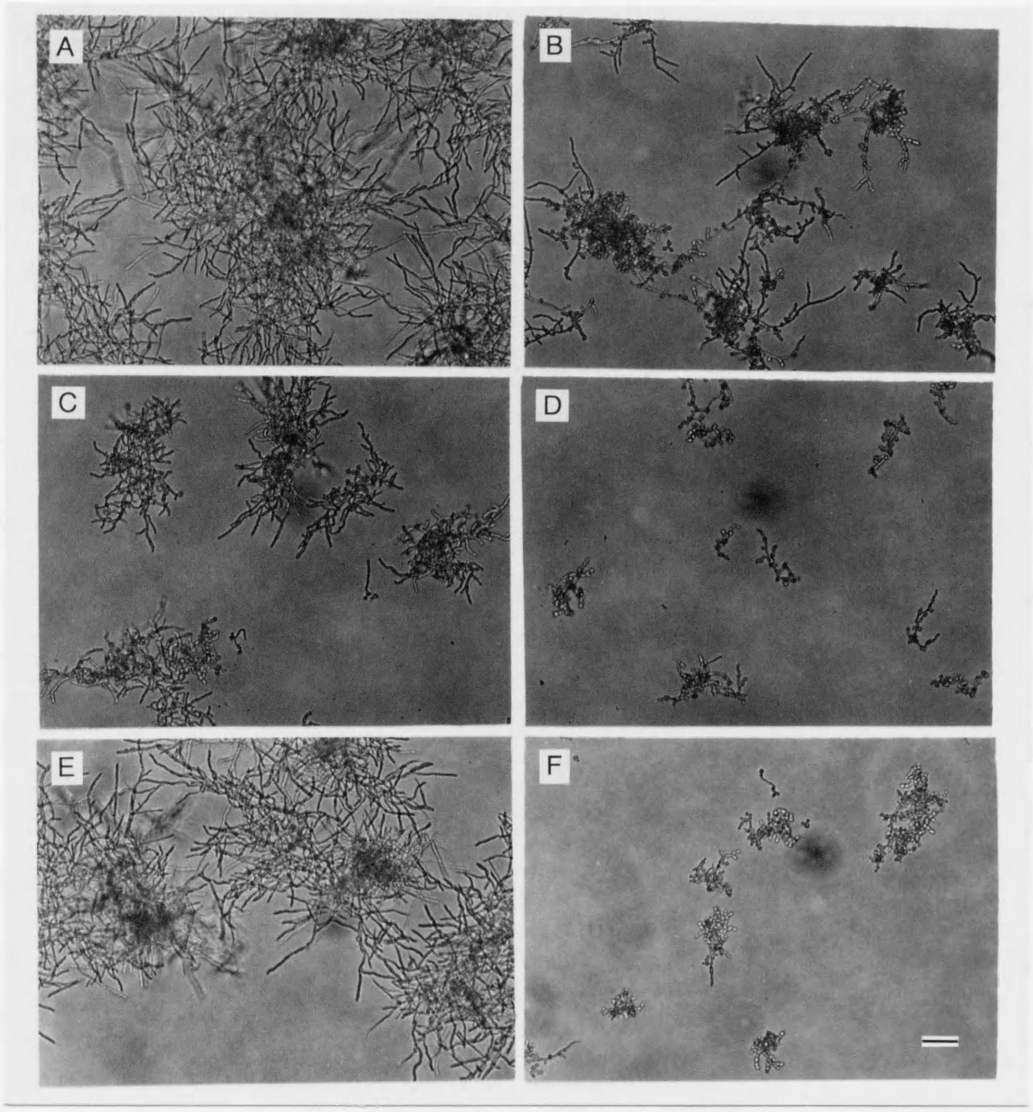


図５－４．フルコナゾールと／またはラクトフェリン類の存在下での *C. albicans* 発育の位相差顕微鏡写真。（A）薬剤無添加でのコントロール培養は菌糸上発育を示し、酵母状細胞は見られない；（B）フルコナゾール（1 μg/ml）処理での培養は少ない菌糸と酵母状細胞を示す；（C）ラクトフェリン（200 μg/ml）処理での培養は少なくなった菌糸を示す；（D）フルコナゾール（1 μg/ml）＋ラクトフェリン（200 μg/ml）処理の培養は非常に少なくなった菌糸と少数の酵母状細胞を示す；（E）ラクトフェリシン B（25 μg/ml）処理の培養は菌糸状発育に影響を与えない；（F）フルコナゾール（1 μg/ml）＋ラクトフェリシン B（25 μg/ml）処理の培養は少しの酵母状細胞を示し、菌糸はほとんど認められない。バーは 50 μm を示す。

３－８．各アゾール感受性、耐性株に対する併用効果の比較

アゾール感受性株およびアゾール耐性株の菌糸状発育に対する併用の効果をMICの低下とFIC indexの面から比較した（表５－５）。ラクトフェリン、ラクトフェリシンBはそれぞれの菌株のMICの1/4以下を添加した。これらの添加によって、フルコナゾールのMICはアゾール感受性株ATCC90028、TIMM1768では変化しなかったが、アゾール耐性株 TIMM3315、TIMM3317 では低下した（表５－４、表５－５）。これらの耐性2株でのラクトフェリンあるいはラクトフェリシンBとフルコナゾールとの併用は、FIC indexから相乗的であることが示された（表５－５）。酵母状に発育した耐性株TIMM3164ではこれらの併用でMICの低下を示さなかった。イトラコナゾールに関しては、耐性3株、TIMM3164、TIMM3315、TIMM3317でラクトフェリンあるいはラクトフェリシンBとの併用によるMICの低下とFIC indexでの相乗効果が示された。

表５－５．フルコナゾールまたはイトラコナゾールとラクトフェリン関連物質との併用下で CV 染色法により測定した MIC と FIC index

	Fluconazole with the following:				Itraconazole with the following:			
	LF		LFcin B		LF		LFcin B	
C. albicans strain	MIC (μg/ml)[a]	FIC index[b]	MIC (μg/ml)	FIC index	MIC (μg/ml)	FIC index	MIC (μg/ml)	FIC index
Azole-susceptible								
ATCC90028	0.5 (800)	2.06 (I)	0.25 (25)	1.06 (I)	0.0063 (800)	1.06 (I)	0.0031 (25)	0.56 (S)
TIMM1768	0.25 (800)	1.13 (I)	0.25 (25)	1.06 (I)	0.0063 (800)	1.13 (I)	0.0063 (25)	1.06 (I)
Azole-resistant								
TIMM3164[c]	1 (200)	1.13 (I)	2 (25)	2.06 (I)	0.025 (200)	0.63 (S)	0.025 (25)	0.56 (S)
TIMM3315	0.12 (25)	0.13 (S)	0.25 (6.3)	0.13 (S)	≤0.0016 (25)	0.13 (S)	0.025 (6.3)	0.13 (S)
TIMM3317	0.25 (400)	0.25 (S)	0.25 (25)	0.13 (S)	0.0031 (400)	0.25 (S)	0.0063 (25)	0.13 (S)

a ラクトフェリン（LF）またはラクトフェリシン B（LFcin B）は MIC の 1/4 以下で加え、その濃度（μg/ml）はカッコ内に示した。

b FIC index は本文中の方法で計算し、その評価はカッコ内に示した：S、相乗的（<1）；I、相加的（1-4）

c この菌株の MIC は 630 nm の吸光度の増加により決定した。

４．考察

４－１．酵母状発育条件下でのラクトフェリン類とアゾール剤との併用効果

ラクトフェリンとラクトフェリシン B は比較的高濃度で *C. albicans* の発育を阻止することが知られている（Bellamy *et al.*, 1993b; Soukka *et al.*, 1992; 第 3 章）。本研究は sub-MIC レベルのラクトフェリン関連物質がアゾール系抗真菌剤と共

同して *C. albicans* に対して働くことを見出した。ラクトフェリン関連物質の存在下で、それぞれのアゾール剤の MIC は約 1/4 に低下した。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との併用効果はチェッカーボード法により相乗的であると判定された。一方、アンホテリシン B やフルシトシンのような非アゾール系抗真菌剤と、ラクトフェリン類との間でそのような併用効果は観察されなかった。試験に用いたアゾール剤は互いに物理化学的性質が異なる（フルコナゾールは親水性、イトラコナゾールは疎水性）が、全てのアゾール剤はエルゴステロール合成をブロックすることで細胞膜合成を阻害し真菌の発育を阻止することが知られている。このため、膜合成阻害が今回の相乗的な作用と関連しているかもれない。

アゾール剤との共同作用に寄与するラクトフェリン関連物質の活性コンポーネントはラクトフェリシン部位であると考えられる。なぜなら、併用効果を示したラクトフェリン、ラクトフェリン分解物、ラクトフェリシン B は何れもラクトフェリシン・ドメイン、あるいはラクトフェリシン・ペプチドを含んでいるが、ラクトフェリシン B を抜いた画分 LF(-)は併用効果を示さず、むしろ発育を促進したからだ。ラクトフェリン関連物質の *C. albicans* に対する作用メカニズムは十分には分かっていない。advanced glycation end products はラクトフェリシン・ドメインに結合してラクトフェリンの *Micrococcus luteus* に対する抗菌活性をブロックすることが報告されている（Li *et al.*, 1995）。この知見は、ラクトフェリンの抗 *Candida* 活性がラクトフェリシン部位によっているという推測を支持している。これまでに、ラクトフェリシン B が *Candida* 細胞に直接結合すること（Bellamy *et al.*, 1993b）、細胞膜を障害すること（第３章）が示された。ラクトフェリン類とアゾール剤は共に *Candida* 細胞膜を障害することにより併用効果が得られるのかもしれない。

本試験は、やや酸性を示すサブロー・グルコース・ブロス中で行ったので、培地の生化学的性状が併用効果に影響を与えた可能性もある。しかし、効果を示さなかった LF(-)も他のラクトフェリン関連物質と同様にやや pH を低下させた（Δ0.1-0.2）ので、併用効果は培地の pH 変化によるものではないだろう。

ラクトフェリンとある種のβラクタム抗生物質は *Klebsiella pneumoniae* と *Salmonellae* に対して併用効果を示すことが報告されている（Miyazaki *et al.*, 1991; Naidu and Arnold, 1994）。さらにアゾール剤とリゾチームが相乗的な抗 *Candida* 作用を示すことも報告されている（Tansho *et al.*, 1996）。これらのことは、細胞壁の破壊によって、細胞膜をターゲットとする薬剤がより細胞膜にアクセスしやすくなり、相乗的な作用に結びつくことを示唆している。

４－２．菌糸状発育条件下でのラクトフェリン類とアゾール剤との併用効果

菌糸状発育を調べることで、(i) アゾール耐性 *C. albicans* 株が感受性株よりラクトフェリンとラクトフェリシン B に対して感受性の高いこと、(ii) あるアゾール耐性株は比較的低濃度のラクトフェリンやラクトフェリシン B の存在下で、フルコナゾールやイトラコナゾールにより抑制を受けやすいことを示した。これらの結果はアゾール耐性 *C. albicans* の菌糸型の抑制にラクトフェリンとラクトフェリシン B が有用であることを示している。

アゾール耐性株が感受性株よりラクトフェリンやラクトフェリシンBに対して高感受性を示したことは驚くべきことではない。エルゴステロール生合成に関わる酵素であり、アゾール剤のターゲットであるシトクロム P-450 を欠損しているフルコナゾール耐性 *Candida glabrata* 株は H_2O_2 と好中球による殺菌に対して感受性が高くなっている（Kan *et al.*, 1996）。シトクロム P-450 活性の欠損とそれによる膜ステロールの変化は膜の安定性に不都合をもたらすだろう。ラクト

フェリンは *Candida* の細胞表層と相互作用し、タンパク質の細胞外流出と表層の泡状構造を出現させる(Nikawa *et al.*, 1993)。ラクトフェリシン B は *C. albicans* の細胞膜機能を障害することが明らかになっている（第 3 章)。このため、細胞膜に何らかの変化のあるアゾール耐性 *Candida* は活性酸素やラクトフェリン関連物質のような膜をターゲットとする非特異的生体防御因子に対する感受性が高まっている可能性がある。

C. albicans のアゾール耐性は、ATP をエネルギーとする Cdr1 や proton motive force を駆動力とする Ben^r のような multidrug efflux transporter を介するアゾール剤の排出を主たるメカニズムとしている（Ben-Yaacov *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1995)。ラクトフェリシン B は *C. albicans* の細胞膜内外でのプロトン勾配を破壊する(第 3 章)。また *Trichophyton rubrum* のグルコース取り込みを阻害し(Bellamy *et al.*, 1994)、真菌の ATP 産生を低下させる可能性がある。ラクトフェリシン B のそしてラクトフェリンの膜障害作用は multidrug efflux transporter の活性を阻害し、アゾール耐性の度合いを低下させることが考えられる。この可能性を確かめるために更なる検討が必要である。

トリアゾール剤とラクトフェリン類との併用効果は中度アゾール耐性株で菌糸状に発育しない TIMM3164 では見られなかった。TIMM3164 のこれらの薬剤への低感受性は、アゾール耐性メカニズムの違いによるのか菌糸状に発育しないことと関係しているのかはわからない。アゾール感受性株 ATCC90028 と TIMM1768 のテストでは併用効果は見られなかった。しかし TIMM1768 の酵母状発育条件下では併用効果が示された。この違いは、培養条件の違いと発育形態の違いによると考えられる。事実 TIMM1768 に対するフルコナゾールの MIC は RP medium で菌糸状発育を計測したときは 0.25 μg/ml であるが、サブロー・グルコース・ブロス中で酵母状発育を計測したときは 4-16 μg/ml であった。ラクト

フェリン関連物質は、*Candida* がアゾール剤に対して低感受性になるような条件下でこの薬剤への感受性を高めると思われる。

血漿中のラクトフェリンは好中球に由来し、微生物感染時にはその濃度は100倍にも増加する（~200 μg/ml）（Gutteberg *et al.*, 1984）。ラクトフェリンはまた粘液分泌中に様々な濃度で存在し、唾液の 5 μg/ml（Lenander-Lumikari and Johansson, 1995）から頚菅粘液の 1000 μg/ml（Masson *et al.*, 1966）まで濃度範囲は広い。ラクトフェリン分解産物は炎症性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液中に検出されることが報告されている（Britigan *et al.*, 1993）。好中球に由来したり頚菅粘液中に存在するラクトフェリンやその分解産物はアゾール剤による化学療法の効果を高め、アゾール耐性 *C. albicans* の定着を阻害している可能性もある。一方、口腔粘液中のラクトフェリン濃度は低く、また口腔内はアゾール耐性 *C. albicans* の最も出現しやすい場であることから（Rex *et al.*, 1995）、ラクトフェリンやラクトフェリシン B の経口投与がアゾール化学療法の口腔内での治療効果を高めることが期待される。

5．まとめ

ラクトフェリンとそのペプチドのアゾール系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。比較的低濃度の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 *Candida* 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。さらに、アゾール耐性菌 3 株を含む *C. albicans* の菌糸状発育についてラクトフェリン類の効果を CV 染色法で調べた。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 μg/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。

第６章　ラクトフェリン関連物質の直接的、または生体を介した抗白癬作用

１．はじめに

白癬はヒトにおいて最も多い感染症の 1 つである。それは *Trichophyton mentagrophytes* や *Trichophyton rubrum* といった菌糸状発育する真菌である皮膚糸状菌（白癬菌）が角質に侵入することで起こる。これらの真菌に対する生体の防御は非特異的な機構と特異免疫機構によっている（Hay, 1994）。非特異的な機構には、表皮細胞の増殖の亢進、血清中の鉄フリートランスフェリン（アポ･トランスフェリン）による鉄を奪う作用、活性化した食細胞の作用が含まれる。血清中の抗白癬菌活性は、発育に必要な鉄を奪うアポ･トランスフェリンが担っていることが報告されている（King *et al.*, 1975; Artis *et al.*, 1983）。特異免疫機構は白癬抗原に対する T 細胞を介した免疫応答の活性化を含んでいる。急性の白癬患者から得た末梢リンパ球は白癬抗原による刺激に対して、IFN-γ、IL-2、GM-CSF を産生することが知られている。一方、慢性の白癬患者では非常に低いレベルの IFN-γしか産生されない（Koga *et al.*, 1993a; Koga *et al.*, 1993b; Koga *et al.*, 1994; Koga *et al.*, 1995）。慢性の白癬患者はまたアトピー性疾患を有していることが多い（Hanifin *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1974）。これらのことから白癬に対する生体防御機構において細胞性免疫、Th1型の免疫応答が重要であることが示唆される（Mosmann and Coffman, 1989）。IFN-γの mRNA の発現はまた白癬の感染部位でも観察される（Miyata *et al.*, 1996）。感染した表皮では、循環してきた白癬抗原特異的 T 細胞が IFN-γのような Th1 型サイトカインを産生し、集積してきた食細胞、マクロファージや好中球を活性化させていると思われる（Miyata *et al.*,

1996)。このような過程が白癬菌の皮膚からの排除に寄与しているのだろう。

白癬モルモットは抗白癬剤の in vivo での治療効果の評価や、感染防御メカニズムの研究のためのモデルとしてよく使われている（Arika *et al.*, 1992; Niwano *et al.*, 1995; Tagami, 1985)。本研究では、ラクトフェリンの in vitro での *Trichophyton* に対する抗菌活性と、ラクトフェリン経口投与の白癬モルモットにおける in vivo 効果を検討した。さらに経口投与したラクトフェリンによる生体防御メカニズムを明らかにするために、細胞性免疫応答のモデルとしてマクロファージ *Trichophyton* 殺菌系を構築し、*Trichophyton* 抗原で感作したモルモットの単核球培養上清のこの系に対する影響を調べた。

２．材料と方法

２－１．試薬

ウシラクトフェリン、ラクトフェリシン B は、第 2 章に示す方法で調製した。ヒトラクトフェリンは既報に従い健康なボランティアの母乳から精製した（Sawatzki and Kubanek, 1983)。ヒト･トランスフェリンとグリセオフルビンは Sigma Chemical Co.より購入した。モルモット･トランスフェリンは Inter-cell Technologies Inc. (Hopewell, NJ)より購入した。

２－２．in vitro 抗 *Trichophyton* 活性の測定

次の真菌株をサブロー･グルコース･寒天スラントで維持した。帝京大学医真菌研究センター保存の 2 菌株 *T. mentagrophytes* TIMM1189 と TIMM2789 はハムスターの皮膚から単離された。2 菌株 *T. rubrum* IFO6203 と IFO32409 は発酵研究所（Osaka, Japan）より入手した。ラクトフェリンとトランスフェリンの抗 *Trichophyton* 活性は微量液体希釈法により下記に示す方法で測定した。それぞれ

の菌株の分生子を 0.05% Tween 80 入り生理食塩水に懸濁し、試験培地で 5×10^4 分生子/ml に調整した。170 μl のサブロー・グルコース・ブロスまたは 0.165 M Mops 入り RPMI1640 培地（NCCLS M27-T, 1995）、10 μl の試験薬剤液、20 μl の分生子懸濁液を 96 穴平底マイクロプレートに添加した。マイクロプレートは 27℃で 5 日間培養した。MIC は肉眼で生育が認められない最小濃度として決定した。

２－３．*Trichophyton* の分生子懸濁液と抗原の調製

1/10 サブロー・グルコース・寒天（0.2% peptone, 0.1% glucose, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% $MgSO_4$, 2% agar）上で 27℃、2 週間、生育させた *T. mentagrophytes* の分生子を 0.05% Tween 80 入り生理食塩水に懸濁した。懸濁液から菌糸と寒天の断片を除くために滅菌ガーゼで濾過し、血球計算盤で 2×10^7 分生子/ml に調整し、動物に感染させるための接種菌液とした。マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性の評価のために、別の分生子懸濁液を 10% グリセロール中に調製し、使用まで−80℃で保存した。*Trichophyton* 抗原の調整のために、分生子懸濁液を 1,500 ×*g* で 5 分間遠心し、沈殿した分生子を蒸留水に再懸濁した。121℃で 15 分間オートクレーブし、死菌体と細胞浸出物質を含む液を *Trichophyton* 抗原として用いた。

２－４．モルモットへのラクトフェリンとグリセオフルビンの投与

Hartley SPF モルモット（Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan）の 7〜9 週令、メスを全ての動物実験に用いた。モルモットの 1 つの群（高用量・ラクトフェリン群）は、ウシラクトフェリン（250 mg/ml）を 1 日 2 回、2.5 g/kg 体重/1 日の量で経口投与した。別の群（低用量・ラクトフェリン群）は、ウシラクトフェリン（100 mg/ml）を 1 日 1 回、0.25 g/kg 体重/1 日の量で経口投与した。ポジティブ・

コントロールの群は、2% methylcellulose、0.5% Tween 80 液に 10 mg/ml の濃度で調整したグリセオフルビンを 1 日 1 回、0.025 g/kg 体重/1 日の量で経口投与した。

２－５．白癬モルモット･モデル

白癬モルモット･モデルでの経口投与ラクトフェリンの予防的または治療的効果を評価するために 3 回の実験を行った。体部白癬（Yamaguchi and Uchida, 1984）への効果を、実験 1 では低用量または高用量のラクトフェリンで、実験 2 では高用量のラクトフェリンのみで調べた。実験 3 では足白癬（Uchida and Yamaguchi, 1994）への効果を高用量のラクトフェリンで調べた。

体部白癬モデルの実験は次のように行った。モルモット背中の体毛を電気バリカンで刈った。2 cm 直径の円状に、粘着テープを貼る、剥がすを 5 回繰り返した。体毛を除去した円状部位に、*T. mentagrophytes* 分生子懸濁液を 50 μl 塗りつけた。それぞれの動物の皮膚病変の度合いを知るために、実験期間を通して毎日感染部位を観察した。皮膚病変の度合いを次の段階でスコア化した。0：病変が認められない；1+：少数個の小さな紅斑性丘疹が島状に点在する状態。または新しい発毛がある；2+：紅斑が接種部位全面に拡大し、しかも部分的に強い紅斑、炎症、表皮剥離などの症状が認められる状態；3+：感染部位の中で部分的に痂皮形性が認められる状態；4+：厚い痂皮形成または出血性膿瘍を伴なって病変が極期に達した状態。病変度の平均は病変度スコアの和を病変数で割って求めた。

足白癬モデルの実験は次のように行った。50 μl の分生子懸濁液を粘着バンドのガーゼ部分に含ませ、モルモットの足裏に粘着テープによって固定した。粘着バンドは感染 3 日後に取り外した。

実験最終日に全ての動物を殺し、感染部位の皮膚をそっくり切り出した。背

中からの皮膚は10片に切り分けた。足からの皮膚はつま先側と踵側でそれぞれ5片に切り分けた。それぞれの皮膚小片は cycloheximide 500 μg/ml、chloramphenicol 50 μg/ml、sisomicin 50 μg/ml の入ったサブロー・グルコース・寒天平板培地に植え込み、27℃で14日間培養した。真菌の発育の見られる皮膚小片を培養陽性とした。1つ以上の培養陽性皮膚小片を有する背部または足部を真菌陽性とした。背中の10小片、足のつま先／踵の5小片中の培養陽性の皮膚小片数にしたがって、感染強度をそれぞれ0-10、0-5にスコアリングした。

２－６．免疫したモルモットからの脾臓単核球の単離

同量の *Trichophyton* 抗原と CFA を混合、乳化し、200 μl をモルモット足蹠の皮下に注射した。その後7日間、ラクトフェリン（2.5 g/kg/d）を経口投与した。免疫して 7 日後、脾臓を取り出し、HBSS 中で細かくして Falcon cell strainer (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) で濾過し、それぞれの群につき3匹からの脾臓細胞をプールした。細胞懸濁液中の赤血球を ACK lysing buffer で溶血させ（Kruisbeek, 1993）、Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan) 上に重層し、室温、550 *g* で30分間遠心した。単核球の層を回収し、HBSS で洗浄、20 mM Hepes、16 mM $NaHCO_3$、100 μg/ml penicillin、100 μg/ml kanamycin、5% 非働化 FCS を含む RPMI 1640 培地（complete-medium）に懸濁した。

２－７．脾臓単核球の増殖

脾臓の単核球は complete-medium 中、5×10^5 細胞/ml、n=3 で、湿度を保った 5% CO_2 下、37℃で1、2、3日間培養した。このとき concanavalin A (ConA, Sigma) または *Trichophyton* 抗原液（最終的に 10^6/ml の死菌体を含む）をそれぞれ 10 μg/ml、100 μl/ml の量になるように添加した。培養の最後の 2 時間、細胞を bromo-

deoxyuridine (BrdU) 溶液（Cell proliferation ELISA system, Amersham Life Science, Tokyo, Japan）でパルスした。試薬メーカーが示す方法により、細胞に取り込まれた BrdU を抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて測定した。

２－８．マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性

脾臓の単核球を 10 μg/ml ConA または 100 μl/ml *Trichophyton* 抗原液存在下、complete-medium 中、5×10^6 細胞/ml で培養した。培養 2 日後、培養上清を濾過し、マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性のアッセイ時に添加するために-80℃で保存した。このアッセイは基本的に Calderon と Hay の方法を参考にして行った（Calderon and Hay, 1987）。3 匹の無処置モルモットの腹腔内に PBS を 30 ml 注入し、常在マクロファージを含む腹腔液を回収した。細胞を complete-medium に懸濁し、96 穴平底プレートで 2 時間培養した。非接着性の細胞を除去し、complete-medium を加え、*Trichophyton* 分生子を 10^4 個/ml の濃度でプレートに添加し、接着性マクロファージと E/T ratio 0-100 となるように、加湿した 5% CO_2 下で n=3 で 19 時間培養した。プレートシールでプレートをシールし、激しく撹拌した。細胞懸濁液 30 μl をペトリディッシュに移し、45℃で保温している 20 ml のサブロー・グルコース・寒天と混合した。寒天プレートを 27℃で 2～3 日間培養し、真菌コロニーを計数した。マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性への影響を評価するために、単核球の培養上清と recombinant rat IFN-γ (Genzyme, Cambridge, MA) をこのアッセイ系に添加した。単核球培養上清活性に対する中和作用を調べるために、polyclonal rabbit anti-rat IFN-γ Ab (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium) を 37℃、1 時間、上清とプレインキュベートした後、マクロファージのアッセイ系に加えた。

２－９．統計解析

データは平均±SD で表示した。2 群間の比較のために、unpaired two-tailed *t* test を行った。また、3 群間の比較のために、analysis of variance (ANOVA)と Fisher's PLSD の multiple comparison test を行った。

表６－１．*Trichophyton* に対するラクトフェリンと参照薬剤の MIC

	Sabouraud glucose broth				RPMI1640 medium			
	T. mentagrophytes		*T. rubrum*		*T. mentagrophytes*		*T. rubrum*	
	TIMM	TIMM	IFO	IFO	TIMM	TIMM	IFO	IFO
Agents	1189	2789	6203	32409	1189	2789	6203	32409
Human LF	400	400	>6400	800	13	13	13	6.3
Bovine LF	50	100	>6400	100	13	13	13	13
Human TF	50	1600	>6400	6400	13	13	13	6.3
Guinea pig TF	3200	6400	6400	3200	100	100	100	25
LFcin B	3.1	6.3	25	13	50	200	800	400
Griseofulvin	0.25	1	0.5	1	0.25	1	0.13	0.5

T. mentagrophytes と *T. rubrum* のそれぞれの菌株をサブロー・グルコース・ブロスまたは RPMI1640 培地で 27℃、5 日間、それぞれの濃度のラクトフェリン、トランスフェリン、ラクトフェリシン B、グリセオフルビン存在下で培養した。MIC (μg/ml) は肉眼で発育が認められない薬剤の最小濃度とした。

３．結果

３－１．*Trichophyton* のラクトフェリンに対する in vitro 感受性

T. mentagrophytes と *T. rubrum* はラクトフェリンとトランスフェリンの発育阻止作用に対して感受性を示した（表６－１）。ラクトフェリンはトランスフェリンよりやや効果が強いようだ。ラクトフェリシン B では第 3 章や以前の報告（Bellamy *et al.*, 1994）と同レベルの作用が見られた。ラクトフェリン、トランスフェリン、ラクトフェリシン B の *Trichophyton* に対する MIC は菌株と試験培地の種類によって異なっていた。一方、抗真菌剤のグリセオフルビンの MIC はほとんど一定であった。ラクトフェリンとトランスフェリンは RPMI1640 培地中でより高活性を示したのに対し、ラクトフェリシン B はサブロー・グルコース・ブロス中で高活性であった。

３－２．モルモット白癬に対する経口投与ラクトフェリンの効果

体部白癬のモルモットモデルでの実験 1、2（図６－１）を通して皮膚病変度をスコアリングした。図６－２A は実験 2 での平均病変スコアの変化を示している。未処置群とラクトフェリン投与群で、最初の病変は感染 4 日目で現れ、病変度は次第に高くなり、感染 13 日目で最大レベルに達した。未処置群では感染 19 日目に自然治癒が始まったが、ラクトフェリン投与群ではそれは感染 16 から 17 日目に始まった。未処置群とラクトフェリン投与群の平均病変スコアは感染 18 から 20 日にかけて有意差を示した（$P<0.05$）。この病変度の違いは、実験 2 における未処置群とラクトフェリン投与群（投与 3-20 日）の典型的な皮膚病変の写真からも確認できる（図６－２B-E）。これらの観察結果はラクトフェリン投与が白癬の発症は阻止しないが、自然治癒を促進することを示している。

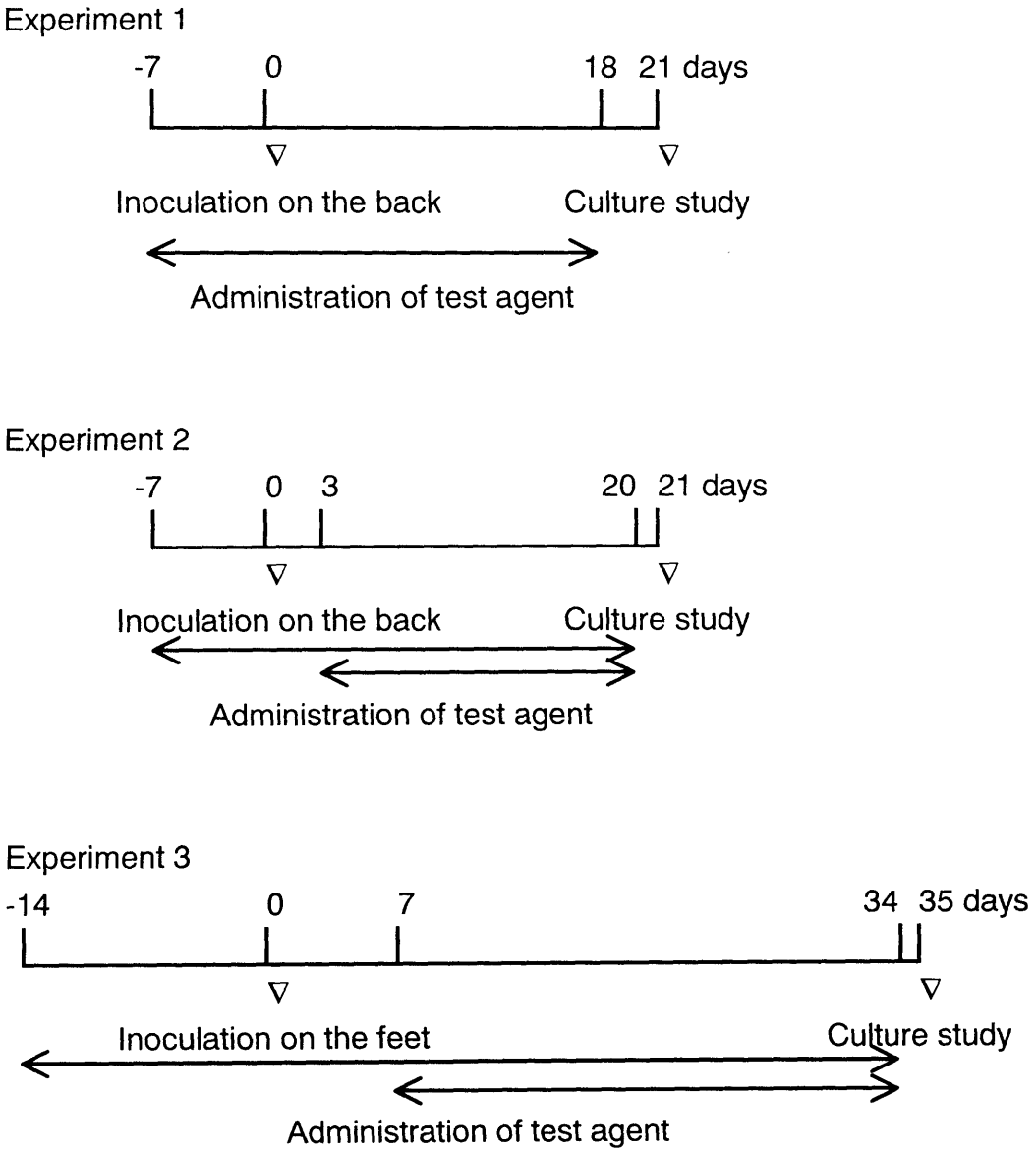
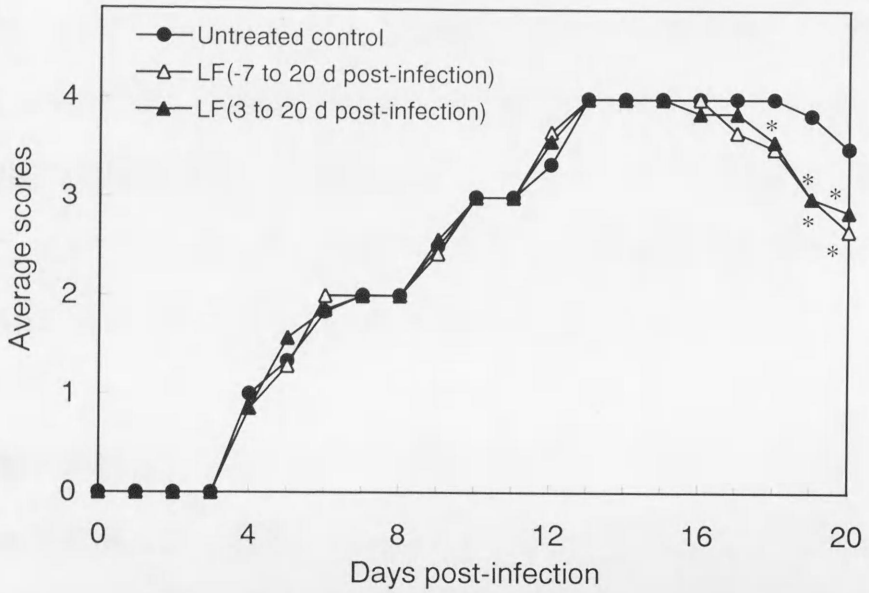


図６－１．モルモット白癬モデルによる実験デザイン。実験 1 と 2 では、*T. mentagrophytes* の分生子 10^6 個を背中に植菌した。示した期間ラクトフェリンまたはグリセオフルビンを経口投与した。感染 21 日目に実験 3 では、*T. mentagrophytes* の分生子 10^6 個を足に植菌した。示した期間ラクトフェリンを経口投与した。感染 35 日目に、感染部位の皮膚を切り出し、残存する真菌を検出するために培養した。

A


Untreated control
LF(-7 to 20 d post-infection)
LF(3 to 20 d post-infection)
Average scores
0
1
2
3
4
0
4
8
12
16
20
Days post-infection

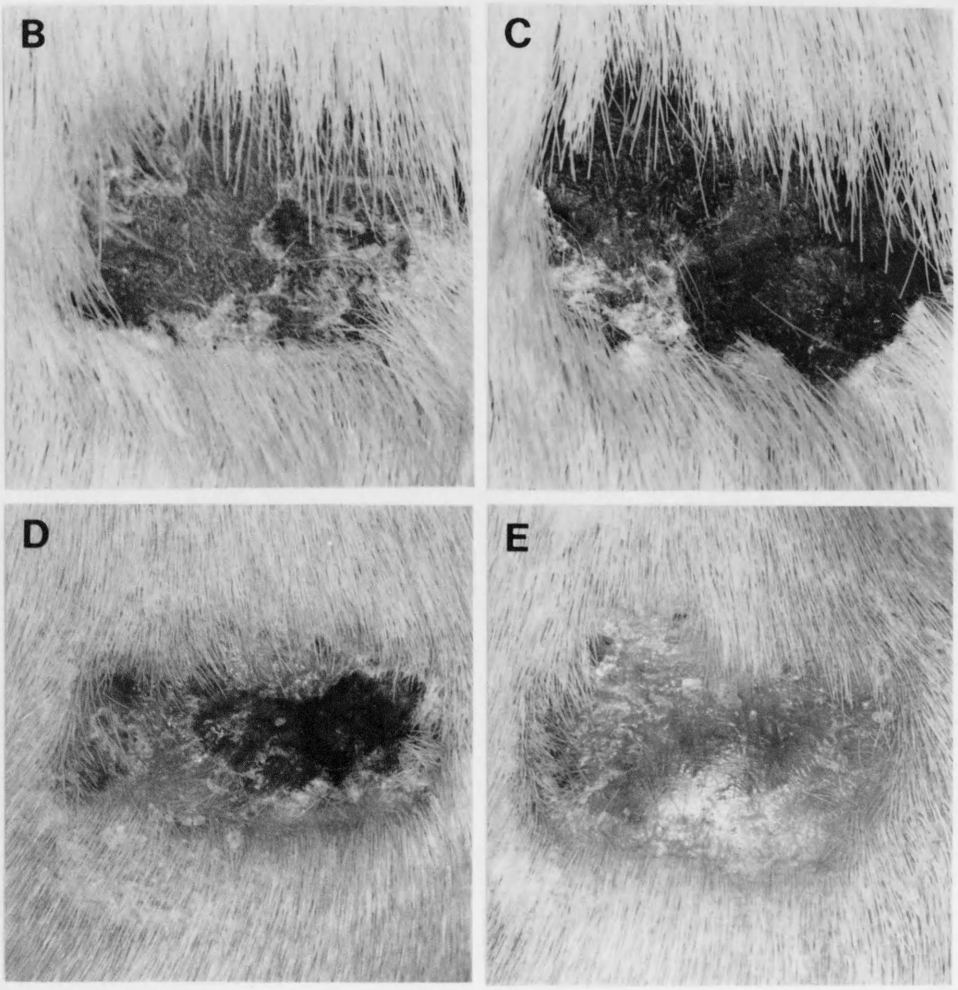

B
C
D
E

図６－２．皮膚病変度変化のタイム・コースと体部白癬モルモットの皮膚病変写真。図Aは実験2における、未処置群(n = 6)、ラクトフェリン処置群（感染-7~20日投与、n = 6)、ラクトフェリン処置群（感染3~20日投与、n = 7）の皮膚病変平均スコアを示す。皮膚病変度は0~4までスコア化した。* $P<0.05$ vs.未処置群。典型的な皮膚病変を、未処置群(B, D)、ラクトフェリン処置群（感染3~20日投与）(C, E)について示した。感染20日目で、未処置群は残存する痂皮形成を示すが（D）ラクトフェリン処置群は病変の改善を示した（E)。

動物実験の最終日に、病変部位の皮膚を切り出し、培養により残存している*Trichophyton*を定量した。実験1で、低用量のラクトフェリン（0.25 g/kg/d）と高用量のラクトフェリン（2.5 g/kg/d）の効果を比較した（表６－２)。2種類の用量のラクトフェリンとグリセオフルビンは平均感染強度を低下させた。試験群の感染強度を比較すると、高用量のラクトフェリンのほうが低用量のラクトフェリンより効果が強く、高用量群とコントロール群との間で有意差が認められた。実験1での結果に基づき、以降の動物実験では高用量のラクトフェリンを用いた。実験2ではラクトフェリン投与の期間の影響を調べた。1つの群ではラクトフェリンを感染7日前から投与を開始し、別の群ではラクトフェリンを感染3日後から投与した。両方の群で平均感染強度は低下したが、感染後ラクトフェリン投与群とコントロール群とでのみ有意差がついた。

実験3では自然治癒しないことが知られている足白癬のモデルを用いた。この実験では、コントロール群の平均感染強度は、厚い角質を持つ踵側のほうがつま先側より高かった（表６－３)。ラクトフェリンを感染14日前から投与した群では、踵側において感染強度の有意な低下が見られた。

表６－２．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（実験 1、2）

Agent	Administration period	Fungus-positive rate (%)	Average intensity of infection
Experiment 1			
Untreated control		5/6 (83)	6.5
LF (0.25g/kg/d)	-7 to 18	4/6 (67)	3.0
LF (2.5g/kg/d)	-7 to 18	5/5 (100)	1.8*
Griseofulvin	-7 to 18	2/6 (33)	0.5*
Experiment 2			
Untreated control		6/6 (100)	7.5
LF (2.5g/kg/d)	-7 to 20	5/6 (83)	4.0
LF (2.5g/kg/d)	3 to 20	7/7 (100)	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存する真菌の検出のために培養した。真菌陽性率はそれぞれの群の真菌陽性動物数／全動物数を示す。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。

表６－３．モルモット足白癬モデルでのラクトフェリンの治療効果（実験 3）

Agent	Administration period	Fungus-positive rate (%)	Average intensity of infection	
			Toe portion	Heel portion
Untreated control		12/12 (100)	3.6	4.7
LF	-14 to 34	10/10 (100)	3.5	3.2*
LF	7 to 34	10/10 (100)	4.0	4.3

モルモットの足に *T. mentagrophytes* を植菌し、ラクトフェリン 2.5 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 35 日目に、病変部から切り出した皮膚を残存する真菌の検出のために培養した。真菌陽性率はそれぞれの群の真菌陽性足数／全足数を示す。平均感染強度はそれぞれの足部位中の 5 皮膚小片中の培養陽性小片数に基づいて 0~5 までスコアリングした。* $P<0.05$ vs. 未処置群。

３－３．ラクトフェリン投与の脾臓単核球増殖への影響

Trichophyton 抗原に対する免疫応答へのラクトフェリン経口投与の影響を調べるために、モルモットを *Trichophyton* 抗原で感作しラクトフェリンを 1 週間投与した。感作 1 週間後に、マイトージェン ConA または *Trichophyton* 抗原の刺激に対する脾臓単核球の増殖反応を、3 日間の培養期間にわたって調べた（図６－３）。BrdU の取り込みの増加は、ConA 刺激によって感作、非感作動物由来の細胞で、*Trichophyton* 抗原刺激によって感作動物由来の細胞で観察された。刺激なしの細胞を含む全ての群で、ラクトフェリン投与は BrdU 取り込みの低下、つまり増殖反応の低下を誘導した。

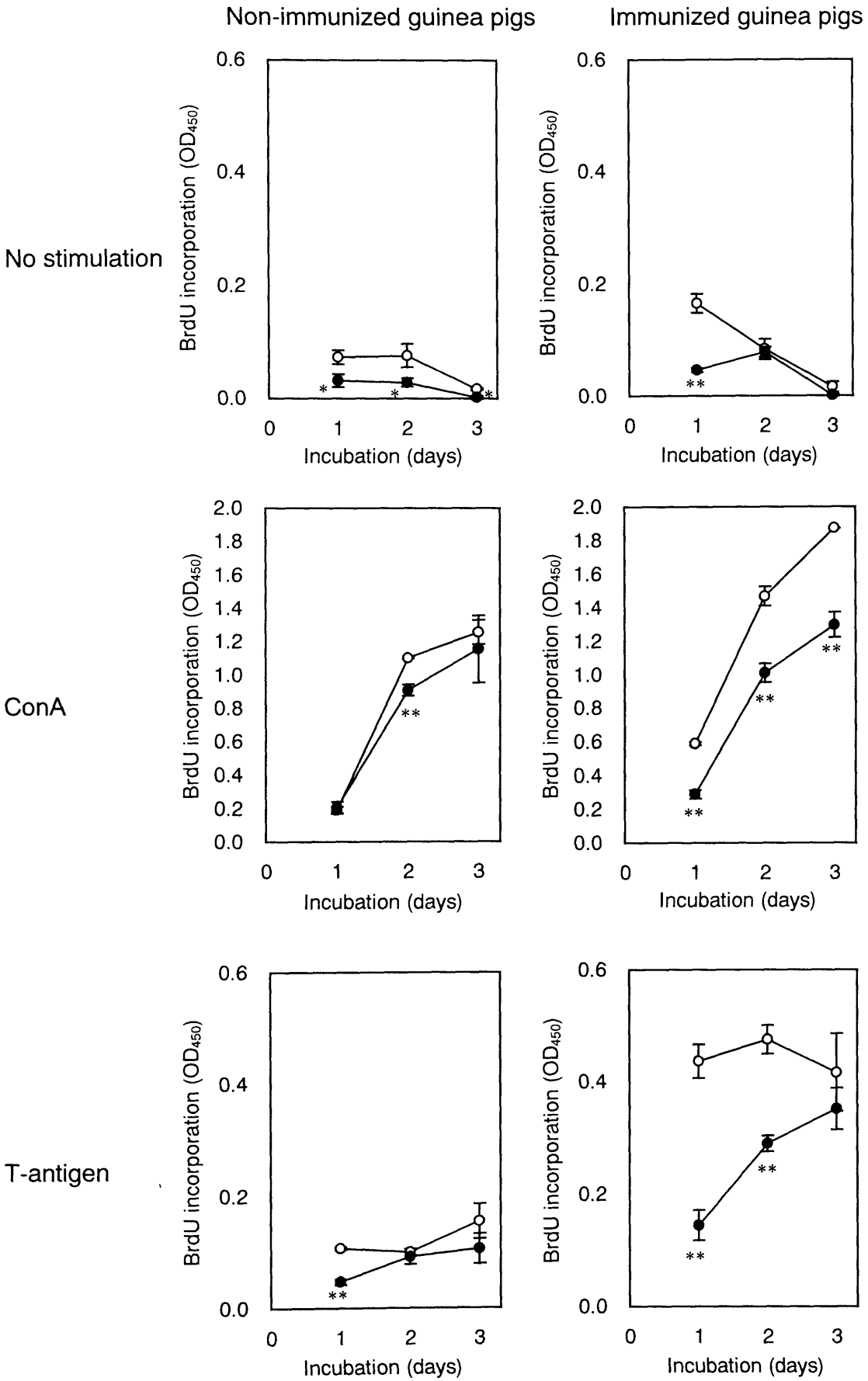


図６－３．単核球の増殖反応へのラクトフェリン投与の影響。６匹のモルモットの足蹠に *Trichophyton* 抗原を感作し、残りの６匹は感作しなかった。それぞれの

群の3匹づつ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、ConA または *Trichophyton* 抗原刺激あり、なしで、トリプルで培養した。1、2、3 日間の培養の最後の2時間、細胞を BrdU でパルスし、細胞に取り込まれた BrdU を ELISA 法で測定した。* $P<0.05$, ** $P<0.001$ vs. ラクトフェリン未投与コントロール。同様の結果は他の2回の実験でも得られた。

３－４．マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性の単核球培養上清による調節

マクロファージの殺菌活性を調節する単核球のエフェクター機能を、*Trichophyton* 抗原で感作しラクトフェリンを投与したモルモットを用いて検討した。感作 1 週間後、動物から単離した脾臓の単核球を ConA または *Trichophyton* 抗原と共に 2 日間培養し、得られた培養上清をマクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性を調べる系に加えた（図６－４）。ナイーブモルモットから得られた常在の腹腔マクロファージはE/T ratio に依存した *Trichophyton* 殺菌活性を示した。マクロファージの殺菌活性は感作または非感作の動物由来の単核球培養上清を添加することで高まった。特に、殺菌活性の亢進は感作しなおかつラクトフェリンを投与した動物由来の単核球培養上清において顕著に見られた。感作動物での結果を見ると、単核球培養上清による殺菌活性の亢進はラクトフェリン非投与動物よりラクトフェリン投与動物のほうが大きかった。抗原刺激なしで培養した細胞でも、その培養上清は殺菌活性を高めた。一方で、ラクトフェリン投与動物と非投与動物の間の違いは、*Trichophyton* 抗原で刺激した細胞において最も顕著であった。感作しラクトフェリンを投与した動物由来の単核球培養上清によるマクロファージ殺菌活性の亢進は、2 から 20%の範囲で用量依存的であった（図６－５）。10%上清による亢進は抗 rat IFN-γ抗体 0.1-10 ng/ml の添加によって阻害された（図６－６）。recombinant rat IFN-g は 1 μg/ml（3,200 U/ml）までの比較的高濃度でモルモット・マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性を高めた（図６－７）。

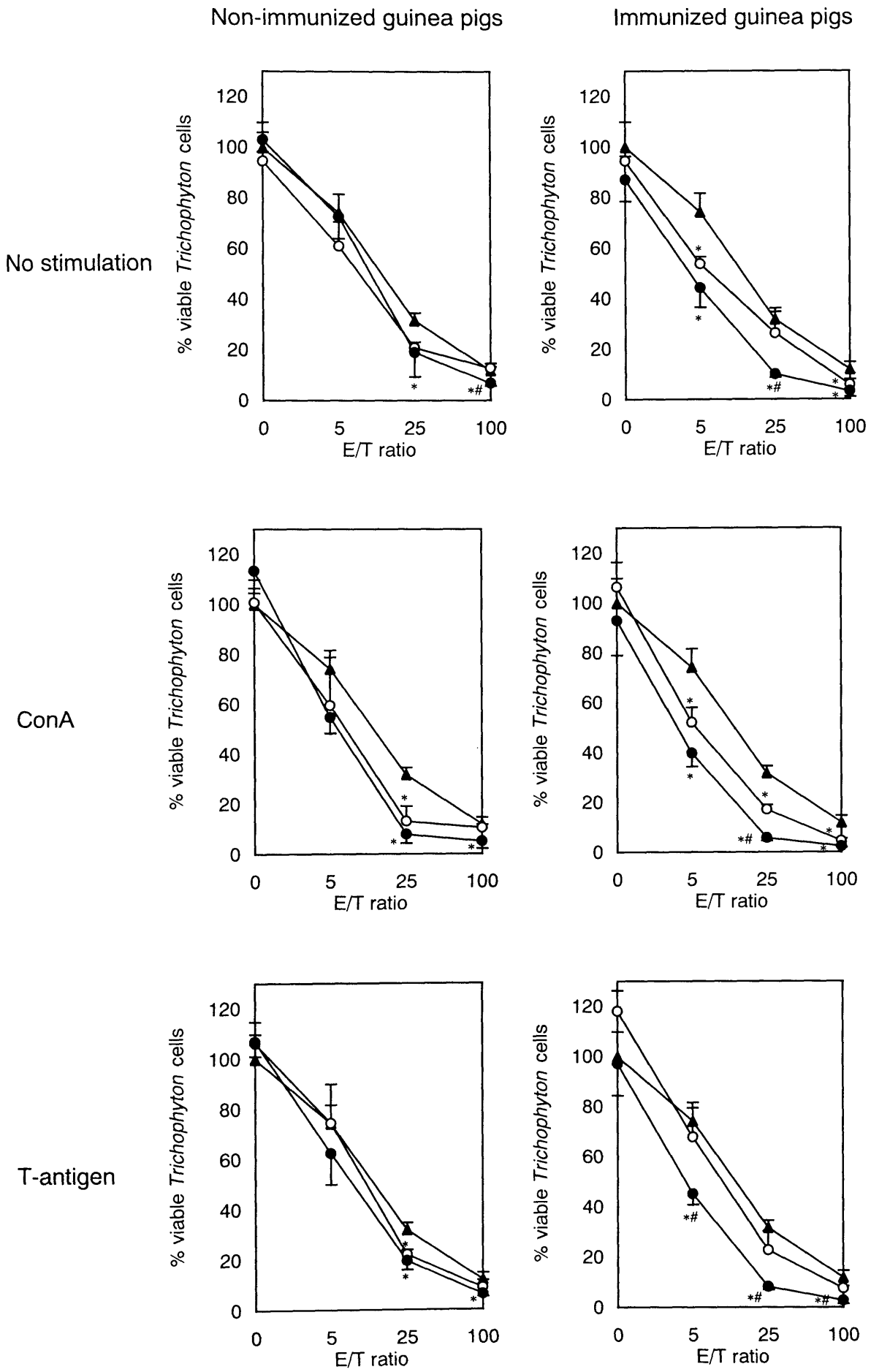

Non-immunized guinea pigs
Immunized guinea pigs
No stimulation
ConA
T-antigen
% viable Trichophyton cells
E/T ratio
0
5
25
100
120
100
80
60
40
20
0
*
*#

図６－４．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、残りの6匹は感作しなかった。それぞれの群の3匹づつ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、ConAまたは *Trichophyton* 抗原刺激あり、なしで、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、ANOVAとFisher's PLSDによる解析。他の2回の実験でも同様の結果が得られた。

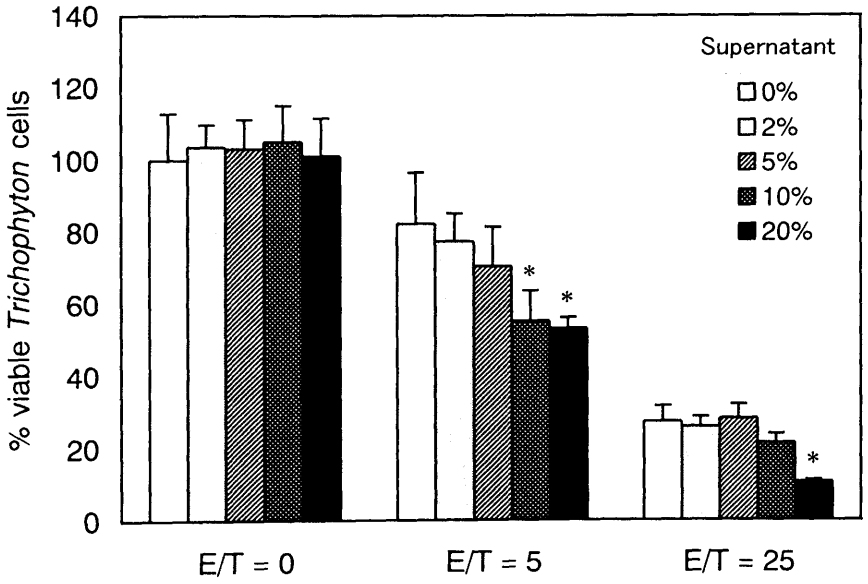


図６－５．単核球培養上清によるマクロファージ *Trichophyton* 殺菌活性亢進の用量依存性。3匹のモルモットを *Trichophyton* 抗原で感作し、ラクトフェリンを7日間経口投与した。感作7日後、脾臓単核球を単離し、*Trichophyton* 抗原存在下培養した。培養2日後培養上清を回収した。マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性は0~20%の上清添加によって調べた。* $P<0.05$ vs.それぞれのE/T ratioで上清なしのマクロファージ。

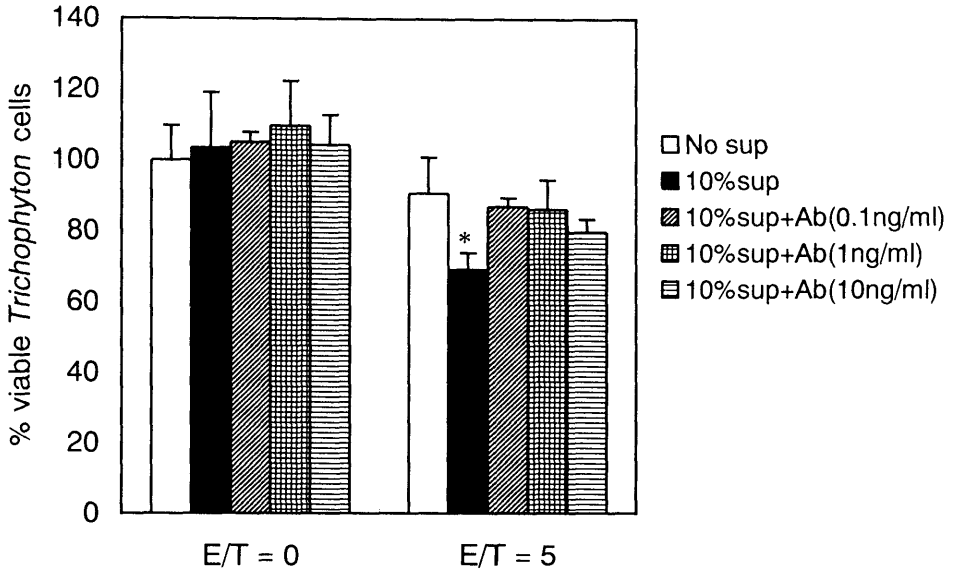


図６－６．マクロファージ *Trichophyton* 殺菌活性の単核球培養上清による亢進の抗 IFN-γ 抗体による阻害。3 匹のモルモットを *Trichophyton* 抗原で感作し、ラクトフェリンを7日間経口投与した。感作7日後、脾臓単核球を単離し、*Trichophyton* 抗原存在下で培養し、培養 2 日後培養上清を回収した。マクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性は 10%上清と、示した濃度のポリクローナル抗 rat IFN-γ 抗体添加によって調べた。* $P<0.05$ vs.それぞれの E/T ratio で上清なしのマクロファージ。

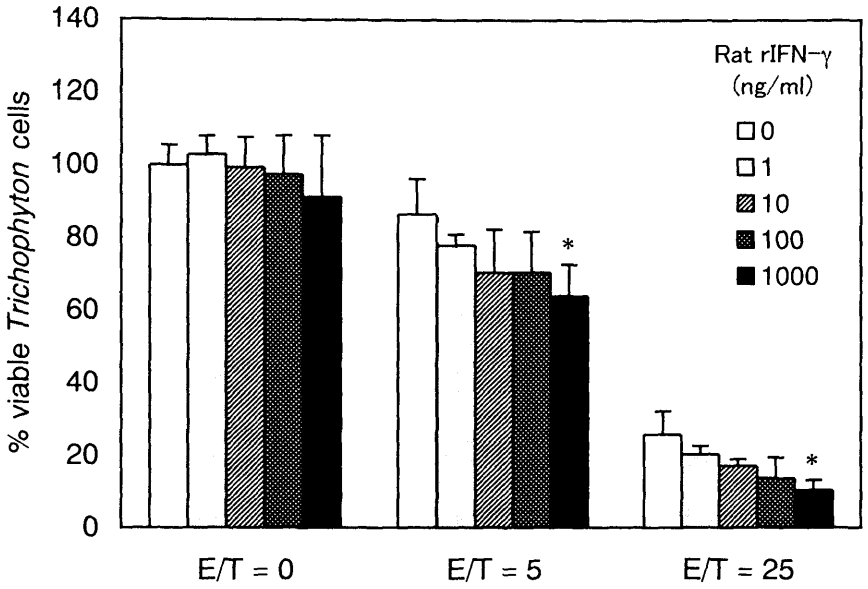


図６－７．モルモットマクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性に対する recombinant rat IFN-γ の影響。IFN-γ は 0~1000 ng/ml の濃度でアッセイ系に加えた。
* $P<0.05$ vs.それぞれの E/T ratio で IFN-γなしのマクロファージ。

４．考察

本研究において、皮膚糸状菌 *Trichophyton* に対する直接的、ないし生体を介したラクトフェリンの作用を調べた。ラクトフェリンは in vitro で直接的に *T. mentagrophytes* と *T. rubrum* の発育を阻止すること、ラクトフェリンの経口投与がモルモット白癬の治癒を促進することが示された。さらに、ラクトフェリンのモルモットへの投与は脾臓の単核球の増殖反応を抑制したが、単核球の培養上清はマクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性を促進した。

Trichophyton の in vitro 感受性試験で、ラクトフェリンとトランスフェリンは RPMI1640 培地でより活性が高いこと、一方ラクトフェリン由来のペプチド、ラクトフェリシン B はサブロー・グルコース・ブロス中でより活性が高いことが示された。この違いはそれぞれの抗菌メカニズムの違いを反映するものと思わ

れる。サブロー・グルコース・ブロスでは *Trichophyton* は急速に発育するため、ラクトフェリシン B のような殺菌的な物質（第 3 章）に感受性が高いのに対し、グルコースを添加していない RPMI1640 中ではゆっくり発育し、発育に重要な鉄の利用度がラクトフェリンやトランスフェリンによって制限されることに感受性が高くなっているのだろう。血清中のトランスフェリンと同様、皮膚に集積してきた好中球の脱顆粒によって放出されるラクトフェリンは、角質で発育する *Trichophyton* を阻止するために重要な働きをしていることが予想される。

急速な皮膚病変の改善と病変部に残る真菌数の低下により、経口投与したラクトフェリンがモルモットの白癬の治癒を促進することが示された。経口投与したラクトフェリンが直接通過する口腔内や腸管内では直接的な抗真菌作用が期待できる。しかし、そうした部位から離れたところである皮膚でこのような治療効果がどうして得られるのか疑問が残る。1 つの可能性は摂取したラクトフェリンや消化で出来たペプチド（Kuwata *et al.*, 1998）が腸管から吸収され、血流を通って感染部位に達し、そこで直接的な抗真菌作用を示すというものだ。ジャームフリーで初乳を摂取していない免疫学的にナイーブの子豚では、摂取したラクトフェリンは吸収され、そのままの分子形で血流に入り、エンドトキシンショックに対して防御作用を示すことが報告されている（Mehrazar *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1998）。しかしこの動物モデルは非常に特殊な例である。通常の動物やヒトでは摂取したタンパク質や部分消化されたペプチドが腸管から吸収される率は非常に低い。モルモットを用いた予備的実験では、ラクトフェリンの摂取後、ELISA 法によって血漿中のラクトフェリンやラクトフェリシン B 関連ペプチドを検出することは出来なかった。さらに血漿中の *Trichophyton* 阻止活性のレベルはラクトフェリン投与動物と非投与動物とで違いはなかった（未発表データ）。

経口投与したラクトフェリンは白癬に対して、直接の抗真菌作用ではなく、生体の免疫系に影響することで治療効果を示した可能性がある。マウスへのラクトフェリンの腹腔内投与は、T 細胞を介した NK 細胞の活性化によりサイトメガロウイルス感染に対して防御効果を示すこと、このとき血中 IFN-γ量が高まっていることが報告されている（Shimizu *et al.*, 1996）。またラクトフェリンの経口投与が、脾臓細胞の ConA 刺激による IFN-γ産性を高めることも報告されている。（Nakajima *et al.*, 1999）。投与したラクトフェリンは腸管組織内のある種の細胞を刺激することで全身の免疫応答、特に細胞性免疫を修飾し、それが生体防御の亢進につながることが考えられる。そのような仮説に立ち、経口投与ラクトフェリンの脾臓単核球の増殖反応への影響を調べた。抗原の存在下、非存在下で、むしろラクトフェリン投与により脾臓単核球の増殖は低下した。

本試験ではさらに、脾臓単核球のエフェクター機能として、マクロファージ *Trichophyton* 殺菌活性をモジュレートする作用に対するラクトフェリン投与の影響を評価した。抗原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顕著にマクロファージの殺菌活性を高めた。一方、抗原感作のみしたか、ラクトフェリンを投与しただけの動物の単核球培養上清は弱い活性増強効果を示した。このことはラクトフェリンを経口投与することが、抗原感作を受けた動物の単核球のエフェクター機能を高めるためにセカンドシグナルとして働いていることを示している。このマクロファージ活性の亢進作用は、ex vivo において ConA や *Trichophyton* 抗原で刺激しなかった単核球の培養上清でも見られた。ある単核球サブセットは、ex vivo での抗原刺激によりサイトカインを分泌するようになったというより、マクロファージを活性化させるエフェクターサイトカインを分泌するように in vivo でコミットメントを受けていたと思われる。モルモットは IL-2 や IFNs を産生することが知られている（Martensen *et al.*,

1987; Dejean *et al.*, 1987）が、現時点ではこれらのサイトカインをELISA法やRT-PCR法により定量することはできない。その代わりに、本試験ではこの上清がマクロファージの殺菌活性を高める効果があることと、その作用が抗rat IFN-γ抗体によりブロックされることを示した。さらに比較的高濃度のrecombinant rat IFN-γはモルモット・マクロファージの*Trichophyton*殺菌活性を高めた。ConA刺激したマウス・脾臓細胞の上清はマクロファージの抗菌作用を誘導するが、その作用はIFN-γに起因することが報告されている（Fortier *et al.*, 1992）。これらのことからモルモット単核球から分泌されたマクロファージを活性化するサイトカインがIFN-γ様サイトカインであることが示唆される。単核球によるIFN-γ様サイトカインの産生の誘導とそれによるマクロファージの*Trichophyton*に対する殺菌活性の亢進は、経口投与ラクトフェリンが白癬動物で治療効果を示す少なくとも1つのメカニズムであると考えられる。

IL-2とIFN-γは主要なTh1型サイトカインである。IL-2はT細胞の増殖に密接に関係している。一方、IFN-γはマクロファージを活性化するための重要なエフェクター・サイトカインである（Fortier *et al.*, 1992; Stout and Bottomly, 1989）。さらにIFN-γはリンパ球、特にTh2細胞の増殖を抑制することが知られている（Gajewski and Fitch, 1988; Dalton *et al.*, 1993）。ラクトフェリンの摂取による、脾臓単核球の増殖反応の低下と、単核球のエフェクター機能の向上の誘導は、IL-2の影響を越えたIFN-γの産生亢進によって説明がつく。しかしこれらの免疫学的側面について、サイトカイン産生なども含み、モルモットの代わりにマウスで詳細な解析を行うことが必要である。さらに、ラクトフェリン・レセプターはマウスの小腸冊子縁膜に存在し、ヒトとウシのラクトフェリンはマウス・ラクトフェリンのレセプターへの結合を競合阻害する（Hu *et al.*, 1988）。ラクトフェリンやその消化ペプチドが最初にコンタクトし、モジュレートする細胞とし

て小腸組織内の細胞の反応に興味が持たれる。

本研究は、ラクトフェリンの感染症における新しい重要性を示した。最近、ヒトでの臨床試験で、ラクトフェリンの経口投与が症状の改善を促進させることが示された（Yamauchi *et al.*, 1999）。ラクトフェリンは白癬を改善するための安全な食品成分として応用が可能かもしれない。

5．まとめ

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 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 効果を評価した。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。足白癬モルモットにおいて、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。さらに、*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。この活性亢進は抗 rat IFN-γ抗体の添加によって阻害された。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-γでも見られた。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、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。

第７章　総括

本研究はラクトフェリンとその活性フラグメントの、真菌を中心とした病原性微生物に対する抑制作用につき、in vitro を中心に、最後に in vivo で検討した。

第２章で、ラクトフェリン由来の抗菌ペプチド、ラクトフェリシン B のグラム陽性菌 *L. monocytogenes* に対する作用は、グラム陰性菌 *Escherichia coli* などに対するのと同じく殺菌的であり、一価陽イオン塩によって抑制を受けることから、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 1 μg/ml 以下であり、この菌種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。

第３章では、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 の抗真菌スペクトルを検討した。寒天希釈法により病原性真菌 75 株に対するラクトフェリシン B の MIC を測定した。その結果、ラクトフェリシン B に対して黒色真菌類、二形性真菌類は比較的高い感受性を示すこと、病原性酵母類、皮膚糸状菌類は菌種、菌株により感受性に違いが見られること、非着色性真菌類、接合菌類は抵抗性を示すことがわかった。次に、病原性酵母 *C. 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 は細胞壁の浸透圧抵抗性には影響を与えず、細胞内 K^+の流出と細胞外液の pH の上昇、つまり H^+の細胞内への流入を引き起こすことから、細胞膜が作用点であることが示唆された。

第４章では、ラクトフェリシン B 中の塩基性アミノ酸を多く含む 9 残基をコア部分として D 体化、N アシル化により合成したペプチド誘導体の抗真菌・抗細菌活性をミクロ液体希釈法により評価した。D 体化による誘導体および中鎖脂肪酸による修飾体の MIC は、*C. albicans* と *T. mentagrophytes* に対して、ラク

トフェリシンBの1/2から1/4であった。同様の活性の上昇は細菌類に対しても示された。さらに、抗酸化性について検討した。リポソームリン脂質の鉄／アスコルビン酸による過酸化の系において、ラクトフェリシンBはラクトフェリンと同様に酸化を抑制した。上述の中鎖脂肪酸による9残基誘導体は、この系において、ラクトフェリシンBより100倍程度強い抗酸化活性を示した。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。

真菌症の治療には各種の抗真菌剤が使用されているが、その中で最も汎用されているアゾール系抗真菌剤は、ラクトフェリンやラクトフェリシンBと相乗的に *C. albicans* の発育を抑制することが第5章において示された。*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、アゾール系抗真菌剤に耐性の株で検討したところ、同様の相乗効果が確認できた。このことはラクトフェリン存在量の高い子宮頚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可能性がある。

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。第6章では、ラクトフェリン経口摂取の真菌症に対するin vivo作用を確かめるために、モルモットの白癬モデルを用いて検討した。予備的検討において、ラクトフェリンは白癬菌 *Trichophyton* に対して、in vitroで発育阻止活性を

示した。一方、ラクトフェリンの経口投与は白癬モデルにおいて、治癒の促進、感染部位での残存菌数の低下をもたらした。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が、*Trichophyton* 抗原で感作され、なおかつラクトフェリンの経口投与を受けたモルモットの脾臓単核球培養上清はマクロファージの *Trichophyton* 殺菌活性を顕著に高めることがわかった。また培養上清の活性本体は IFN-γ様サイトカインであることが示唆された。このことは白癬に対する生体防御機構である細胞性免疫をラクトフェリン経口投与が高めている可能性を示している。

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、ラクトフェリシン B は真菌感染に対して膜障害作用により抗菌性エフェクター分子として働くと考えられ、ラクトフェリシン B コア領域への疎水性基の導入によってより高活性のペプチド誘導体の創製が可能である。またアゾール抗真菌剤による化学療法の効果を生体内に存在するラクトフェリンが高めていると思われる。口腔内や腸管内の *Candida* に対してはアゾール剤とラクトフェリン類の経口による併用療法の有効性が期待される。一方、皮膚真菌症に対しては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。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご支援をいただきました森永乳業株式会社代表取締役社長大野晃氏、同常務取締役冨田守氏、同取締役栄養科学研究所長早澤宏紀氏に謹んで感謝の意を表します。また、始終変わらぬご指導をいただきました帝京大学医真菌研究センター所長山口英世教授、同内田勝久教授、同平谷民雄講師（故人）、帝京大学医学部安部茂助教授に深く感謝致します。さらに、森永乳業株式会社栄養科学研究所基礎研究室長寺口進氏をはじめ、室員の皆様、栄養科学研究所及び生物科学研究所の関係者の皆様にご協力いただきました。心から感謝致します。

最後に、本論文をまとめるにあたり、金沢大学理学部桜井勝教授に特別のご指導をいただきました。ここに、厚く感謝の意を表します。

引用文献

Abe, S., T. Satoh, Y. Tokuda, S. Tansho, and H. Yamaguchi. 1994. A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*. Microbiol. Immunol. 38:385-388.

Aisen, P., and A. Liebman. 1972. Lactoferrin and transferrin (A comparative study). Biochim. Biophys. Acta. 257:314-323.

Alvarez-Bravo, J., S. Kurata, and S. Natori. 1994. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. 302:535-538.

Arika, T., M. Yokoo, and H. Yamaguchi. 1992. Topical treatment with butenafine significantly lowers relapse rate in an interdigital tinea pedis model in guinea pigs. Antimicrob. Agents Chemother. 36:2523-2525.

Arnold, R.R., J.E. Russell, W.J. Champion, and J.J. Gauthier. 1981. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. Infect. Immun. 32:655-660.

Arnold, R.R., M.F. Cole, and J.R. McGhee. 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. Science. 197:263-265.

Artis, W.M., E. Patrusky, F. Rastinejad, and R.L. Duncan Jr. 1983. Fungistatic mechanism of human transferrin for *Rhizopus oryzae* and *Trichophyton mentagrophytes*: Alternative to simple iron deprivation. Infect. Immun. 41:1269-1278.

Baer, A., M. Oroz, and B. Blanc. 1979. Isolation and partial characterization of ovine

lactoferrin. Experientia. 35:1554-1560.

Baldwin, G.S. 1993. Comparison of transferrin sequences from different species. Comp. Biochem. Physiol. 106B:203-218.

Bals, R., X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, and J.M. Wilson. 1998. Human β-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. J. Clin. Invest. 102:874-880.

Bartfeld, N.S., and J. Law. 1990. Isolation and molecular cloning of transferrin from the tabacco hornworm *Manduca sexta*. Sequence similarity to the vertebrate transferrins. J. Biol. Chem. 265:21684-21691.

Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita. 1993a. Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. J. Appl. Bacteriol. 75:478-484.

Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita. 1993b. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Med. Microbiol. Immunol. 182:97-105.

Bellamy, W., K. Yamauchi, H. Wakabayashi, M. Takase, N. Takakura, S. Shimamura, and M. Tomita. 1994. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Lett. Appl. Microbiol. 18:230-233.

Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita. 1992b. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J. Appl. Bacteriol. 73:472-479.

Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita.

1992a. Identification of bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta. 1121:130-136.

Ben-Yaacov, R., S. Knoller, G.A. Caldwell, J.M. Becker, and Y. Koltin. 1994. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. Antimicrob. Agents Chemother. 38:648-652.

Birgens, H.S., H. Karle, N.E. Hansen, and L.Ø. Kristensen. 1984. Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. Scand. J. Haematol. 33:275-280.

Boxer, L.A., T.D. Coates, R.H. Haak, J.B. Wolach, S. Hoffstein, and R.L. Baehner. 1982. Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function. N. Engl. J. Med. 307:404-410.

Branton, W.D., M.S. Rudnick, Y. Zhou, E.D. Eccleston, G.B. Fields, and L.D. Bowers. 1993. Fatty acylated toxin structure. Nature 365:496-497.

Britigan, B.E., M.B. Hayek, B.N. Doebbeling, and R.B. Fick Jr. 1993. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. Infect. Immun. 61:5049-5055.

Brock, J. 1995. Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? Immunol. Today. 16:417-419.

Broxmeyer, H.E., M. DeSousa, A. Smithyman, P. Ralph, J. Hamilton, J.I. Kurland, and J. Bognacki. 1980. Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. Blood. 55:324-333.

Byrd, T.F., and M.A. Horwitz. 1991. Lactoferrin inhibits or promotes *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. Iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against

Legionella pneumophila. J. Clin. Invest. 88:1103-1112.

Calderon, R.A., and R.J. Hay. 1987. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. Immunology. 61:289-295.

Chapple, D. S., D. J. Mason, C. L. Joannou, E. W. Odell, V. Gant, and R. W. Evans. 1998. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. Infect. Immun. 66:2434-2440.

Chen, H.-C., J. H. Brown, J. L. Morell, and C. M. Huang. 1988. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. FEBS Lett. 236:462-466.

Chierici, R., and V. Vigi. 1994. Lactoferrin in infant formulae. Acta Paediatr. 402:83-88.

Conneely, O.M., G.A. Cunningham, F.J. De Mayo, B.M. Jericevic, O. Saucedo-Cardenas, and J.P. Lydon. 1997. Targeted disruption of lactoferrin reveals essential cytokine role in the development of extraembryonic trophoectoderm. In abstracts of third international conference on lactoferrin, Le Touquet, France.

Cope, J.E. 1980. Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: effects on growth, viability and K^+ release. J. Gen. Microbiol. 19:245-251.

Dalton, D.K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I.S. Figari, A. Bradley, and T.A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-γ genes. Science. 259:1739-1742.

Davidson, L.A., and B. Lönnerdal. 1986. Isolation and characterization of rhesus monkey milk lactoferrin. Pediatr. Res. 20:197-201.

Dayal, R., J. Hurlimann, Y.M. Suard, and J.P. Kraehenbuhl. 1982. Chemical and immunochemical characterization of caseins and the major whey proteins of rabbit

milk. Biochem. J. 210:71-79.

Dejean, C.B., B.L. Ayerra, and A.R. Teyssie. 1987. Interferon response in the guinea pig infected with Junin virus. J. Med. Virol. 23:83-91.

Elass-Rochard, E., A. Roseanu, D. Legrand, M. Trif, V. Salmon, C. Motas, J. Montreuil, and G. Spik. 1995. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. Biochem. J. 312:839-845.

Eliopoulos, G.M., and R.C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p.432-492. In Lorian, V. (eds), Antibiotics in laboratory medicine, 3rd ed, Williams & Wilkins, Baltimore.

Ellison, R.T., T.J. Giehl, and F.M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immun. 56:2774-2781.

Ellison, R.T., and T.J. Giehl. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. J. Clin. Invest. 88:1080-1091.

Fleming, D.W., S.L. Cochi, K.L. MacDonald, J. Brondum, P.S. Hayes, B.D. Plikaytis, M.B. Holmes, A. Audurier, C.V. Broome, and A.L. Remgold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 312:404-407.

Fortier, A.H., T. Polsinelli, S.J. Green, and C.A. Nacy. 1992. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: Identification of cytokines, effector cells, and effector molecules. Infect. Immun. 60:817-825.

Gahr, M., C.P. Speer, B. Damerau, and G. Sawatzki. 1991. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J. Leukocyte

Biol. 49:427-433.

Gajewski, T.F., and F.W. Fitch. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-γ in immune regulation. I. IFN-γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. J. Immunol. 140:4245-4252.

Gellin, B.G., and C.V. Broom. 1989. Listeriosis. J. Am. Med. Assoc. 261:1313-1320.

Groves, M.L. 1960. The isolation of a red protein from milk. J. Am. Chem. Soc. 82:3345-3350.

Gutteberg, T.J., B. Haneberg, and T. Jørgensen. 1984. The latency of serum acute phase proteins in meningococcal septicemia, with special emphasis on lactoferrin. Clin. Chim. Acta. 136:173-178.

Gutteridge, J.M.C. 1977. The measurement of malondialdehyde in peroxidised ox-brain phospholipid liposomes. Anal. Biochem. 82:76-82.

Gutteridge, J.M.C., S.K. Paterson, A.W. Segal, and B. Halliwell. 1981. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. Biochem. J. 199:259-261.

Halliwell, B. 1991. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? Drugs 42:569-605.

Hanifin, J.M., J.F. Ray, and W.C. Lobitz Jr. 1974. Immunological reactivity in dermatophytosis. Br. J. Dermatol. 90:1-8.

Harmon, R.J., F.L. Schanbacher, L.C. Ferguson, and K.L. Smith. 1976. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and a-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. Infect. Immun. 13:533-542.

Hay, R.J. 1990. Overview of studies of fluconazole in oropharyngeal candidiasis. Rev. Infect. Dis. 12(Suppl. 3):334-337.

Hay, R.J. 1994. Immunology of dermatophytosis. Jpn. J. Med. Mycol. 35:1-8.

Hiratani, T., and H. Yamaguchi. 1984. Studies on the mode of antifungal action of bifonazole. Chemotherapy. 32:829-841.

Hoek, K. S., J. M. Milne, P. A. Grieve, D. A. Dionysius, and R. Smith. 1997. Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 41:54-59.

Houghten, R. A., C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, and J. H. Cuervo. 1991. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. Nature 354:84-86.

Hu, W.-L., J. Mazurier, G. Sawatzki, J. Montreuil, and G. Spik. 1988. Lactoferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and Triton X-100-solubilized forms. Biochem. J. 249:435-441.

Huettinger, M., M. Meilinger, C. Gschwentner, and H. Lassmann. 1998. The LDL-receptor family. Lactoferrin and lipid metabolism. p. 107-111. In G. Spik et al. (ed.), Advances in lactoferrin research, Plenum Press, New York.

Hwang, P.M., N. Zhou, X. Shan, C.H. Arrowsmith, and H. J. Vogel. 1998. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. Biochemistry. 37:4288-4298.

Itoyama, T., Y, Aoki, T, Hiratani, K, Uchida, and H. Yamaguchi. 1993. In vitro antifungal activity of omoconazole nitrate, a new imidazole antimycotic. Jpn. J. Antibiotics. 46:773-780.

Jamroz, R.C., J.R. Gasdaska, J.Y. Bradfield, and J.H. Law. 1993. Transferrin in a cockroach: Molecular cloning, characterization, and suppression by jevenile hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:1320-1324.

Jeltsch, J.-M., and P. Chambon. 1982. The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. Eur. J. Biochem. 122:291-295.

Johansson, B.G. 1960. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. Acta Chem. Scand. 14:510-512.

Jollés, J., A. Donda, P. Amiguet, and P. Jollés. 1984. More lactotransferrin: purification, analysis and N-terminal sequence determination. FEBS Lett. 176:185-188.

Jones, H.E., J.H. Reinhardt, and M.G. Rinaldi. 1974. Immunologic susceptibility to chronic dermatophytosis. Arch. Dermatol. 110:213-220.

Kakuta, I., and H. Kurokura. 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of red sea bream. Fish Pathol (Tokyo). 30:289-290.

Kan, V.L., A. Geber, and J.E. Bennett. 1996. Enhanced oxidative killing of azole-resistant *Candida glabrata* strains with ERG11 deletion. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1717-1719.

Kang, J. H., M. K. Lee, K. L. Kim, and K.-S. Hahm. 1996. Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. Int. J. Pept. Protein Res. 48:357-363.

King, R.D., H.A. Khan, J.C. Foye, J.H. Greenberg, and H.E. Jones. 1975. Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. J. Lab. Clin. Med. 86:204-212.

Kinkade, J.M., W.W. Miller, and F.M. Segers. 1976. Isolation and characterization of murine lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta. 446:407-418.

Kirkpatrick, C.H., I. Green, R.R. Rich, and A.L. Schade. 1971. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense

mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. J. Infect. Dis. 124:539-544.

Koga, T., H. Ishizaki, T. Matsumoto, and Y. Hori. 1993. Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in a dermatophytosis patient in response to stimulation with trichophytin. J. Dermatol. 20:441-443.

Koga, T., H. Ishizaki, T. Matsumoto, and Y. Hori. 1993. In vitro release of interferon-γ by peripheral blood mononuclear cells of dermatophytosis patients in response to stimulation with trichophytin. Br. J. Dermatol. 128:703-704.

Koga, T., H. Ishizaki, T. Matsumoto, and Y. Hori. 1994. In vitro release of granulocyte/macrophage colony stimulating factor by peripheral blood mononuclear cells of dermatophytosis patients in response to stimulation with trichophytin. Clin. Exp. Dermatol. 19:94-95.

Koga, T., H. Ishizaki, T. Matsumoto, and Y. Hori. 1995. Decreased release of interferon-γ by peripheral blood in response to stimulation with trichophytin. Acta. Derm. Venereol. (Stockh) 75:81-82.

Kruisbeek, A.M. 1993. Isolation of mouse mononuclear cells. 3.1.2-3.1.5. In E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, (eds), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York.

Kurama, T., S. Kurata, and S. Natori. 1995. Molecular characterization of an insect transferrin and its selective incorporation into eggs during oogenesis. Eur. J. Biochem. 228:229-235.

Kuwata, H., T-T. Yip, K. Yamauchi, S. Teraguchi, H. Hayasawa, M. Tomita, and T.W. Hutchens. 1998. The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. Biochem. J. 334:321-323.

Kuwata, H., T.T. Yip, M. Tomita, and T.W. Hutchens. 1998. Direct evidence of the

generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta. 1429:129-141.

Larsson, S., M.H. Walder, S.N. Cronberg, A.B. Forsgren, T. Moestrup. 1985. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 1958 to 1982 in Sweden. Antimicrob. Agents Chemother. 28:12-14.

Lash, J.A., T.D. Coates, J. Lafuze, R.L. Baehner, and L.A. Boxer. 1983. Plasma lactoferrin reflects granulocyte antivation in vivo. Blood. 61:885-888.

Law, B.A., and B. Reiter. 1977. The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey. J. Dairy Res. 44:595-599.

Lawson, N.D., D.S. Krause, and N. Berliner. 1998. Normal neutrophil differentiation and secondary granule gene expression in the EML and MPRO cell line. Exp. Hematol. 26:1178-1185.

Lee, W.J., J.L. Farmer, M. Hilty, and Y.B. Kim. 1998. The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. Infect. Immun. 66:1421-1426.

Legrand, D., J. Mazurier, A. Elass, E. Rochard, G. Vergoten, P. Maes, J. Montreuil, and G. Spik. 1992. Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. Biochemistry. 31:9243-9251.

Lenander-Lumikari, M., and I. Johansson. 1995. Effect of saliva composition on growth of *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. Oral Microbiol. Immunol. 10:233-240.

Levay, P.F., and M. Viljoen. 1995. Lactoferrin: a general review. Haematologica.

80:252-267.

Li, Y.M., A.X. Tan, and H. Vlassara. 1995. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. Nature Med. 1:1057-1061.

Liu, Y., and C.T. Teng. 1991. Characterization of estrogen-responsive mouse lactoferrin promoter. J. Biol. Chem. 266:21880-21885.

Lönnerdal, B., and S. Iyer. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annu. Rev. Nutr. 15:93-110.

MacGillivray, R.T.A., E. Mendez, J.G. Shewale, S.K. Sinha, J. Lineback-Zins, and K. Brew. 1983. The primary structure of huan serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete suructure. J. Biol. Chem. 258:3543-3553.

Machnicki, M., M. Zimecki, and T. Zagulski. 1993. Lactoferrin regulates the release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. Int. J. Exp. Pathol. 74:433-439.

Machnicki, M., M. Zimecki, and T. Zagulski. 1993. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. Int. J. Exp. Path. 74:433-439.

Malamud, D., and J.W. Drysdle. 1978. Isoelectric points of proteins: a table. Anal. Biochem. 86:620-647.

Martensen, H., K. Haslov, B. Mansa, and M.W. Bentzon. 1987. Production, assay and partial characterization of guinea pig interleukin 2. J. Immunol. Methods. 104:209-217.

Martinez-Suarez, J.V., and J.L. Rodriguez-Tudela. 1996. In vitro activities of semisynthetic pneumocandin L-733,560 against fluconazole-resistant and -

susceptible *Candida albicans* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1277-1279.

Masson, P.L., J.F. Heremans, and C.H. Dive. 1966. An iron-binding protein common to many external secretions. Clin. Chim. Acta 14:735-739.

Masson, P.L., and J.F. Heremans. 1971. Lactoferrin in milk from different species. Comp. Biochem. Physiol. 39B:119-129.

Matsue, M., J. Matsuyama, and I. Kiyosawa. 1995. Interaction of lactoferrin with ascorbate and the relationship with bleomycin-dependent DNA damage. Biosci. Biotechnol. Biochem., 59:358-362.

Mattsby-Baltzer, I., A. Roseanu, C. Motas, J. Elverfors, I. Engberg, and L.Å. Hanson. 1996. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. Pediatr. Res. 40:257-262.

McAbee, D.D., D.J. Bennatt, and Y.Y. Ling. 1998. Identification and analysis of a Ca^{2+}-dependent lactoferrin receptor in rat liver. p. 113-121. In G. Spik et al. (ed.), Advances in lactoferrin research, Plenum Press, New York.

McCombs, J.L., C.T. Teng, B.T. Pentecost, V.L. Magnuson, C.M. Moore, and J.R. McGill. 1988. Chromosomal localization of human lactotransferrin gene (LTF) by in situ hybridization. Cytogenet. Cell Genet. 47:16-17.

McMaster, M.T., C.T. Teng, S.K. Dey, and G.K. Andrews. 1992. Lactoferrin in the mouse uterus: analysis of the preimplantation period and regulation by ovarian steroids. Mol. Endocrinol. 6:101-111.

Mclaughlin, J. 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in human. J. Appl. Bacteriol. 63:1-11.

Mead, P.E., and J.W. Tweedie. 1990. cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin.

Nucl. Acids Res. 18:7167.

Mehrazar, K., A. Gilman-Sachs, and Y.B. Kim. 1993. Intestinal absorption of immunologically intact macromolecules in germfree colostrum-deprived piglets maintained on total parenteral nutrition. J. Parenter. Enteral. Nutr. 17:8-15.

Metz-Boutigue, M.-H., J. Jollès, J. Mazurier, F. Schoentgen, P. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, and P. Jollès. 1984. Human lactotransferrin: animo acid sequence and structural comparisons with other transferrins. Eur. J. Biochem. 145:659-676.

Miyata, T., T. Fujimura, M. Masuzawa, K. Katsuoka, and S. Nishiyama. 1996. Local expression of IFN-γ mRNA in skin lesion of patients with dermatophytosis. J. Dermatol. Sci. 13:167-171.

Miyauchi, H., A. Kaino, I. Shinoda, Y. Fukuwatari, and H. Hayasawa. 1997. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and peyer's patch cells. J. Dairy Sci. 80:2330-2339.

Miyauchi, H., S. Hashimoto, M. Nakajima, I. Shinoda, Y. Fukuwatari, and H. Hayasawa. 1998. Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. Cell. Immunol. 187:34-37.

Miyazaki, S., Y. Harada, A. Tsuji, and S. Goto. 1991. In vivo combined effects of lactoferrin (LF) and drugs on bacterial infections in mice. Chemotherapy (Tokyo). 39:829-835.

Montreuil, J., J. Tonnelat, and S. Mullet. 1960. Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. Biochim. Biophys. Acta. 45:413-421.

Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol.

7:145-173.

Nagasako, Y., H. Saito, Y. Tamura, S. Shimamura, and M. Tomita. 1993. Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution. J. Dairy Sci., 76:1876-1881.

Nagasawa, T., I. Kiyosawa, and K. Kuwahara. 1972. Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. J. Dairy Sci. 55:1651-1659.

Naidu, A.S., and R.R. Arnold. 1994. Lactoferrin interaction with *Salmonellae* potentiates antibiotic susceptibility in vitro. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 20:69-75.

Nakajima, M., H. Iwamoto, T. Shirasawa, H. Miyauchi, Z. Takatsu, N. Yamazaki, S. Teraguchi, and H. Hayasawa. 1999. Oral administration of lactoferrin enhances the productions of IFN-γ and IL-10 in spleen cells cultured with concanavalin A or lipopolysaccharide. Biomed. Res. 20:27–33.

Nakano, M., and T. Sakurai. 1990. Lipid peroxidation by chelated iron compounds. Yukagaku 39:784-790.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Niidome, T., K. Okamoto, R. Kawakami, N. Ohmori, H. Mihara, and H. Aoyagi. 1996. Interaction of lipophilized mastoparan with phospholipid membranes. Pept. Chem. 33:217-220.

Nikawa, H., L.P. Samaranayake, J. Tenovuo, K.M. Pang, and T. Hamada. 1993. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. Arch. Oral Biol. 38:1057-1063.

Niwano, Y., T. Tabuchi, K. Kanai, H. Hamaguchi, K. Uchida, and H. Yamaguchi. 1995. Short-term topical therapy of experimental tinea pedis in guinea pigs with

lanoconazole, a new imidazole antimycotic agent. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2353-2355.

Odds, F.C. 1988. *Candida* and candidosis: a review and bibliography, 2nd ed. Balliere Tindall, London.

Odds, F.C., A. Cockayne, J. Hayward, and A.B. Abbott. 1985. Effects of imidazole- and triazole-derivative antifungal compounds on the growth and morphological development of *Candida albicans* hyphae. J. Gen. Microbiol. 131:2581-2589.

Odds, F.C., J. Schmid, and D.R. Soll. 1990. Epidemiology of *Candida* infections in AIDS, p. 67-74. In H. Vanden Bossche et al. (ed.), Mycoses in AIDS patients. Plenum Press, New York.

Odell, E. W., R. Sarra, M. Foxworthy, D. S. Chapple, and R. W. Evans. 1996. Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. FEBS Lett. 382:175-178.

Okutomi, T., S. Abe, S. Tansho, H. Wakabayashi, K. Kawase, and H. Yamaguchi. 1997. Augmented inhibition of growth of *Candida albicans* by neutrophils in the presence of lactoferrin. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18:105-112.

Palma, C., A. Cassone, D. Serbousek, C.A. Pearson, and J.Y. Djeu. 1992a. Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphocuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. Infect. Immun. 60:4604-4611.

Palma, C., D. Serbousek, A. Torosantucci, A. Cassone, and J.Y. Djeu. 1992b. Identification of a mannoprotein fraction from *Candida albicans* that enhances human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions and stimulates lactoferrin

in PMNL inhibition of candidal growth. J. Infect. Dis. 166:1103-1112.

Perraudin, J.P., and J.P. Prieels. 1982. Lactoferrin binding to lysozyme-treated *Micrococcus luteus*. Biochim. Biophys. Acta. 718:42-48.

Prasad, R., P. de Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi. 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. Curr. Genet. 27:320-329.

Rado, T.A., J. Bollekens, G. St. Laurent, L. Parker, and E.J. Benz Jr. 1984. Lactoferrin biosynthesis during granulocytopoiesis. Blood. 64:1103-1109.

Reiter, B. 1983. The biological significance of lactoferrin. Int. J. Tissue React. 5:87-96.

Rex, J.H., M.G. Rinaldi, and M.A. Pfaller. 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1-8.

Roberts, T.K., and J.C. Boursnell. 1975. The isolation and characterization of lactoferrin from sow milk and boar seminal plasma. J. Reprod. Fertil. 42:579-582.

Rogers, H.J., and C. Synge. 1978. Bacteriostatic effect of human milk on *Escherichia coli*: the role of IgA. Immunology. 34:19-28.

Rose, T.M., G.D. Plowman, D.B. Teplow, W.J. Dreyer, K.E. Hellstrom, and J.P. Brown. 1986. Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:1261-1265.

Rosenow, E.M., and E.H. Marth. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole, and chocolate milk and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C. J. Food Prot. 50:452-459.

Ruhnke, M., A. Schmidt-Westhausen, and M. Trautmann. 1997. In vitro activities of voriconazole (UK-109,496) against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida*

albicans isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. Antimicrob. Agents Chemother. 41:575-577.

Ryser, E.T., and E.H. Marth. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated strage. J.Food Prot. 51:615-621.

Sawatzki, G., and B. Kubanek. 1983. Isolation and ELISA of mouse and human lactoferrin. p.441-443. In I. Urushizaki, P. Aisen, I. Listowsky, and J.W. Drysdale, (eds), Structure and Function of Iron Storage and Transport Protein, Elsevier, Amsterdam.

Sawatzki, G., and I.N. Rich. 1989. Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production in vitro and in vivo. Blood Cells. 15:371-385.

Schlech, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and C.V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis –evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308:203-206.

Shimizu, K., H. Matsuzawa, K. Okada, S. Tazume, S. Dosako, Y. Kawasaki, K. Hashimoto, and Y. Koga. 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.

Shinmoto, H., S. Dosako, and I. Nakajima. 1992. Anti-oxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induced lipid peroxidation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:2079-2080.

Shinoda, I., M. Takase, Y. Fukuwatari, S. Shimamura, M. Köller, and W. König. 1996. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:521-523.

Slater, K., and J. Fletcher. 1987. Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. Blood. 69:1328-1333.

Soukka, T., J. Tenovuo, and M. Lenander-Lumikari. 1992. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett. 69:223-228.

Stout, R.D., and K. Bottomly. 1989. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-γ producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. J. Immunol. 142:760-765.

Suzuki, T., M. Nonaka, I. Kiyosawa, and S. Ogasa. 1977. Lactoferrin contents in bovine colostrum and milk. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 30:317-322.

Sánchez, L., M. Calvo, J.H. Brock. 1992. Biological role of lactoferrin. Arch. Dis. Child. 67:657-661.

Tagami, H. 1985. Epidermal cell proliferation in guinea pigs with experimental dermatophytosis. J. Invest. Dermatol. 85:153-155.

Tansho, S., T. Tansho, T. Ikeda, P.D. Perera, S. Abe, and H. Yamaguchi. 1996. Augmentation of anti-*Candida* activity of lanoconazole by lysozyme. Jpn. J. Med. Mycol. 37:245-249.

Teng, C.T. 1994. Lactoferrin gene promoter in human and mouse. p. 183-196. In T.W. Hutchens et al. (ed.), Lactoferrin: structure and function, Plenum Press, New York.

Teng, C.T., B.T. Pentecost, A. Marshall, A. Solomon, B.H. Bowman, P.A. Lalley, and S.L. Naylor. 1987. Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. Somat. Cell Mol. Genet. 13:689-693.

Teng, C.T., B.T. Pentecost, Y.H. Chen, R.R. Newbold, E.M. Eddy, and J.A. McLachlan. 1989. Lactoferrin gene expression in the mouse uterus and mammary gland.

Endocrinology. 124:992-999.

Teng, C.T., H. Shi, N. Yang, and H. Shigeta. 1998. Mouse lactoferrin gene. Promoter-specific regulation by EGF and cDNA cloning of the EGF-response-element binding protein. p. 65-78. In G. Spik et al. (ed.), Advances in lactoferrin research, Plenum Press, New York.

Teraguchi, S., K. Shin, K. Ozawa, S. Nakamura, Y. Fukuwatari, S. Tsuyuki, H. Namihira, and S. Shimamura. 1995b. Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. Appl. Environ. Microbiol. 61:501-506.

Teraguchi, S., K. Shin, T. Ogata, M. Kingaku, A. Kaino, H. Miyauchi, Y. Fukuwatari, and S. Shimamura. 1995a. Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. Appl. Environ. Microbiol. 61:4131-4134.

Tomita, M., M. Takase, W. Bellamy, S. Shimamura. 1994. A review: The active peptide of lactoferrin. Acta Paediatr. Jpn. 36:585-591.

Tomita, M., W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, and K. Kawase. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. J. Dairy Sci. 74:4137-4142.

Tomoda, T., and A. Takai. 1993. Relation between lactoferrin level and number of *Bifidobacterium* or *Candida* in feces. Bifidobacteria Microflora. 12:69-74.

Towler, D.A., and J.I. Gordon. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. Ann. Rev. Biochem. 57:69-99.

Uchida, K. 1991. Microdilution method to measure susceptibility of fungi to antifungal agents. Jpn. J. Med. Mycol. 32:245-247.

Uchida, K., and H. Yamaguchi. 1994. Effectiveness of oral treatment with terbinafine in

a guinea pig model of tinea pedis. Jpn. J. Antibiot. 47:1401-1406.

Valenti, P., P. Visca, G. Antonini, and N. Orsi. 1986. Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells. FEMS Microbiol. Lett. 33:271-275.

Wade, D., A. Boman, B. Wåhlin, C. M. Drain, D. Andreu, H. G. Boman, and R. B. Merrifield. 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4761-4765.

Wakabayashi, H., H. Matsumoto, K. Hashimoto, S. Teraguchi, M. Takase, and H. Hayasawa. 1999a. N-acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1267-1269.

Wakabayashi, H., H. Matsumoto, K. Hashimoto, S. Teraguchi, M. Takase, and H. Hayasawa. 1999b. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:955-957.

Wakabayashi, H., S. Abe, S. Teraguchi, H.Hayasawa, and H. Yamaguchi. 1998. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1587-1591.

Wakabayashi, H., S. Abe, T. Okutomi, S. Tansho, K. Kawase, and H. Yamaguchi. 1996b. Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. Microbiol. Immunol. 40:821-825.

Wakabayashi, H., T. Hiratani, K. Uchida, and H. Yamaguchi. 1996a. Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. J. Infect. Chemother. 1:185-189.

Wakabayashi, H., W. Bellamy, M. Takase, and M. Tomita. 1992. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. J. Food Prot. 55:238-240.

Walmer, D.K., M.A. Wrona, C.L. Hughes, and K.G. Nelson. 1992. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. Endocrinology. 131:1458-1466.

Ward, P.P., M.M. Mendoza, O. Saucedo-Cardenas, C.T. Teng, and O.M. Conneely. 1998. Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryogenesis. p. 91-100. In G. Spik et al. (ed.), Advances in lactoferrin research, Plenum Press, New York.

Weis, J., and H.P.R. Seeliger. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30:29-32.

Welty, F.K., K.L. Smith, and F.L. Schanbacher. 1976. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 59:224-231.

Yamaguchi, H., T. Hiratani, K. Iwata, and Y. Yamamoto. 1982. Studies of the mechanism of antifungal action of aculeacin A. Jpn. J. Antibiotics. 35:210-219.

Yamaguchi, H., and K. Uchida. 1984. In vivo activity of bifonazole in guinea pigs: Its characteristic features and comparison with clotrimazole. Dermatologica. 169:33-46.

Yamauchi, K., H. Hiruma, N. Yamazaki, H. Wakabayashi, H. Kuwata, S. Teraguchi, H. Hayasawa, N. Suegara, and H. Yamaguchi. 1999. Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of tinea pedis: a placebe-controlled, double-blind study. Mycoses. (in press).

Yoo, Y.-C., S. Watanabe, R. Watanabe, K. Hata, K. Shimazaki, and I. Azuma. 1997.

Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. Jpn. J. Cancer Res. 88:184-190.

Yoshiga, T., V.P. Hernandez, A.M. Fallon, and J.H. Law. 1997. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:12337-12342.

Zagulski, T., P. Lipinski, A. Zagulska, S. Broniek, and Z. Jarzabek. 1989. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. Br. J. Exp. Path. 70:697-704.

Zagulski, T., P. Lipinski, A. Zagulska, and Z. Jarzabek. 1998. Antibacterial system generated by lactoferrin in mice *in vivo* is primarily a killing system. Int. J. Exp. Path. 79:117-123.

Zimecki, M., J. Mazurier, G. Spik, and J.A. Kapp. 1996. Lactoferrin inhibits proliferative response and cytokine production of TH1 but not TH2 cell lines. Arch. Immunol. Ther. Exp. 44:51-56.

Zimecki, M., J. Mazurier, M. Machnicki, Z. Wieczorek, J. Montreuil, and G. Spik. 1991. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of $CD4^-CD8^-$ murine thymocytes. Immunol. Lett. 30:119-124.

Zucali, J.R., H.E. Broxmeyer, D. Levy, and C. Morse. 1989. Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin-1. Blood. 74:1531-1536.

Reprinted from
Journal of Food Protection, Vol. 55, No. 4, Pages 238-240 (April 1992)
Copyright©, International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians

Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Lactoferricin, a Potent Antimicrobial Peptide Derived from Cow's Milk

HIROYUKI WAKABAYASHI, WAYNE BELLAMY*, MITSUNORI TAKASE, and MAMORU TOMITA

Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd., 1-83-5 Higashihara, Zama City, Kanagawa 228, Japan

(Received for publication July 7, 1991)

ABSTRACT

The susceptibility of *Listeria monocytogenes* to inhibition and inactivation by lactoferricin, a newly isolated antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin present in cow's milk, was studied in laboratory media. Lactoferricin showed an effectiveness similar to that of many clinically useful antibiotics, causing complete inhibition of four strains of *L. monocytogenes* (serotypes 1b, 2, 3, and 4a) at low concentrations varying within the range of 0.3 to 9 μg/ml depending on the strain and the culture medium used. The effectiveness of lactoferricin against *L. monocytogenes* was not strongly affected by the presence of various carbohydrates or proteins but was somewhat diminished in the presence of various salts. The peptide showed potent activity over the pH range of 5.5 to 7.5. The effect of lactoferricin was lethal, causing a rapid loss of colony-forming ability with all four strains tested.

Listeria monocytogenes is a bacterial pathogen which has emerged as an important problem in the food industry (*1,2,7,10*). This organism is the causative agent of listeriosis, a disease which often manifests itself as meningitis or septicaemia (*2*). *L. monocytogenes* is widespread in nature and can be isolated from a variety of foods and food ingredients (*1,7,11*). It can survive and grow at low temperatures (*8,9*), suggesting that refrigerated storage is probably insufficient to prevent its growth in dairy products and other perishable foods. Accordingly, it seems important to identify novel means of controlling the growth and survival of this foodborne pathogen.

We have recently discovered a potent new antimicrobial peptide, named "lactoferricin", generated by gastric pepsin cleavage of bovine lactoferrin (Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita, accepted for publication in Biochimica et Biophysica Acta, 1992), an iron-binding glycoprotein present in cow's milk (*3,6*). Lactoferricin is a low molecular weight peptide consisting of a single peptide chain of 25 amino acid residues having the sequence Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe. It has a quasicyclic structure owing to the presence of a disulfide bond between its two cysteine residues. Interestingly, this potently active peptide contains no unusual amino acids or foreign chemical groups. In our opinion, considerable potential exists for the widespread commercial use of lactoferricin as a safe and effective natural preservative, and we have developed a manufacturing process for large-scale production of this new antimicrobial agent, using bovine lactoferrin extracted from skim milk or cheese whey as the starting material.

Whether lactoferricin might be effective to control the growth and survival of *L. monocytogenes* in various commercial applications is unknown. As an initial step, the present study was undertaken to investigate the susceptibility of several strains of *L. monocytogenes*, including clinical isolates, to inhibition and inactivation by lactoferricin in laboratory media.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of lactoferricin

Bovine lactoferrin purified from fresh skimmed milk by the method of Law and Reiter (*6*) was dissolved in distilled water at a concentration of 5% (w/v) and the pH was adjusted to 3.0 by addition of 1 N HCl. Pepsin (10 units/mg; #B151, Difco Laboratories, Detroit, MI) was added to a final concentration of 3% (w/w of substrate) and hydrolysis was performed at 37°C for 4 h. The reaction was terminated by heating at 80°C for 15 min and the pH was adjusted to 7.0 by addition of 1 N NaOH. The precipitate formed (less than 10% of total protein) was removed by centrifugation at 15,000 x *g* for 30 min and the supernatant was retained and freeze-dried.

Lactoferricin was purified by reverse-phase high performance liquid chromatography in two steps. After each step fractions were collected, dried under vacuum in a centrifugal evaporator and assayed for antibacterial activity. Initially, pepsin-hydrolyzed lactoferrin was fractionated on a column of TSK-GEL 120T (6.0 x 150 mm; Tosoh, Japan) eluted with a mixture 80:20 of eluants A (0.05% trifluoroacetic acid) and B (90% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid) for 10 min followed by a linear gradient of A:B from 80:20 to 40:60 for 30 min at a flow rate of 0.8 ml/min. The active peptides were further purified on a column of COSMOSIL 5CN-R (4.6 x 150 mm; Nacalai Tesque) eluted with eluant A for 5 min, followed by a linear gradient of eluants A:B from 100:0 to 55:45 for 40 min at a flow rate of 0.8 ml/min.

For assay of purity, the lactoferricin obtained was applied to a column of TSK-GEL 120T eluted as described above. The absorbance at 280 nm of the eluate was recorded and the relative

concentrations of sample components were estimated from the areas of eluted peptide peaks. Homogeneity of the lactoferricin obtained was further confirmed by automated Edman degradation using an Applied Biosystems Model 470A gas-phase protein sequencer.

The purity of the lactoferricin used in the present study was at least 99%.

Cultures

Four strains of *L. monocytogenes* were used: IDF-lb, serotype lb (IDF denotes International Dairy Federation, Toyko, Japan); JCM-7672, serotype 2; JCM-7673, serotype 3; JCM-7674; serotype 4a (JCM denotes Japan Collection of Microorganisms at RIKEN, Wako City, Japan). The latter three organisms are human clinical isolates.

Assays of antibacterial activity

L. monocytogenes strains were cultured in a basal medium of 1% bacto-peptone (Difco Laboratories), pH 6.8, or PYG medium (1% bacto-peptone, 1% glucose, 0.05% yeast extract), pH 6.8, at 37°C. In some experiments, the culture medium was supplemented with various carbohydrates, proteins, or salts as indicated. The extent of bacterial growth was determined by monitoring the optical density of cultures at 600 nm. Stock solutions of lactoferricin were prepared in distilled water and filter-sterilized before addition to sterile culture media. For assay of antibacterial activity, a standard inoculum of logarithmic-phase cells (10^6 CFU/ml) was cultured for 16 to 20 h in a series of tubes containing 2.0 ml of medium supplemented with various concentrations of lactoferricin (0 to 60 μg/ml). The minimal inhibitory concentration was taken as the lowest concentration of lactoferricin that caused complete inhibition of growth. For assay of bactericidal activity, each strain was incubated in basal medium with or without lactoferricin at 37°C in a shaker-incubator water bath. After the indicated time, serial 10-fold dilutions were prepared in basal medium and plated onto plate count agar (Eiken Chemical Co., Japan) for determination of colony-forming units. Each experiment was performed at least twice.

RESULTS AND DISCUSSION

The minimal concentrations of lactoferricin required to cause complete inhibition of *L. monocytogenes* were determined using a number of different culture conditions. The effective concentration of the peptide in 1% peptone or PYG medium varied within the range of 0.3 and 3 μg/ml depending on the target strain and culture medium used (Table 1). Various carbohydrates, proteins, or salts were added to the basal medium of 1% peptone to determine their influence on the antimicrobial effectiveness of lactoferricin against one of the most resistant strains, *L. monocytogenes* IDF-lb. Addition of glucose, galactose, fructose, mannose, xylose, maltose, sucrose, lactose, or starch at concentrations up to 10 mg/ml had no effect on the activity of the lactoferrin peptide against the test strain. In the presence of these added carbohydrates, a minimal inhibitory concentration of 0.6 μg/ml was observed in each instance. In the presence of added gelatin or bovine serum albumin at a final concentration of 10 mg/ml, the minimal inhibitory concentrations of lactoferricin were 3 μg/ml and 1 μg/ml, respectively, indicating that these proteins have little effect on its activity. On the other hand, the effectiveness of lactoferricin was more diminished in the presence of NaCl, KCl, or NH_4Cl at concentrations up to 100 mM, or in the presence of $MgCl_2$ or $CaCl_2$ at concentrations up to 5 mM (Table 2). To examine the effect of pH on the activity of lactoferricin against *L. monocytogenes*, strain IDF-lb was cultured in basal medium adjusted to various pH values. In the presence of 50 mM KH_2PO_4-K_2HPO_4 buffer at final pH values of 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, and 7.5 the minimal inhibitory concentrations of lactoferricin against the test strain were 6, 8, 8, 6, and 6 μg/ml, respectively. At the same pH values, in the absence of added buffer salts, a minimal inhibitory concentration of 0.6 μg/ml was observed in each instance indicating that potassium phosphate has some ability to reduce the effectiveness of lactoferricin. Nonetheless, these observations demonstrate that lactoferricin exhibits potent activity over the pH range of 5.5 to 7.5, even in the presence of 50 mM potassium phosphate. At pH values below 5.5 and above 7.5, inhibition of the test strain occurred in the absence of lactoferricin; therefore, the effectiveness of the peptide could not be determined beyond this pH range.

TABLE 1. *Sensitivity of* L. monocytogenes *strains to inhibition by lactoferricin.*

Strain	MIC[a] (μg/ml)	
	1% peptone	PYG medium
L. monocytogenes IDF-lb	0.6	3
L. monocytogenes JCM-7672	NG[b]	2
L. monocytogenes JCM-7673	0.3	1
L. monocytogenes JCM-7674	0.6	3

[a] MIC denotes minimal inhibitory concentration.
[b] NG denotes no growth in this medium.

TABLE 2. *Influence of various salts on the inhibitory activity of lactoferricin against* L. monocytogenes *IDF-1b.*

Salt	MIC[a] (μg/ml)				
	2.5 mM	5.0 mM	25 mM	75 mM	100 mM
NaCl	0.6	1	3	6	6
KCl	0.6	1	3	6	9
NH_4Cl	0.6	1	3	6	9
$MgCl_2$	3	3	NG	NG	NG
$CaCl_2$	3	6	NG	NG	NG

[a] MIC denotes minimal inhibitory concentration.
[b] NG denotes no growth (or poor growth) in this medium.

To examine the ability of lactoferricin to inactivate *L. monocytogenes*, each of the four test strains was suspended in 1% peptone with or without added lactoferricin, and the concentration of viable cells was assayed before and after 60 min of incubation at 37°C. As shown in Table 3, the effect of lactoferricin against *L. monocytogenes* was potently bactericidal, causing a profound loss of colony-forming ability in all four of the strains tested. The kinetics of the bactericidal effect was further examined using strain

IDF-lb. As shown in Fig. 1, the rate of killing by lactoferricin was rapid and dose-dependent.

TABLE 3. *Survival of* L. monocytogenes *after 60 min exposure to lactoferricin at 31 μg/ml (10 μM).*

Strain	Survival[a] (CFU/ml)	
	Control	Lactoferricin
L. monocytogenes IDF-lb	2.5×10^6	< 100
L. monocytogenes JCM-7672	2.0×10^5	< 100
L. monocytogenes JCM-7673	1.3×10^6	300
L. monocytogenes JCM-7674	5.2×10^4	< 100

[a] Control had no added lactoferricin. The limit of detection was 100 CFU/ml.

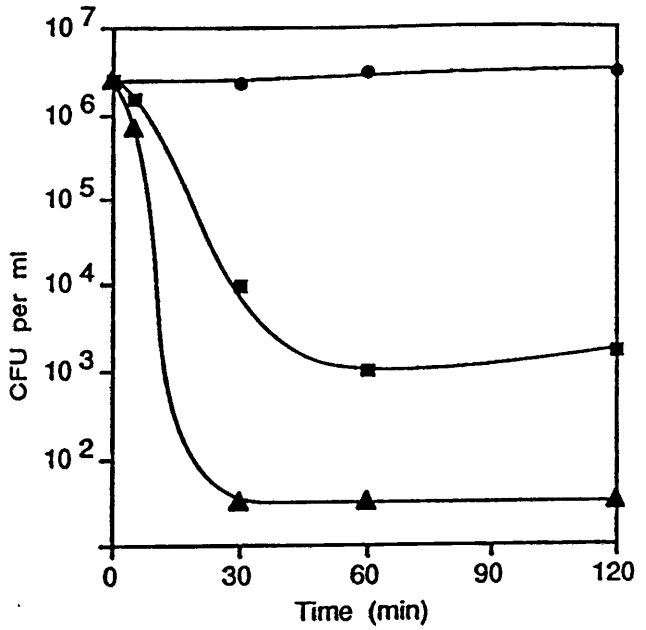


Figure 1. *Kinetics of killing of* L. monocytogenes *IDF-1b by lactoferricin in 1% peptone at 37°C. Lactoferricin was added at final concentrations of 6 μg/ml (■) or 31 μg/ml (▲). Control (●) had no added peptide.*

Our results demonstrate that *L. monocytogenes* is highly susceptible to inhibition and inactivation by lactoferricin. Under the various conditions employed in this study lactoferricin exhibited an effectiveness similar to that of many clinically useful antibiotics (*5*) causing complete inhibition of *L. monocytogenes* at concentrations of less than 10 μg/ml. Moreover, lactoferricin caused a rapid and irreversible loss of cell viability of all four *L. monocytogenes* strains tested. These observations suggest this newly discovered antimicrobial agent might be useful in a variety of commercial applications to control the growth and survival of this foodborne pathogen.

Our data provide some information about the efficacy of lactoferricin against *L. monocytogenes* under various laboratory conditions; however, they do not enable any prediction of the concentrations required for food preservation. Many environmental conditions such as pH, temperature, water activity, microbial load, and the presence of certain food components may influence the effectiveness of lactoferricin.

The mechanism of action of lactoferricin against *L. monocytogenes* is unknown. Notably, 8 of the 25 amino acid residues in this peptide are basic residues and this feature probably has an important role in determining its potent bactericidal properties. Certain other antimicrobial peptides having a high proportion of basic residues are known to act at the surface of bacterial cells causing an increase in cell membrane permeability (*4*). It is presumed that lactoferricin acts by a similar mechanism. If so, the susceptibility of *L. monocytogenes* to various other antimicrobial agents and physical treatments may be enhanced in the presence of lactoferricin. We intend to further investigate this possibility.

REFERENCES

1. Fleming, D. W., S. L. Cochi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Plikaytis, M. B. Holmes, A. Audurier, C. V. Broome, and A. L. Remgold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 312:404-407.
2. Gellin, B. G., and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. J. Am. Med. Assoc. 261:1313-1320.
3. Groves, M. L. 1965. Preparation of some iron-binding proteins and α-lactalbumin from bovine milk. Biochim. Biophys. Acta 100:154-162.
4. Hill, C. P., J. Yee, M. E. Selsted, and D. Eisenberg. 1990. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. Science 251:1481-1484.
5. Larsson, S., M. H. Walder, S. N. Cronberg, A. B. Forsgren, and T. Moestrup. 1985. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 1958 to 1982 in Sweden. Antimicrob. Agents Chemother. 28:12-14.
6. Law, B. A., and B. Reiter. 1977. The isolation and bacteristatic properties of lactoferrin from bovine milk whey. J. Dairy Res. 44:595-599.
7. Mclaughlin, J. 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J. Appl. Bacteriol. 63:1-11.
8. Rosenow, E. M., and E. H. Marth. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole, and chocolate milk and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C. J. Food Prot. 50:452-459.
9. Ryser, E. T., and E. H. Marth. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated storage. J. Food Prot. 51:615-621.
10. Schlech, W. F., P. M. Lavigne, R. A Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308:203-206.
11. Weis, J., and H. P. R. Seeliger. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30:29-32.

Antifungal Spectrum and Fungicidal Mechanism of an N-Terminal Peptide of Bovine Lactoferrin

Hiroyuki Wakabayashi,[1] Tamio Hiratani,[2] Katsuhisa Uchida,[2] and Hideyo Yamaguchi[2]*

[1]*Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd., Kanagawa, Japan,*
[2]*Research Center for Medical Mycology, Teikyo University, Tokyo, Japan*

J Infect Chemother 1996;1:185–189

Antifungal Spectrum and Fungicidal Mechanism of an N-Terminal Peptide of Bovine Lactoferrin

Hiroyuki Wakabayashi,[1*] Tamio Hiratani,[2] Katsuhisa Uchida,[2] and Hideyo Yamaguchi[2]

[1]Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd., Kanagawa, Japan,
[2]Research Center for Medical Mycology, Teikyo University, Tokyo, Japan

The antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin (lactoferricin® B), an antimicrobial peptide produced by gastric pepsin digestion of bovine lactoferrin, were investigated. The susceptibility of pathogenic yeasts and dermatophytes to the peptide varied in a species-dependent and strain-dependent manner. Dematiaceous fungi and dimorphic fungi were susceptible to the peptide (range of MIC values: 0.63 to 10 μg/ mL). In the case of nonpigmented hyphomycetes and zygomycetes, most strains exhibited resistance to the peptide (MIC: > 80 μg/ mL). This peptide killed *Candida albicans* dose dependently without inducing a change in cell wall stability against osmotic stress. The peptide at 10 μg/ml immediately induced the release of K^+ from *C. albicans* cells and pH increases in cell suspensions. These pharmacological activities were more potent than those for miconazole nitrate, a well-known antifungal agent that interferes with membrane synthesis and function. These in vitro findings suggest that the lactoferrin oligopeptide has potent membrane disrupting activity against this yeast and suggests that in vivo LF-B studies would be useful to further understand host defenses and to develop improved therapeutic agents against yeast infections.

J Infect Chemother 1996;1:185–189

Key words: lactoferrin, lactoferricin®, *Candida albicans*, membrane disruption

INTRODUCTION

Lactoferrin, an iron-binding glycoprotein present at relatively high concentrations in many exocrine secretions, has broad-spectrum antimicrobial properties and is considered to be an important component of the non-immunological defense system which is active at mucosal surfaces, and in colostrum and milk.[1-3] The antimicrobial effect of lactoferrin against fungi has been demonstrated by several investigators.[4,5]

It was recently discovered that antimicrobial peptides much more effective than lactoferrin are generated upon digestion of this protein with gastric pepsin.[6] The active peptides of human lactoferrin (lactoferricin® H) and bovine lactoferrin (lactoferricin® B) were isolated and sequenced and found to be derived from the N-terminal region of the molecule.[7] Lactoferricin® B (hereinafter referred to as LF-B) consists of 25 amino acid residues having the sequence Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala -Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe. LF-B has been shown to have antimicrobial activities against a physiologically diverse range of bacterial species[8,9] and some fungal species.[10,11] It was also shown that [^{14}C]-labeled LF-B binds to *C. albicans*[10] and that LF-B inhibits uptake of [^{3}H]-glucose by *Trichophyton rubrum*.[11]

Received Sept. 4, 1995; accepted for publication in revised form Nov. 7, 1995. *Correspondence and requests for reprints to: Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd., 5-1-83, Higashihara, Zama-shi, Kanagawa 228, Japan.

In the present study we have investigated the susceptibility, in vitro, of a wide range of pathogenic fungal strains to LF-B. To further elucidate the antifungal mechanism of this peptide, we have also examined the action of LF-B on the cell wall and membrane of *C. albicans*.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of LF-B and miconazole nitrate

LF-B was prepared by procedures described previously[7] and its purity was at least 95%. Miconazole nitrate was purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) .

Fungal strains and preparation of stock cultures

Seventy-five strains of pathogenic fungi stocked in the Research Center for Medical Mycology, Teikyo University, Tokyo, Japan, were tested. Stock cultures of pathogenic yeasts and filamentous fungi were prepared by the methods used in our laboratory.[12]

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The agar dilution method was employed using modified Sabouraud dextrose agar (Bactopeptone 1.0%, glucose 2.0%, isogel agarose [FMC BioProducts, Rockland, ME, USA] 0.75%, pH 5.0) as the test medium. Stock solutions of LF-B were prepared in distilled water, filter sterilized, and diluted in the test medium at 60 °C over a final concentration range of 0.31 to 80 μg/mL. Cell suspensions of pathogenic yeasts were prepared by suspending in sterile saline cells harvested from the stock

1341-321X/96/0103-0185/US$3.00 © JSC/CLJ 1996

cultures. Cell numbers were determined using a hemocytometer and inocula were adjusted to contain 10^6 cells / mL. Spore suspensions of filamentous fungi were prepared by suspending spores harvested from stock cultures in sterile saline containing 0.05% (w/v) Tween 80. Suspensions of spores used as inocula were adjusted to have a final optical density of 0.02 at 530 nm. Each test agar plate was inoculated with 5 μL of cell or spore suspension and incubated at 27°C. Pathogenic yeasts, zygomycetes, and nonpigmented fungi were incubated for 4 days, and other filamentous fungi were incubated for 7 days. Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the drug at which there was no visible growth.

Testing of osmotic stability

C. albicans TIMM0144 was incubated at 37°C in peptone yeast glucose (PYG) broth (Bactopeptone 2.0%, yeast extract 1.0%, glucose 2.0%, a modification of the reference material[13]) in a shaking water bath for 18 hours. Cell numbers were determined using a hemocytometer after washing the cells with sterile saline. *C. albicans* cells at a density of 10^5 cells/mL were exposed to LF-B at concentrations of 10 to 80 μg/mL in Sabouraud dextrose broth (Bactopeptone 1.0%, glucose 2.0%) containing 0.8 M sorbitol as the osmotic stabilizer.[13] Untreated control cultures were also examined. Both treated and untreated cell suspensions were incubated for 6 hours in a shaking water bath at 37°C prior to sampling. For preparation of osmotically shocked cultures, samples were removed, diluted in sterile saline, and plated onto PYG agar (Bactopeptone 2.0%, yeast extract 1.0%, glucose 2.0%, agar 2.0%). For preparation of osmotically stabilized cultures, samples were removed, diluted in sterile saline with stabilizer, and plated onto PYG agar with the stabilizer.

Continuous pH measurement in cell suspensions and determination of released K^+ content

C. albicans TIMM0144 cells prepared as described above were diluted in sterile water to a final cell density of 10^8 cells/mL and stirred at 37°C.[14] LF-B solutions were added to the cell suspensions to obtain a final concentration of 0.63, 2.5, or 10 μg/mL Miconazole nitrate was dissolved in dimethyl sulfoxide and added to the cell suspensions at a volume of 2 %. Dimethyl sulfoxide alone had no effects. The final concentration of miconazole nitrate was 2.5, 10, or 40 μg/mL. The pH of the cell suspensions was measured and recorded continuously. For the determination of released K^+, cell suspensions were removed at defined intervals and immediately filtered using a 0.45 μm cellulose acetate filter (Advantec, Tokyo, Japan). The K^+ content of the filtrates was measured using an inductively coupled plasma spectrometer (Leeman labs, Lowell, MA, USA). Total intracellular K^+ was extracted by treatment of cell suspensions with 5% trichloroacetic acid at 5°C for 30 min. The amount of K^+ released by the added agent was calculated as the fraction (in %) of total intracellular K^+.

Table 1. *In vitro antifungal activities of LF-B against pathogenic fungi.*

Fungal species	Number of tested strains	MIC range (μg/mL)	Arithmetic mean MIC* (μg/mL)
I. Pathogenic yeasts			
Candida albicans	6	10 to 40	21.67
C. tropicalis	2	0.31, 1.25	0.78
C. parapsilosis	2	20, 80	50.00
C. glabrata	2	80, > 80	120.00
C. guilliermondii	2	5, 40	22.50
C. kefyr	2	2.5, 10	6.25
C. krusei	2	10, 20	15.00
Saccharomyces cerevisiae	1	0.63	0.63
Cryptococcus neoformans	2	0.63	0.63
Trichosporon cutaneum	2	1.25, 2.5	1.88
II. Nonpigmented hyphomycetes			
Aspergillus fumigatus	4	> 80	160.00
A. niger	2	> 80	160.00
A. flavus	2	> 80	160.00
A. versicolor	1	10	10.00
A. clavatus	1	> 80	160.00
Penicillium notatum	1	> 80	160.00
P. expansum	1	> 80	160.00
Fusarium moniliforme	2	2.5, 5	3.75
III. Zygomycetes			
Absidia corymbifera	2	40, > 80	100.00
Mucor circinelloides	1	> 80	160.00
M. racemosus	1	> 80	160.00
Rhizopus oryzae	2	> 80	160.00
IV. Dermatophytes			
Trichophyton mentagrophytes	5	10 to > 80	62.00
T. rubrum	3	> 80	160.00
T. tonsurans	2	5, 40	22.50
T. shoenleinii	1	> 80	160.00
T. violaceum	2	40, > 80	100.00
Microsporum canis	1	40	40.00
M. gypseum	2	20, 40	30.00
Epidermophyton floccosum	3	0.31 to 2.5	1.15
V. Dematiaceous fungi			
Fonsecaea pedrosoi	2	5	5.00
Exophiala dermatitidis	2	2.5	2.50
Phialophora verrucosa	2	5, 10	7.50
Cladosporium trichoides	2	5	5.00
VI. Dimorphic fungi			
Paracoccidioides brasiliensis	2	0.63, 1.25	0.94
Sporothrix schenckii	3	2.5 to 10	5.83

** Arithmetic mean; > 80 μg/mL was calculated as 160 μg/mL.*

RESULTS

Antifungal spectrum

Effective concentrations of LF-B against a variety of pathogenic yeasts and filamentous fungi were determined (Table 1). A wide range of MIC values was observed for pathogenic yeasts and dermatophytes and susceptibility to inhibition varied depending on the individual species and strains. *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, and *Epidermophyton floccosum* exhibited relatively low MIC values (0.31 to 2.5 μg/mL). Most strains of nonpigmented hyphomycetes and zygomycetes were resistant to LF-B (MIC: > 80 g/mL). Dematiaceous fungi and dimorphic fungi were susceptible to more intermediate concentrations of this peptide (MIC: 0.63 to 10 μg/mL).

Osmotic stability of cells

The mode of killing of *C. albicans* by LF-B was investigated using osmotically stabilized or osmotically shocked cells (Fig. 1). Viable counts of control cultures increased about 10-fold during the six hours of incubation. In contrast, cell counts in cultures treated with LF-B decreased in a manner dependent on the concentration of the peptide. The LF-B dose response curves for decreasing cell numbers in osmotically stabilized and osmotically shocked cultures were almost the same. These results suggest that LF-B does not induce osmotically fragile cells.

Changes in pH of cell suspensions

pH changes induced by LF-B in *C. albicans* cell suspensions were measured (Fig. 2). The pH of cell suspensions was approximately 5.3 before the addition of the drug. Soon after the addition of LF-B, the pH increased in a concentration dependent manner. The pH rose to about 6.0 within 5 minutes after the addition of 10 μg/mL (3.2 μM) of LF-B. A similar effect was seen after the addition of 40 μg/ mL (83.5μM) of miconazole nitrate.

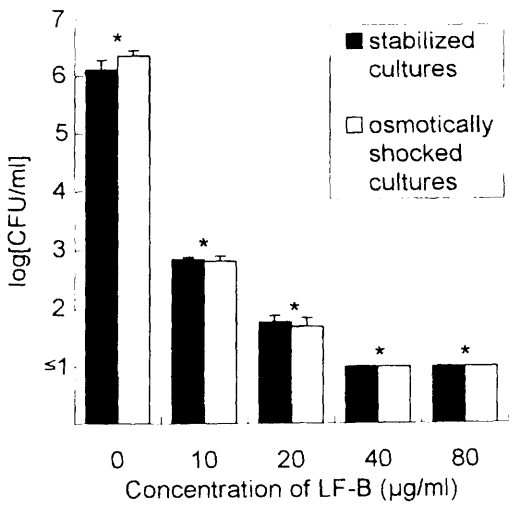


Fig. 1: Comparison of counts of viable cells indicated by log[CFU/mL] in stabilized or osmotically shocked cultures of Candida albicans in the presence of LF-B. Data are means of three samples + SD. The asterisks above the bars indicate no significance (P > 0.05, Student's t-test) of the CFU differences between stabilized and osmotically shocked cultures.

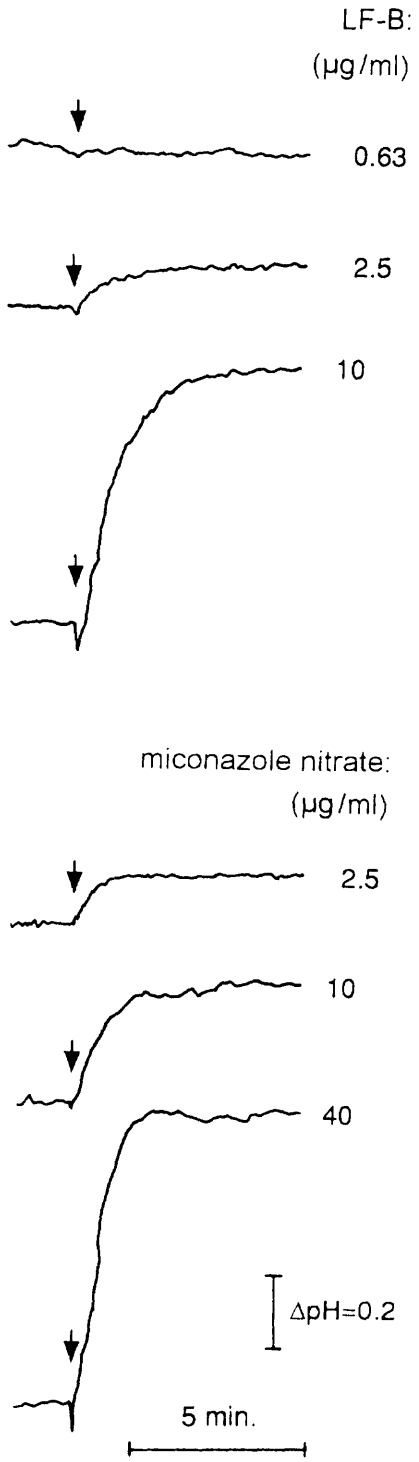


Fig. 2: pH change induced by LF-B and miconazole nitrate in C. albicans cell suspension. The drug was added at the point indicated by the arrow. An upward deflection of the curve indicates an increase in pH.

Release of K^+ from the cells

LF-B at 10 μg/mL caused the release of almost the total intracellular K^+ content within 2.5 minutes. (Fig. 3). The amount of released K^+ was dependent on the concentration of LF-B added. Nearly the same effect as obtained with 10 μg/mL of LF-B was observed after treatment of cells with miconazole nitrate at a concentration of 40 μg/mL. As was the case for LF-B, K^+ release depended on the miconazole concentration.

DISCUSSION

We have investigated the antifungal spectrum of LF-B against a broad range of pathogenic fungal strains and examined its fungicidal mechanism of action. Previous reports demonstrating the antifungal activity of LF-B against *C. albicans*[10] and some other strains of fungi[11] used a broth dilution method for determination of MIC. In this study, we employed an agar dilution method for determination of MIC. The MIC values observed for *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *T. rubrum* were nearly in agreement with previously reported values obtained using PYG medium (Bactopeptone 1.0%, yeast extract 0.05%, glucose 1.0%). However, MIC values for *Trichosporon cutaneum* strains were lower than those of the previous report. These discrepancies may be due to differences between tested strains.

In tests of *C. albicans*, the loss of cell viability induced by LF-B was not inhibited in the presence of an osmotic stabilizer. It seems likely, therefore, that the killing effect of LF-B is not due to the induction of osmotically fragile cells through damage to cell wall structure or inhibition of cell wall synthesis.

LF-B induced the release of K^+ from *C. albicans* cells and caused an increase in the pH of cell suspensions. This increase in pH may result from a flow of extracellular H^+ into the cells coupled to the release of K^+ from the cells. Similar effects have been reported for imidazoles such as miconazole,[15] which show not only interference with ergosterol synthesis of fungi but also cell membrane disruption at higher doses. Accordingly, LF-B was compared with miconazole nitrate in our studies. LF-B exhibited activity corresponding to that of about a 4 times (about 26 times on a molar basis, because LF-B has a 6.5 times higher molecular weight of miconazole nitrate) higher concentration of miconazole nitrate. These findings suggest that LF-B has a potent disruptive effect on cell membranes of *C. albicans*.

Extracellular to intracellular flow of H^+ may lead inhibition of the cell's proton-motive-force (PMF) and consequent inhibition of critical PMF-dependent processes such as glucose transport, as shown in a previous report for *T. rubrum*.[11] Binding of LF-B to fungal cells[10] may thus be an initial step leading to disruption of cell membrane functions. These reports also indicate that

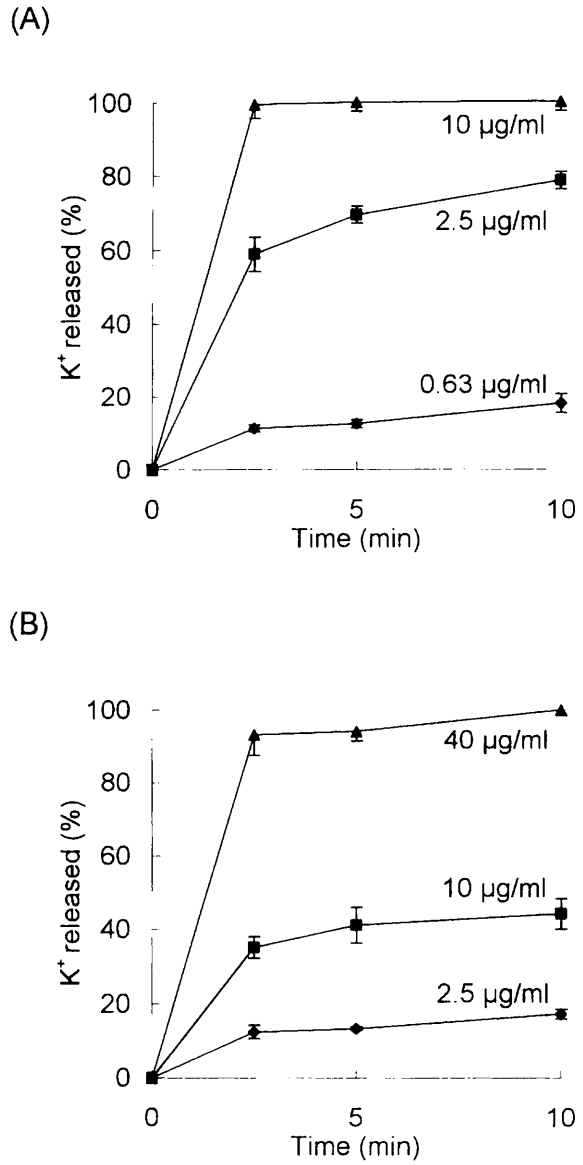


Fig. 3: *K^+ release from cells of C. albicans induced by LF-B (A) and miconazole nitrate (B). Final concentrations of each agent are shown. Experimental conditions are given in Methods. Data are means of three samples ± SD.*

LF-B causes a substantial change in ultrastructural features of fungi, including a dense aggregation of cytoplasmic materials, which looks like autolysis.[10,11] Intracellular flow of H^+ generates acidic conditions in the cytoplasm. This may activate proteases and nucleases and cause autolysis as seen in previous ultrastructural studies.[10,11] Usually autolysis of fungal cells do not result in cell wall lysis. It is in agreement with our findings that osmotic fragility of cell walls is not induced by LF-B.

In this study we have investigated the antifungal activities of LF-B against a wide range of pathogenic fungi and shown that dematiaceous fungi, dimorphic fungi, and some strains of pathogenic yeasts and dermatophytes are susceptible to this peptide. In our next study we would like to evaluate the effectiveness of the peptide for pre-

vention of fungal infections *in vivo*. We have further elucidated data that suggest a fungicidal mechanism of the LF-B peptide against *C. albicans*, a mechanism that appears to involve disruption of the cell membrane. It has been already determined that RRWQWR-NH_2, a 6-mer amide peptide in the sequence of LF-B, has antibacterial activity.[16] It should therefore be possible to design new membrane-disruptive antimicrobial agents based on the structure and activities of LF-B.

REFERENCES

1. Brock JH. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in newborn infants. Arch Dis Child 1980;55:417–421.
2. Reiter B. The biological significance of lactoferrin. Int J Tissue React 1983;5:87–96.
3. Sánchez L, Miguel C, Brock JH. Biological role of lactoferrin. Arch Dis Child 1992;67:657–661.
4. Soukka T, Tenovuo J, Lenander-Lumikari M. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 1992;69:223–228.
5. Palma C, Cassone A, Serbousek D, Pearson CA, Djeu JY. Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. Infect Immun 1992;60:4604–4611.
6. Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. J Dairy Sci 1991;74:4137–4142.
7. Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim Biophys Acta 1992;121:130–136.
8. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J Appl Bacteriol 1992;73:472–479.
9. Jones EM, Smart A, Bloomberg G, Burgess L, Millar MR. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. J Appl Bacteriol 1994;77:208–214.
10. Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Med Microbiol Immunol 1993;182:97–105.
11. Bellamy W, Yamauchi K, Wakabayashi H, Takase M, Takakura N, Shimamura S, Tomita M. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Lett Appl Microbiol 1994;18:230–233.
12. Itoyama T, Aoki Y, Hiratani T, Uchida K, Yamaguchi H. In vitro antifungal activity of omoconazole nitrate, a new imidazole antimycotic. J Antibiot (Tokyo) 1993;46:773–780.
13. Yamaguchi H, Hiratani T, Iwata K, Yamamoto Y. Studies of the mechanism of antifungal action of aculeacin A. J Antibiot (Tokyo) 1982;35:210–219.
14. Hiratani T, Yamaguchi H. Studies on the mode of antifungal action of bifonazole. Chemotherapy (Tokyo) 1984;32:829–841.
15. Cope JE. Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: effects on growth, viability and K^+ release. J Gen Microbiol 1980;19:245–251.
16. Tomita M, Takase M, Bellamy W, Shimamura S. A review: The active peptide of lactoferrin. Acta Paediatr Jpn 1994;36:585–591.

Microbiol. Immunol., 40(11), 821-825, 1996

Cooperative Anti-*Candida* Effects of Lactoferrin or Its Peptides in Combination with Azole Antifungal Agents

Hiroyuki Wakabayashi*[,1], Shigeru Abe[2], Takafumi Okutomi[2], Shigeru Tansho[2], Kouzou Kawase[1], and Hideyo Yamaguchi[2]

[1]*Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama, Kanagawa 228, Japan and* [2]*Department of Microbiology and Immunology, Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan*

Received May 22, 1996. Accepted July 29, 1996

Abstract: **The effects of lactoferrin (LF), an antimicrobial protein secreted in body fluids, and its peptides in combination with azole antifungal agents were investigated by the micro-broth-dilution method in a study of *Candida albicans*. In the case of LF, its pepsin hydrolysate (LFhyd) or the LF-derived antimicrobial peptide Lactoferricin® B (LF-B), the concentrations required to inhibit the growth of *Candida* decreased in the presence of relatively low concentrations of clotrimazole (CTZ). The minimum inhibitory concentration (MIC) of all azole antifungal agents tested was reduced by 1/4-1/16 in the presence of a sub-MIC level of each of these LF-related substances. Polyene and fluoropyrimidine antifungal agents did not show such a combined effect with these LF-related substances. The anti-*Candida* activity of LF or LF-B in combination with CTZ was shown to be synergistic by checkerboard analysis. These results indicate that LF-related substances function cooperatively with azole antifungal agents against *C. albicans*.**

Key words: **Lactoferrin, Lactoferricin®, Azole antifungal agents, *Candida albicans***

Azole antifungal agents are widely used in the chemotherapy of mycoses where they act in a fungistatic fashion, however, there is recently a trend of caution due to the rising incidence of failures in the treatment of mycoses in the case of severely immunosuppressed patients on azole therapy. Lately, the isolation of azole-resistant *Candida* species has been reported (11, 15) and azole antifungal chemotherapy may become insufficient in the near future. This clinical situation points to the need for the development of new therapeutic agents which augment the antifungal activity of azoles.

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein found in many exocrine secretions of mammals and in the secondary granules of neutrophils. LF is known to display antimicrobial activity against fungi such as *Candida* as well as bacteria (5, 12), and is considered to play an important role in the host defense against infections on mucosal surfaces. It has been recently reported that Lactoferricin®, an antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of the LF molecule (2), exhibits potent disruptive effects on cell membrane and has fungicidal activity against *Candida albicans* (16).

It seems likely that some antifungal agents may act cooperatively with host defense factors to inhibit fungal growth in the body, and we have attempted to ascertain whether such natural factors contribute to the therapeutic efficacy of antifungal agents. Here, we have studied the inhibitory effects of LF and its peptides in combination with several antifungal agents by testing their cooperative activity against *C. albicans in vitro*.

Materials and Methods

LF-related substances. Bovine LF was produced by Morinaga Milk Industry Co. (Tokyo). Pepsin hydrolyzate of bovine LF (LFhyd) and the antimicrobial peptide "Lactoferricin® B" (LF-B), which is derived from bovine LF, were produced by methods previously reported (2). The fraction of LFhyd without LF-B (LF (−)) was obtained by repeated removal of LF-B from LFhyd by

**Address correspondence to* Hiroyuki Wakabayashi, Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., 5-1-83 Higashihara, Zama, Kanagawa 228, Japan.

Abbreviations: AMPH, amphotericin B; *C. albicans*, *Candida albicans*; CTZ, clotrimazole; DMSO, dimethylsulfoxide; 5-FC, flucytosine; FIC index, fractional inhibitory concentration index; FLCZ, fluconazole; IC80, 80% growth inhibitory concentration; ITCZ, itraconazole; KCZ, ketoconazole; LF, lactoferrin; LF-B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin, Lactoferricin® B; LFhyd, pepsin hydrolyzate of bovine lactoferrin; LF (−), a fraction of LFhyd without LF-B; MIC, minimum inhibitory concentration; NYS, nystatin; SDB, Sabouraud dextrose broth.

the above method (2). All LF-related substances were dissolved in sterile distilled water.

Antifungal agents. Amphotericin B (AMPH) and clotrimazole (CTZ) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.). Nystatin (NYS) and flucytosine (5-FC) were purchased from Nacalai Tesque Co. (Kyoto, Japan). Ketoconazole (KCZ), itraconazole (ITCZ) and fluconazole (FLCZ) were prepared from Nizoral® Cream (Kyowa Hakko Co., Tokyo), Itrizole® Capsules 50 (Kyowa Hakko) and Diflucan® Capsules (Pfizer Pharmaceutical Japan, Tokyo), respectively. 5-FC, ITCZ and FLCZ were dissolved in sterile distilled water, dimethylsulfoxide (DMSO) containing 0.1 N HCl and phosphate buffered saline, respectively. Other antifungal agents were dissolved in DMSO.

C. albicans *strain. C. albicans* TIMM1768, a clinically isolated serotype A strain obtained from the Research Center for Medical Mycology, Teikyo University (Tokyo), was used.

*Assay of anti-*Candida *activity.* The anti-*Candida* activities of antifungal agents and LF-related substances were assayed by the micro-broth-dilution method (14). Yeast-form cells of *C. albicans* were collected from stock cultures on Sabouraud dextrose agar (1% Bactopeptone [Difco Laboratories Co., Detroit, Mich., U.S.A.], 2% glucose, 1.5% agar) slants, washed in saline and suspended in Sabouraud dextrose broth (SDB; 1% Bactopeptone, 2% glucose, pH 6.5) at 10^5 cells/ml. 20 μl of *Candida* suspension, 10 μl of stock solution of LF-related substances, 2 μl of stock solution of the antifungal agent and 168 μl of SDB were mixed and incubated at 37 C for 17 hr. We used SDB as a medium since *C. albicans* TIMM1768 grew almost completely in yeast form in this medium but partially in mycelial form in other medium such as RPMI1640. The addition of LF-related substances at tested concentrations caused slight decreases in the pH (Δ0.1–0.2) of the SDB medium. The medium containing solvents (1%) used for the dissolution of antifungal agents were confirmed not to affect the growth of *Candida*. The absorbance at 630 nm of triplicate samples was measured spectrophotometrically at the start and end of incubation, and the difference in absorbance was taken to indicate the extent of *Candida*. The percent growth inhibition of *C. albicans* was calculated as follows: [1 − absorbance (*C. albicans* with drug) / absorbance (*C. albicans* alone)] × 100 (%). The 80% growth inhibitory concentration (IC80) was taken to represent the minimum inhibitory concentration (MIC).

Checkerboard analysis. For the assessment of antimicrobial combinations, the checkerboard method was employed and results were evaluated according to standard criteria (4). Concentrations of each of the drug combinations showing IC80 against *C. albicans* as determined in triplicate tests were plotted on arithmetic scales. The fractional inhibitory concentration index (FIC index) was calculated as follows: (lowest inhibitory concentration of drug A in combination/MIC of drug A alone + lowest inhibitory concentration of drug B in combination/MIC of drug B alone). FIC index values of ≤ 0.5, 1.0 and >4.0 represent synergism, additivity and antagonism, respectively.

Results

*Anti-*Candida *Activities of LF-Related Substances Combined with CTZ*

The growth inhibitory activities of LF, LFhyd, LF-B and LF (−) combined with CTZ against *C. albicans* TIMM1768 were tested (Fig. 1a–d). CTZ by itself caused marginal inhibition of *Candida* at 12.5 ng/ml and 80% growth inhibition at 50 ng/ml. LF alone at 200 μg/ml completely inhibited the growth of *Candida*. In the presence of CTZ at 3.1 or 12.5 ng/ml, LF caused complete growth inhibition at 100 and 50 μg/ml, respectively (Fig. 1a). LFhyd at 400 μg/ml and LF-B at 12.5 μg/ml caused 80% growth inhibition, and the IC80 of both agents decreased to 1/2 or 1/4 when combined with 3.1–12.5 ng/ml of CTZ (Fig. 1, b and c). In contrast, LF (−) enhanced the growth of *Candida* dose-dependently, and this tendency was observed even in the presence of 3.1–50 ng/ml of CTZ (Fig. 1d). These results indicate that a combination of LF, LFhyd, or LF-B with CTZ inhibits the growth of *Candida* more effectively than any one of these agents alone, and cooperative effects were evident from the decrease in MIC value (IC80).

Combinations of Antifungal Agents and LF

The effects of LF, LFhyd and LF-B on the anti-*Candida* activities of various antifungal agents were investigated. In the presence of 100 μg/ml of LF, which scarcely inhibits the growth of *Candida* by itself, the anti-*Candida* activity of two polyenes, one fluoropyrimidine, two imidazoles containing CTZ, and two triazoles were tested (Table 1). The MIC values (IC80) of AMPH, NYS, polyene antifungal agents and 5-FC, a fluoropyrimidine antifungal agent, did not change following the addition of LF. The MIC of KCZ, an azole antifungal agent, decreased by 1/16 in the presence of LF. The MICs of the other three azoles were also reduced by 1/4 in the presence of LF.

Combinations of Antifungal Agents and LFhyd

In the presence of LFhyd at concentrations of 50 or 200 μg/ml, which just weakly inhibit the growth of *Candida*, the MIC values (IC80) of various antifungal

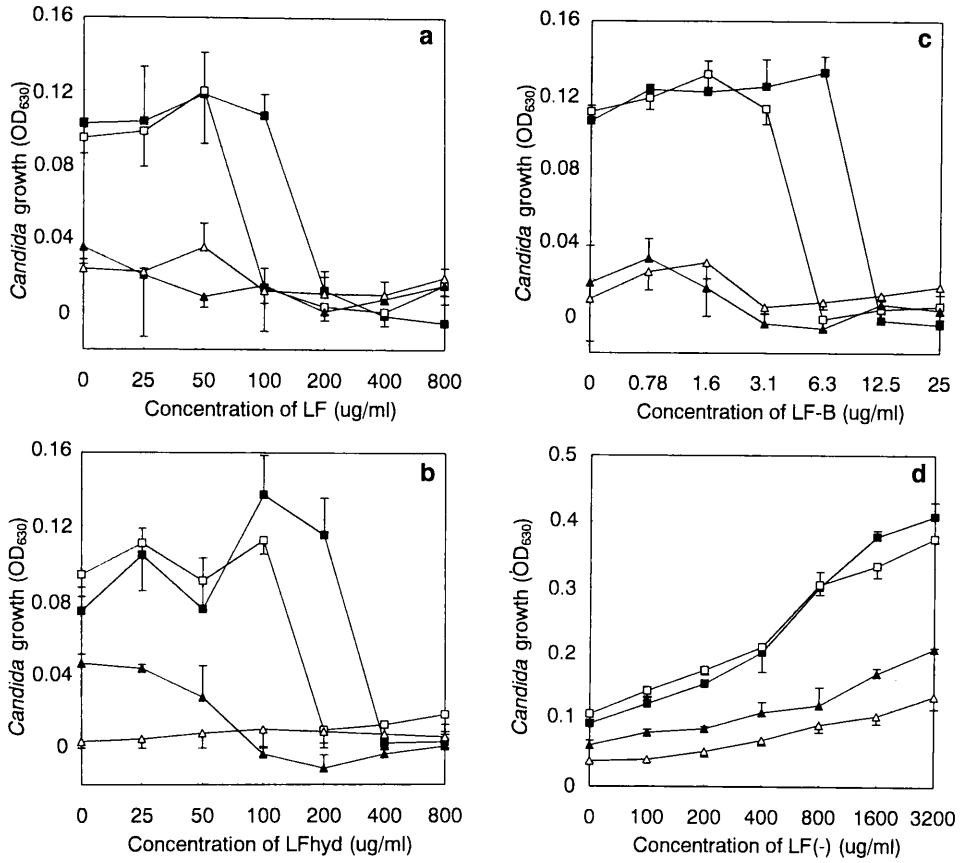


Fig. 1. Growth inhibitory effects of LF (Panel a), LFhyd (Panel b), LF-B (Panel c) and LF (−) (Panel d) with and without CTZ. The growth of *C. albicans* TIMM1768 was estimated by measuring OD_{630}. Data are means of three samples ± SD. CTZ concentrations were 0 (■), 3.1 (□), 12.5 (▲), and 50 (△) ng/ml.

Table 1. Effect of LF on the anti-*Candida* activity of various antifungal agents

Antifungal agent	MIC (ng/ml) Alone	+LF
AMPH	62.5	62.5
NYS	1,000	1,000
5-FC	4,000	4,000
CTZ	50	12.5 (1/4)
KCZ	50	3.1 (1/16)
FLCZ	4,000	1,000 (1/4)
ITCZ	50	12.5 (1/4)

The MIC value was defined as the IC80 of each antifungal agent. LF was added at a sub-MIC level (100 μg/ml). The ratio of the MIC value in the presence of LF to that in the absence of LF is indicated in parentheses.

Table 2. Effect of LFhyd on the anti-*Candida* activity of various antifungal agents

Antifungal agent	MIC (ng/ml) Alone	+LFhyd 50	+LFhyd 200
AMPH	62.5	62.5	62.5
NYS	1,000	1,000	1,000
5-FC	4,000	4,000	1,000 (1/4)
CTZ	50	50	3.1 (1/16)
KCZ	50	50	3.1 (1/16)
FLCZ	16,000	4,000 (1/4)	1,000 (1/16)
ITCZ	50	50	3.1 (1/16)

The MIC value was defined as the IC80 of each antifungal agent. LFhyd was added at a sub-MIC level (50 or 200 μg/ml). The ratio of the MIC value in the presence of LFhyd to that in the absence of LFhyd is indicated in parentheses.

agents were examined (Table 2). The MICs of AMPH and NYS did not change following the addition of LFhyd. Combined with 200 μg/ml of LFhyd, MICs of 5-FC and four azole antifungal agents were decreased by 1/4 and 1/16 as compared with the MIC of each antifungal agent alone. Furthermore, the MIC of FLCZ decreased by 1/4 in the presence of only 50 μg/ml of LFhyd.

Combinations of Antifungal Agents and LF-B

In the presence of LF-B at a concentration of 3.1 μg/ml, which scarcely affected the growth of *Candida*,

Table 3. Effect of LF-B on the anti-*Candida* activity of various antifungal agents

Antifungal agent	MIC (ng/ml) Alone	+LF-B
AMPH	62.5	62.5
NYS	1,000	1,000
5-FC	4,000	4,000
CTZ	50	12.5 (1/4)
KCZ	50	12.5 (1/4)
FLCZ	16,000	4,000 (1/4)
ITCZ	50	12.5 (1/4)

The MIC value was defined as the IC80 of each antifungal agent. LF-B was added at a sub-MIC level (3.1 μg/ml). The ratio of the MIC value in the presence of LF-B to that in the absence of LF-B is indicated in parentheses.

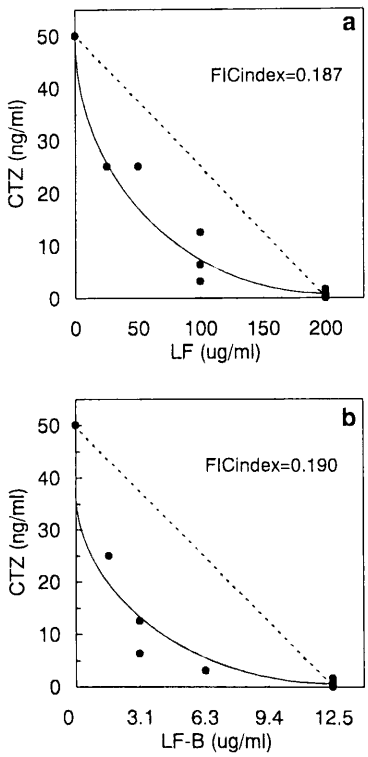


Fig. 2. Anti-*Candida* activity of the combinations of LF (Panel a) and LF-B (Panel b) with CTZ were analyzed by the checkerboard method. For each combination, the IC80 of CTZ and LF-related substance against *C. albicans* TIMM1768 was determined in triplicate tests and plotted in closed circles on arithmetic scales. A putative additive effect is represented by the dashed line. The FIC index calculated for combinations of the two drugs is indicated on each panel.

the anti-*Candida* activity of various antifungal agents was tested (Table 3). No change in the MICs of AMPH, NYS or 5-FC was observed following the addition of LF-B. On the other hand, in the presence of LF-B, the MICs of four azole antifungal agents were decreased by 1/4 as compared with the MIC of each azole alone.

Analysis of Combined Effects by the Checkerboard Method

The combined effects of LF-related substances and CTZ were characterized by the checkerboard method. The anti-*Candida* activity of combinations of LF and CTZ at various concentrations was examined, and points representing each concentration giving 80% growth inhibition of *Candida* were plotted. The plotted curve suggests the existence of a "synergistic" combination effect as shown in Fig. 2a. The FIC index of this combination was 0.187, and this value indicates synergy (≤ 0.5). In the case of varied concentrations of LF-B and CTZ as well, the plotted points create a synergistic curve (Fig. 2b). The FIC index of this combination was 0.190, indicating synergy.

Discussion

LF and LF-B, at relatively high doses, are known to inhibit the growth of *C. albicans* (3, 12, 16). Here, we found that LF-related substances at sub-MIC levels function cooperatively with azole antifungal agents against *C. albicans*. The MIC of each azole antifungal agent tested decreased by about 1/4 in the presence of LF-related substances. The effects of LF or LF-B combined with CTZ on the inhibition of *Candida* were characterized as synergistic by checkerboard analysis. Although LF, LFhyd and LF-B showed no cooperative effect with non-azole types of antifungal agents such as AMPH or 5-FC, all of the azoles tested showed significant combined effects. The azoles tested differ from each other in physical features (e.g., FLCZ is hydrophilic and ITCZ is hydrophobic) but all azole antifungal agents are known to inhibit fungal growth by interference with cytoplasmic membrane synthesis through the inhibition of ergosterol synthesis. Therefore, we speculate that such interference with membrane synthesis may have a role in the cooperative inhibitory effects observed here.

The active component of each of the LF-related substances contributing to the cooperative inhibitory effect with azoles against *C. albicans* is assumed to be lactoferricin (LF-B), since LF, LFhyd and LF-B each contain the LF-B domain or the LF-B peptide. LF (−), which was removed from LF-B, did not inhibit but rather enhanced the growth of *Candida* even in the presence of CTZ. The mechanism of action of the LF-related substances against *C. albicans* has not been fully elucidated. Advanced glycosylation end products which bind to the lactoferricin domain are reported to block the antibacterial activity of LF against *Micrococcus luteus* (6). This finding tends to support our assumption that the anti-*Candida* activity of LF depends on the lactoferricin region. We have shown that LF-B directly binds to

Candida cells (3) and is highly effective to disrupt the cell membrane of *Candida* (16). Therefore, the combination of LF-related substances and azoles may cooperatively inhibit the growth of *Candida* by causing the dysfunction of fungal membranes.

Since our experiments were performed using SDB medium known to be relatively acidic, it is possible that the cooperative effects of LF-related substances and azoles may be influenced by the biochemical characteristics of SDB. However, we believe that the combined anti-*Candida* activities were not dependent on the pH change of the medium because non-effective LF (−) caused a slight decrease in the pH (Δ0.1–0.2) of the medium, similar to that of other effective LF-related substances.

LF and some β-lactam antibiotics are reported to have cooperative antimicrobial effects against *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonellae* (8, 10). More recently, azoles and lysozyme were shown to have synergistic anti-*Candida* activity (13). These findings also suggest that agents having different modes of action, each causing damage to microbial cells, can exhibit synergistic antimicrobial effects.

The levels of LF in exocrine secretions have been reported as: 0.5–1.0 mg/ml in cervical mucus (7), 0.4–1.2 mg/ml in tears (1) and $\geq$2 mg/ml in milk (9). These levels of LF are higher than 100 μg/ml, which is the concentration required to exhibit a synergistic effect in combination with azoles as demonstrated in our assays. Therefore, it is conceivable that LF in exocrine secretions, such as vaginal mucus, may contribute to the therapeutic efficacy of azole antifungal agents against *Candida* infection. Moreover, we hope that combination therapies using azole antifungal agents and LF-related substances, especially the low molecular weight peptide LF-B, prove to be therapeutically effective in clinical trials. In our future studies, we intend to investigate the combined effectiveness of LF-B and azoles against pathogenic fungi other than *C. albicans*, not only *in vitro* but also *in vivo* in animal models.

References

1) Ballow, M., Donshik, P.C., Rapacz, P., and Samartino, L. 1987. Tear lactoferrin levels in patients with external inflammatory ocular disease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **28**: 543–545.
2) Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. 1992. Identification of bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta **121**: 130–136.
3) Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., and Tomita, M. 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Med. Microbiol. Immunol. **182**: 97–105.
4) Eliopoulos, G.M., and Moellering, R.C. 1991. Antimicrobial combinations, p.432–492. *In* Lorian, V. (ed), Antibiotics in laboratory medicine, 3rd ed, Williams & Wilkins, Baltimore.
5) Kirkpatrick, C.H., Green, I., Rich, R.R., and Shade, A.L. 1971. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms of chronic mucocutaneous candidiasis. J. Infect. Dis. **124**: 539–544.
6) Li, Y.M., Tan, A.X., and Vlassara, H. 1995. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. Nature Med. **1**: 1057–1061.
7) Masson, P.L., Heremans, J.F., and Dive, C.H. 1966. An iron-binding protein common to many external secretions. Clin. Chim. Acta **14**: 735–739.
8) Miyazaki, S., Harada, Y., Tsuji, A., and Goto, S. 1991. *In vivo* combined effects of lactoferrin (LF) and drugs on bacterial infections in mice. Chemotherapy **39**: 829–835 (in Japanese).
9) Nagasawa, T., Kiyosawa, I., and Kuwahara, K. 1972. Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. J. Dairy Sci. **55**: 1651–1659.
10) Naidu, A.S., and Arnold, R.R. 1994. Lactoferrin interaction with *Salmonellae* potentiates antibiotic susceptibility *in vitro*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 69–75.
11) Odds, F.C. 1993. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungal agents. J. Antimicrob. Chemother. **31**: 463–471.
12) Soukka, T., Tenovuo, J., and Lenander-Lumikari, M. 1992. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett. **69**: 223–228.
13) Tansho, S., Tansho, T., Ikeda, T., Perera, P.D., Abe, S., and Yamaguchi, H. 1996. Augmentation of anti-*Candida* activity of lanoconazole by lysozyme. Jpn. J. Med. Mycol. (in press).
14) Uchida, K. 1991. Microdilution method to measure susceptibility of fungi to antifungal agents. Jpn. J. Med. Mycol. **32**: 245–247 (in Japanese).
15) Vanden Bossche, H., Marichal, P., Odds, F.C., Le Jeune, L., and Coene, M.-C. 1992. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob. Agents Chemother. **36**: 2602–2610.
16) Wakabayashi, H., Hiratani, T., Uchida, K., and Yamaguchi, H. 1996. Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. J. Infect. Chemother. **1**: 185–189.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, July 1998, p. 1587–1591 Vol. 42, No. 7
0066-4804/98/$04.00+0
Copyright © 1998, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Inhibition of Hyphal Growth of Azole-Resistant Strains of *Candida albicans* by Triazole Antifungal Agents in the Presence of Lactoferrin-Related Compounds

HIROYUKI WAKABAYASHI,[1]* SHIGERU ABE,[2] SUSUMU TERAGUCHI,[1] HIROTOSHI HAYASAWA,[1] AND HIDEYO YAMAGUCHI[2]

Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama, Kanagawa 228-8583,[1] and Department of Microbiology and Immunology, Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605,[2] Japan

Received 8 September 1997/Returned for modification 27 January 1998/Accepted 13 April 1998

The effects of bovine lactoferrin (LF) or the LF-derived antimicrobial peptide lactoferricin B (LFcin B) on the growth of *Candida albicans* hyphae, including those of three azole-resistant strains, were investigated by a crystal violet staining method. The hyphae of two highly azole-resistant strains were more susceptible to inhibition by LF or LFcin B than the azole-susceptible strains tested. One moderately azole-resistant strain was defective in the formation of hyphae and showed a susceptibility to LF greater than that of the susceptible strains but a susceptibility to LFcin B similar to that of the susceptible strains. The highly azole-resistant strain TIMM3317 showed trailing growth in the presence of fluconazole or itraconazole, while the extent of growth was reduced by the addition of LF or LFcin B at a sub-MIC. Thus, the addition of LF or LFcin B at a sub-MIC resulted in a substantial decrease in the MICs of fluconazole and itraconazole for two highly azole-resistant strains; e.g., the MIC of fluconazole for TIMM3317 was shifted from >256 to 0.25 μg/ml by LF, but the MICs were not decreased for the susceptible strains. The combination effects observed with triazoles and LF-related compounds in the case of the two highly azole-resistant strains were confirmed to be synergistic by the fractional inhibitory concentration index. These results demonstrate that for some azole-resistant *C. albicans* strains, LF-related compounds combined with triazoles can inhibit the growth of hyphae, an important form of this organism in pathogenesis.

Candida albicans is an opportunistic pathogen that causes systemic and mucosal infectious diseases in humans. Among mucosal *Candida* infections, oropharyngeal candidiasis has become a serious clinical problem in immunocompromised hosts such as AIDS patients (18). The hyphal form of *C. albicans* is more capable of adhering to mucosal cells than the yeast form and, thus, is more likely to invade host tissues and initiate clinical disease (16). Therapeutic strategies should include agents that target hyphal development.

The triazole antifungal agents fluconazole and itraconazole are widely used to treat infections caused by *Candida* spp. because of their demonstrated efficacy and low levels of toxicity (8). Azole antifungal agents are known to affect the development of *C. albicans* hyphae at doses that result in only a relatively small degree of inhibition of the growth rate (17). However, in severely immunocompromised patients, such as those with late-stage AIDS or chronic mucocutaneous candidiasis, repeated treatments with fluconazole have led to the appearance of *Candida* isolates resistant to these agents (21). Although several antifungal agents have been reported to have efficacy against azole-resistant *C. albicans*, studies with those agents have dealt mainly with cells growing in the yeast form (12, 22). Studies focusing on cells growing in the hyphal form are essential considering the importance of this form in pathogenesis.

Lactoferrin (LF) is an antimicrobial protein found in various exocrine secretions of mammals and in the secondary granules of neutrophils. Many investigators have reported on the anti-*Candida* activities of LF (15, 19, 23). The antimicrobial peptide lactoferricin is derived from the N-terminal region of the LF molecule (2), and this lactoferricin region is responsible for the antimicrobial activity of LF (11). Lactoferricin B (LFcin B), derived from bovine LF, exhibits potent disruptive effects on the fungal cell membrane and has fungicidal activity against *C. albicans* (25).

From studies with yeast forms, we have reported that LF or LFcin B combined with azole antifungal agents has synergistic antifungal activity against *C. albicans* (24). To assess the value of combination therapy, we have studied the susceptibilities of hyphal forms of azole-resistant *C. albicans* to LF or LFcin B alone or in combination with triazole antifungal agents.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Bovine LF was produced by Morinaga Milk Industry Co. (Tokyo, Japan). The antimicrobial peptide LFcin B was produced by the method reported previously (2). Amphotericin B was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Fluconazole and itraconazole were extracted from Diflucan capsules (Pfizer Pharmaceuticals Inc., Tokyo, Japan) and Itrizole capsules (Janssen Kyowa Co., Tokyo, Japan), respectively.

***C. albicans* strains.** The following azole-susceptible *C. albicans* strains were used: ATCC 90028, recommended by National Committee for Clinical Laboratory Standards document M27-T (14), and TIMM1768, a clinically isolated serotype A strain (Teikyo University Institute of Medical Mycology, Tokyo, Japan). The azole-resistant strains were as follows: moderately azole-resistant strain TIMM3164 was isolated from an AIDS patient with oropharyngeal candidiasis, and highly azole-resistant strains TIMM3315 and TIMM3317 were sequentially isolated from a patient with a hematological disease. Stock cultures were transferred onto Sabouraud glucose agar and were incubated at 28°C before use. The susceptibilities of the strains to antifungal agents were confirmed by the standard method described in document M27-T (14).

Measurement of hyphal growth. RPMI 1640 medium supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal calf serum, 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, and 16 mM sodium hydrogen carbonate (pH 7.0) was used as the hyphal growth-promoting

* Corresponding author. Mailing address: Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., 5-1-83 Higashihara, Zama, Kanagawa 228-8583, Japan. Phone: 81-462-52-3045. Fax: 81-462-52-3049.

TABLE 1. MICs of antifungal agents, LF, and LFcin B determined by the CV staining assay

C. albicans strain	MIC (μg/ml)				
	Amphotericin B	Fluconazole	Itraconazole	LF	LFcin B
Azole susceptible					
ATCC 90028	0.13	0.25	0.0063	>6,400	400
TIMM1768	0.13	0.25	0.0063	6,400	400
Azole resistant					
TIMM3164[a]	0.13	1	0.05	1,600	400
TIMM3315	0.25	128	>51	200	50
TIMM3317	0.13	>256	>51	1,600	200

[a] The MIC for this strain was determined by measuring the increase in the optical density at 630 nm of the culture.

medium (RP medium) for *C. albicans*. Yeast-form cells of *C. albicans* were collected from cultures on Sabouraud glucose agar, washed with saline, and suspended in RP medium at 10^5 cells/ml. Each well of a 96-well flat-bottom microplate received a mixture of 20 μl of *Candida* suspension, 10 μl of a stock solution of LF or LFcin B, 2 μl of a stock solution of antifungal agent, and 168 μl of RP medium, and all microplates were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for 15 h. To determine the extent of growth of *C. albicans* hyphae, the crystal violet (CV) staining assay was performed as described previously (1, 19). Briefly, the medium in the wells was discarded and the adhesive *Candida* mycelia were sterilized by treatment with 70% ethanol. The mycelia were stained with 0.02% CV and washed with water. After the microplates were dried, 150 μl of isopropanol containing 0.04 N HCl and 50 μl of 0.25% sodium dodecyl sulfate were added to the wells and mixed. The absorbances at 550 to 630 nm of triplicate samples were measured spectrophotometrically. For fluconazole and LF-related compounds, the MIC was defined as the lowest drug concentration that reduced growth by 80% compared with the growth in the drug-free well. For itraconazole, the 90% inhibitory concentration was chosen because this drug caused partial inhibition of azole-resistant *C. albicans*.

The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated as follows (6): $[(A)/MIC_A]+[(B)/MIC_B]$ = FIC index, where MIC_A and MIC_B are the MICs of drugs *A* and *B*, respectively, determined separately, and (*A*) and (*B*) are the MICs of drugs *A* and *B*, respectively, when the MIC of the combination was determined. The effects of the drugs were interpreted to be indicative of synergy or indifference when the FIC index was <1 or 1 to 4, respectively.

RESULTS

Inhibition of hyphal growth by antifungal agents, LF, or LFcin B. The effects of antifungal agents, LF, and LFcin B on the growth of the hyphae of the test strains in RP medium were quantified by the CV staining method except in the case of TIMM3164, for which the MIC was determined by monitoring the increase in the optical density at 630 nm of the culture because of the defective growth of the strain's hyphae (Table 1). High levels of resistance of TIMM3315 and TIMM3317 to fluconazole and itraconazole were observed in this assay, and a moderate level of resistance of TIMM3164 to these agents was observed. The MIC of LF for the azole-resistant strains TIMM3164, TIMM3315, and TIMM3317 was lower than that for the azole-susceptible strains ATCC 90028 and TIMM1768. The MIC of LFcin B for TIMM3315 and TIMM3317 was also lower than that for the azole-susceptible strains.

Effect of triazole antifungal agents combined with LF-related compounds against *C. albicans* TIMM3317. Inhibition of the growth of the hyphae of azole-resistant strain TIMM3317 by fluconazole or itraconazole was observed in the presence or absence of LF or LFcin B (Fig. 1). At higher concentrations of fluconazole and itraconazole, the isolate showed trailing growth, as indicated by disappearance of the endpoint. The addition of LF or LFcin B decreased the extent of trailing growth in the presence of fluconazole or itraconazole. In particular, LFcin B at 100 μg/ml with fluconazole or itraconazole completely inhibited hyphal growth, although the peptide alone had almost no effect. To examine the effect of the combination of LF or LFcin B with fluconazole, the growth of TIMM3317 treated with these agents was monitored microscopically (Fig. 2). After 15 h of incubation, the strain grown in drug-free medium showed substantial development of hyphae and yeast cells were not evident. In the presence of fluconazole at 1 μg/ml, some hyphae and yeast cells were observed. In the presence of LF at 200 μg/ml, fewer hyphae were seen. When exposed to the combination of fluconazole and LF, the strain developed significantly fewer hyphae than were observed in the presence of each drug, although some yeast cells were evident. When fluconazole and LFcin B together were added to the culture, a few yeast cells but almost no hyphae were observed, although LFcin B alone had little effect on the development of hyphae. These microscopic observations corresponded well to the results of the quantification of the hyphae obtained by the CV staining method (Fig. 1).

Comparison of the effects of combinations against azole-susceptible and -resistant strains. The effects of the combinations on the development of hyphae by azole-susceptible and -resistant strains were compared with respect to reduction of the MIC and the FIC index (Table 2). The MICs of fluconazole for the azole-susceptible strains ATCC 90028 and TIMM1768 did not decrease upon the addition of LF or LFcin B at concentrations of less than one-fourth the MIC, whereas for the azole-resistant strains TIMM3315 and TIMM3317, decreases in the MICs were evident (Tables 1 and 2). From examination of the FIC indices for both strains, it was interpreted that the combination of fluconazole and LF, as well as the combination of fluconazole and LFcin B, was synergistic (Table 2). With strain TIMM3164 growing in the yeast form, a reduction of the MIC of fluconazole was not evident after the addition of LF or LFcin B. In tests with itraconazole, a decrease in the MIC and a synergistic effect were observed when itraconazole was com-

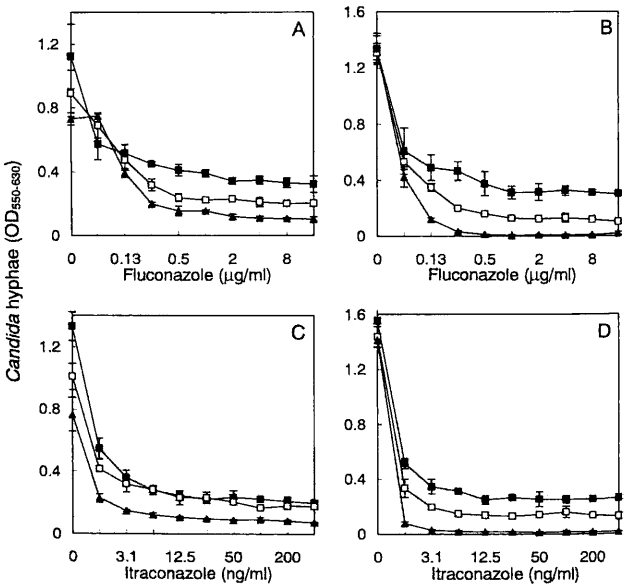


FIG. 1. Inhibition of growth of *C. albicans* TIMM3317 hyphae by triazole antifungal agents in the presence of LF or LFcin B after 15 h of incubation. Fluconazole (A) and itraconazole (C) were tested in the absence (■) or presence (□, 200 μg/ml; ▲, 800 μg/ml) of LF. Fluconazole (B) and itraconazole (D) were tested in the absence (■) or presence (□, 25 μg/ml; ▲, 100 μg/ml) of LFcin B. The values are the means ± standard deviations for three determinations. $OD_{550-630}$, optical density at 550 to 630 nm.

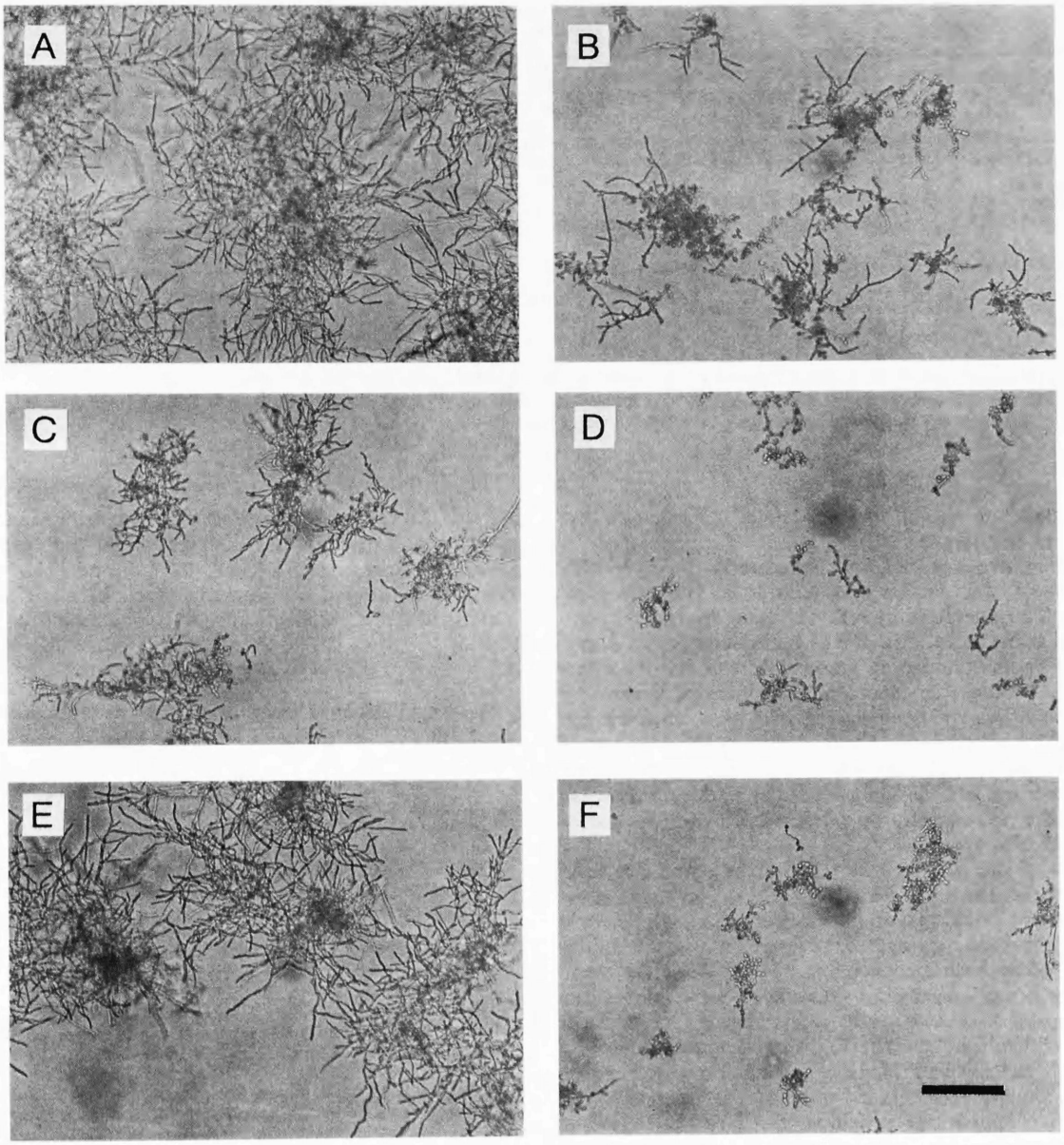


FIG. 2. Phase-contrast micrographs of *C. albicans* TIMM3317 grown in the presence of fluconazole and/or LF-related compounds. (A) Control culture with no drug showing substantial development of hyphae and no yeast cells; (B) culture treated with fluconazole (1 μg/ml) showing some hyphae and yeast cells; (C) culture treated with LF (200 μg/ml) showing fewer hyphae; (D) culture treated with fluconazole (1 μg/ml) plus LF (200 μg/ml) showing significantly fewer hyphae and some yeast cells; (E) culture treated with LFcin B (25 μg/ml) showing unchanged development of hyphae; (F) culture treated with fluconazole (1 μg/ml) plus LFcin B (25 μg/ml) showing a few yeast cells and almost no hyphae. Bar, 100 μm.

bined with LF or LFcin B in the case of strains TIMM3164, TIMM3315, and TIMM3317.

DISCUSSION

By examining hyphal growth, we have found that (i) azole-resistant strains of *C. albicans* are more susceptible to inhibition by LF and LFcin B than azole-susceptible strains and (ii) some azole-resistant strains are inhibited by fluconazole or itraconazole to a greater extent in the presence of relatively low concentrations of LF or LFcin B. These findings indicate that LF or LFcin B may play a valuable role in the inhibition of the mycelial form of azole-resistant *C. albicans*.

The finding that azole-resistant strains showed higher susceptibilities to LF or LFcin B than the azole-susceptible strains is not surprising. Fluconazole-resistant *Candida glabrata* strains lacking cytochrome P-450, an enzyme involved in ergosterol biosynthesis and the target of azole action, are highly susceptible to killing by H_2O_2 and human neutrophils (9). The absence of cytochrome P-450 activity and the resultant membrane sterol alterations may be associated with membrane perturbations in these azole-resistant strains. LF interacts with the cell surface causing extracellular leakage of proteins and the formation of surface blebs in *Candida* spp. (15), and LFcin B has been found to disrupt cell membrane functions in *C. albicans* (25). Thus, some azole-resistant *Candida* spp. which have alterations in their cell membranes appear to be more susceptible than other strains to nonspecific host defense fac-

TABLE 2. MIC and FIC index of fluconazole or itraconazole in combination with LF-related compounds as determined by the CV staining assay

C. albicans strain	Fluconazole with the following:				Itraconazole with the following			
	LF		LFcin B		LF		LFcin B	
	MIC (μg/ml)[a]	FIC index[b]	MIC (μg/ml)	FIC index	MIC (μg/ml)	FIC index	MIC (μg/ml)	FIC index
Azole susceptible								
ATCC 90028	0.5 (800)	2.06 (I)	0.25 (25)	1.06 (I)	0.0063 (800)	1.06 (I)	0.0031 (25)	0.56 (S)
TIMM1768	0.25 (800)	1.13 (I)	0.25 (25)	1.06 (I)	0.0063 (800)	1.13 (I)	0.0063 (25)	1.06 (I)
Azole resistant								
TIMM3164[c]	1 (200)	1.13 (I)	2 (25)	2.06 (I)	0.025 (200)	0.63 (S)	0.025 (25)	0.56 (S)
TIMM3315	0.12 (25)	0.13 (S)	0.25 (6.3)	0.13 (S)	≤0.0016 (25)	0.13 (S)	0.025 (6.3)	0.13 (S)
TIMM3317	0.25 (400)	0.25 (S)	0.25 (25)	0.13 (S)	0.0031 (400)	0.25 (S)	0.0063 (25)	0.13 (S)

[a] LF or LFcin B was added at a concentration of less than its one-fourth its MIC, and the concentration (in micrograms per milliliter) is indicated in parentheses.
[b] The FIC index was calculated as described in the text, and its interpretation is indicated in parentheses: S, synergy (<1); I, indifference (1 to 4).
[c] The MIC for this strain was determined by measuring the increase in the optical density at 630 nm of the culture.

tors such as active oxygen and LF-related compounds that target the cell membrane.

Azole resistance in *C. albicans* is correlated mainly with enhanced azole efflux mediated by multidrug efflux transporters such as Cdr1 energized by ATP and Ben^r energized by the proton motive force (4, 20). It has been demonstrated that LFcin B dissipates the proton gradient across the cell membrane of *C. albicans* (25) and inhibits uptake of glucose by *Trichophyton rubrum* (3), suggesting that it may reduce the levels of ATP production in fungi. Although these effects of LFcin B and those of LF may inhibit the activity of multidrug efflux transporters and thereby reduce the extent of azole resistance in the resistant strains, further studies will be necessary to clarify this possibility.

An effect of the combination of triazoles and LF-related compounds was not observed against the moderately azole-resistant strain TIMM3164, which is defective in the formation of hyphae. It is unknown whether the low level of susceptibility of TIMM3164 to these agents compared to those of the other strains examined is indicative of a difference in the mechanism of azole resistance or whether it results from a defect in the formation of hyphae. Upon testing of the azole-susceptible strains ATCC 90028 and TIMM1768, no effect of triazoles and LF-related compounds combined was evident, although an effect of such a combination was demonstrated for TIMM1768 in our previous study (24). This discrepancy may have been due to the different culture conditions and differences in the growth form of the organisms tested. In fact, the MIC of fluconazole for TIMM1768 was 0.25 μg/ml when the MIC was determined by quantification of hyphal growth in RP medium, whereas it was 4 to 16 μg/ml when the MIC was determined by measuring growth in Sabouraud glucose broth, in which yeast-form cells are dominant. LF-related compounds may enhance the susceptibility of *Candida* to azole agents under growth conditions that make the organisms less susceptible to these drugs.

Plasma LF is derived from neutrophils, and during microbial infections the levels of LF in plasma may increase 100-fold (up to 200 μg/ml) (7). LF is also present in mucus secretions at variable concentrations ranging from 5 μg/ml in saliva (10) to 1,000 μg/ml in cervical mucus (13). The presence of LF proteolysis products in bronchoalveolar lavage samples from patients with inflammatory lung diseases has been reported (5). LF derived from neutrophils or mucosal surfaces such as the cervix uteri and active fragments of LF may have the potential to augment the efficacy of azole antifungal chemotherapy and thereby inhibit colonization of the host by azole-resistant *C. albicans*. The LF concentration in oral mucus is low, and the oral cavity is the primary site of infection in the case of azole-resistant *C. albicans* (21). The therapeutic effects of LF-related compounds against experimental murine candidiasis due to azole-resistant *C. albicans* are now being assessed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Katsuhisa Uchida for providing azole-resistant *C. albicans* and Kazunori Maebashi and Michinari Kudoh for useful discussions.

REFERENCES

1. **Abe, S., T. Satoh, Y. Tokuda, S. Tansho, and H. Yamaguchi.** 1994. A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*. Microbiol. Immunol. **38:**385–388.
2. **Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita.** 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta **1121:**130–136.
3. **Bellamy, W., K. Yamauchi, H. Wakabayashi, M. Takase, N. Takakura, S. Shimamura, and M. Tomita.** 1994. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Lett. Appl. Microbiol. **18:**230–233.
4. **Ben-Yaacov, R., S. Knoller, G. A. Caldwell, J. M. Becker, and Y. Koltin.** 1994. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. Antimicrob. Agents Chemother. **38:**648–652.
5. **Britigan, B. E., M. B. Hayek, B. N. Doebbeling, and R. B. Fick, Jr.** 1993. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. Infect. Immun. **61:** 5049–5055.
6. **Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering.** 1991. Antimicrobial combinations, p. 432–492. *In* V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
7. **Gutteberg, T. J., B. Haneberg, and T. Jorgensen.** 1984. The latency of serum acute proteins in meningococcal septicaemia, with special emphasis on lactoferrin. Clin. Chim. Acta **136:**173–178.
8. **Hay, R. J.** 1990. Overview of studies of fluconazole in oropharyngeal candidiasis. Rev. Infect. Dis. **12**(Suppl. 3):334–337.
9. **Kan, V. L., A. Geber, and J. E. Bennett.** 1996. Enhanced oxidative killing of azole-resistant *Candida glabrata* strains with *ERG11* deletion. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**1717–1719.
10. **Lenander-Lumikari, M., and I. Johansson.** 1995. Effect of saliva composition on growth of *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. Oral Microbiol. Immunol. **10:**233–240.
11. **Li, Y. M., A. X. Tan, and H. Vlassara.** 1995. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. Nature Med. **1:**1057–1061.
12. **Martinez-Suarez, J. V., and J. L. Rodriguez-Tudela.** 1996. In vitro activities of semisynthetic pneumocandin L-733,560 against fluconazole-resistant and -susceptible *Candida albicans* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **40:** 1277–1279.
13. **Masson, P. L., J. F. Heremans, and C. H. Dive.** 1966. An iron-binding protein common to many external secretions. Clin. Chim. Acta **14:**735–739.
14. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tenta-

tive standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

15. **Nikawa, H., L. P. Samaranayake, J. Tenovuo, K. M. Pang, and T. Hamada.** 1993. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. Arch. Oral Biol. **38:**1057–1063.
16. **Odds, F. C.** 1988. Candida and candidosis: a review and bibliography, 2nd ed. Balliere Tindall, London, United Kingdom.
17. **Odds, F. C., A. Cockayne, J. Hayward, and A. B. Abbott.** 1985. Effects of imidazole- and triazole-derivative antifungal compounds on the growth and morphological development of *Candida albicans* hyphae. J. Gen. Microbiol. **131:**2581–2589.
18. **Odds, F. C., J. Schmid, and D. R. Soll.** 1990. Epidemiology of *Candida* infections in AIDS, p. 67–74. *In* H. Vanden Bossche et al. (ed.), Mycoses in AIDS patients. Plenum Press, New York, N.Y.
19. **Okutomi, T., S. Abe, S. Tansho, H. Wakabayashi, K. Kawase, and H. Yamaguchi.** 1997. Augmented inhibition of growth of *Candida albicans* by neutrophils in the presence of lactoferrin. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **18:**105–112.
20. **Prasad, R., P. de Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. Curr. Genet. **27:**320–329.
21. **Rex, J. H., M. G. Rinaldi, and M. A. Pfaller.** 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother. **39:**1–8.
22. **Ruhnke, M., A. Schmidt-Westhausen, and M. Trautmann.** 1997. In vitro activities of voriconazole (UK-109,496) against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. Antimicrob. Agents Chemother. **41:**575–577.
23. **Valenti, P., P. Visca, G. Antonini, and N. Orsi.** 1986. Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells. FEMS Microbiol. Lett. **33:** 271–275.
24. **Wakabayashi, H., S. Abe, T. Okutomi, S. Tansho, K. Kawase, and H. Yamaguchi.** 1996. Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. Microbiol. Immunol. **40:** 821–825.
25. **Wakabayashi, H., T. Hiratani, K. Uchida, and H. Yamaguchi.** 1996. Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. J. Infect. Chemother. **1:**185–189.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, May 1999, p. 1267–1269 Vol. 43, No. 5
0066-4804/99/$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

N-Acylated and D Enantiomer Derivatives of a Nonamer Core Peptide of Lactoferricin B Showing Improved Antimicrobial Activity

HIROYUKI WAKABAYASHI,[1]* HIROSHI MATSUMOTO,[2] KOICHI HASHIMOTO,[2] SUSUMU TERAGUCHI,[1] MITSUNORI TAKASE,[1] AND HIROTOSHI HAYASAWA[1]

Nutritional Science Laboratory[1] and Biochemical Research Laboratory,[2] Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama, Kanagawa 228-8583, Japan

Received 2 September 1998/Returned for modification 8 January 1999/Accepted 7 March 1999

N-acylated or D enantiomer peptide derivatives based on the sequence RRWQWRMKK in lactoferricin B demonstrated antimicrobial activities greater than those of lactoferricin B against bacteria and fungi. The most potent peptide, conjugated with an 11-carbon-chain acyl group, showed two to eight times lower MIC than lactoferricin B.

Lactoferricin B (LFcin B) is a 25-mer antimicrobial peptide generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin (LF) and is more potent than lactoferricin H (LFcin H), a 47-mer peptide similarly derived from human LF (3). LFcin B shows activity against a wide range of microorganisms including bacteria and fungi (2, 15), and its mode of action is microbicidal via membrane perturbation (4, 15). The peptide shows synergistic actions with other antimicrobial agents such as azole antifungal agents (13, 14). Nuclear magnetic resonance studies have revealed that the three-dimensional structure of LFcin B is an antiparallel β-sheet and that hydrophilic and positively charged residues surround the hydrophobic surface, suggesting interactions of this peptide with the biological membrane (9). Although several LFcin analogs with amino acid sequences shorter than LFcin B or LFcin H have been reported, their antimicrobial potency seems to be similar to or weaker than that of the original LFcin (5, 7, 10, 11). Therefore, this study was performed to produce more potent LFcin analogs and demonstrate improved antimicrobial activities displayed by N-acylated or D enantiomer analogs of nonamer peptides based on a core sequence of LFcin B.

Preparation of peptides. The structures of the LFcin-related peptides and reference antimicrobial peptides used in this study are shown in Table 1. LFcin B was purified from a pepsin hydrolysate of bovine LF as described previously (3). ($Ala^{8,13,18}$)-magainin II-NH_2 (6) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Other peptides were chemically synthesized on a 4-(2′,4′-dimethoxyphenyl-9-fluorenylmethoxycarbonyl-aminomethyl) phenoxyacetamido-ethyl resin or preloaded 4-(hydroxymethyl)phenoxymethyl-copoly(styrene-1% divinylbenzene) (HMP) resin (Perkin-Elmer Japan Co. Applied Biosystems Division, Chiba, Japan) by a 9-fluorenylmethoxycarbonyl strategy and solid-phase methodology by means of an automated synthesizer (model 433A; Perkin Elmer). For N-acylation of the peptides, the resin was treated with the desired fatty acid activated in situ as an HOBt/HBTU ester. After removal of the resin and the side-chain-protecting groups, the crude peptides were purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography. The structures of the final compounds were confirmed by mass-spectral analysis (LCQ, Finnigan Mat). All peptides including N-acylated ones were soluble in water.

Microorganisms tested. *Escherichia coli* IID861, *Pseudomonas aeruginosa* IFO3445, and *Staphylococcus aureus* JCM2151 (ATCC 6538P) were maintained on plate count agar (Eiken Chemicals Co., Tokyo, Japan) slants. The stock cultures were harvested in 1% Bacto Peptone (Difco Laboratories Co., Detroit, Mich.) and incubated for 7 h at 37°C to obtain inocula. *Candida albicans* TIMM0144 and *Trichophyton mentagrophytes* TIMM1189 were grown on Sabouraud glucose agar (1% Bacto Peptone, 2% glucose, 1.5% agar) slants at 27°C before use.

Antimicrobial susceptibility testing. MICs were determined by the microdilution method using flat-bottom 96-well microplates. As culture media, 1% Bacto Peptone or Mueller-Hinton broth (Difco) was used for bacteria and Sabouraud glucose broth (1% Bacto Peptone, 2% glucose) was used for fungi. Bacterial cells were inoculated into microplates at a final cell density of 10^6 cells/ml and incubated for 17 h at 37°C. *C. albicans* cells were harvested from a slant, suspended in the culture medium, inoculated into microplates at 10^5 cells/ml, and incubated for 17 h at 37°C. Microconidia of *T. mentagrophytes* were harvested from a slant in saline solution containing 0.85% NaCl and 0.05% Tween 80, suspended in the culture medium, inoculated into microplates at 10^4 cells/ml, and incubated for 4 days at 27°C. The MIC for triplicate samples was determined.

The MICs of LFcin-related peptides for the five microorganisms in peptone-based broth are shown in Table 2. LFcin H(25mer), which has an amino acid sequence homologous to that of LFcin B, was substantially less active than LFcin B against all microorganisms tested. We synthesized several peptide derivatives based on the cationic-amino-acid-rich region RRWQWRMKK (corresponding to positions R4 through K12) of LFcin B and assayed the antimicrobial activity of each. N-acyl derivative peptides having a carbon chain length of six to eleven carbons showed similar or higher activities compared with LFcin B. The most active peptide had an 11-carbon acyl chain and exhibited two- to four-times-lower MIC than LFcin B. D-(4-12)-NH_2, a D enantiomer derivative of (4-12)-NH_2, was also highly active and showed MIC similar to that of Acyl-11-(4-12)-NH_2. N-acylation, however, did not further augment the activity of the D enantiomeric peptide. Ac-RRWWCR-NH_2

* Corresponding author. Mailing address: Nutritional Science Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., 5-1-83 Higashihara, Zama, Kanagawa 228-8583, Japan. Phone: 81-462-52-3045. Fax: 81-462-52-3049. E-mail: Hiroyuki_Wa@msn.com.

TABLE 1. Structures of the peptide derivatives used in this study

Peptide name	Structure
LFcin B	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF
LFcin H(25mer)	TKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDS
(4-12)-NH_2	RRWQWRMKK-NH_2
Acyl-6-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_4CO$-RRWQWRMKK-NH_2
Acyl-10-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_8CO$-RRWQWRMKK-NH_2
Acyl-11-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_9CO$-RRWQWRMKK-NH_2
Acyl-14-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{12}CO$-RRWQWRMKK-NH_2
Acyl-16-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{14}CO$-RRWQWRMKK-NH_2
Acyl-18-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{16}CO$-RRWQWRMKK-NH_2
D-(4-12)-NH_2	D-(RRWQWRMKK)-NH_2[c]
Acyl-10-D-(4-12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_8CO$-D-(RRWQWRMKK)-NH_2[c]
Ac-RRWWCR-NH_2[a]	CH_3CO-RRWWCR-NH_2
($Ala^{8,13,18}$)-magainin II-NH_2[b]	GIGKFLHAALLFAKAFVAEIMNS-NH_2

[a] See reference 8.
[b] See reference 6.
[c] These are the D enantiomer derivatives of the peptides.

was previously identified as the most potent hexameric antimicrobial peptide in synthetic peptide combinatorial libraries (8) and showed sequence similarity to the RRWQWR region in LFcin B. This peptide showed slightly lower activity than LFcin B. ($Ala^{8,13,18}$)-magainin II-NH_2 is a peptide consisting of 23 amino acid residues reported to display antimicrobial activity up to two orders of magnitude stronger than that of the original magainin II (6). The activity of this analog was similar to that of Acyl-11-(4-12)-NH_2. In tests using Mueller-Hinton broth, in which the activity of LFcin B, especially against gram-negative bacteria, was decreased, improvement of antimicrobial activities and carbon chain length-dependent activities for N-acylated analogs were clearly indicated (Table 3). Acyl-10-(4-12)-NH_2 and Acyl-11-(4-12)-NH_2 showed four- to eight-times-lower MIC than LFcin B.

N-acylation resulted in an increase in the interaction of LFcin B analogs with microbial membranes and may have caused enhanced antimicrobial activity. Appropriate amino acid substitution is known to increase the activity of antimicrobial peptides (6, 10). The N-acyl derivatization approach using a relatively short peptide, however, can simplify the peptide synthesis process compared to synthesizing larger peptides. Although Ca^{2+} or Mg^{2+} ions (>2 mM) are known to reduce

TABLE 2. In vitro antimicrobial activity of LFcin-derived peptides in peptone-based broth

Agent	MIC (μg/ml)				
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*C. albicans*	*T. mentagrophytes*
LFcin B	6	12	12	25	12
LFcin H(25mer)	25	50	25	100	50
(4-12)-NH_2	6	25	6	25	6
Acyl-6-(4-12)-NH_2	3	25	6	25	6
Acyl-10-(4-12)-NH_2	3	6	6	25	6
Acyl-11-(4-12)-NH_2	3	6	3	12	6
Acyl-14-(4-12)-NH_2	6	12	12	25	12
Acyl-16-(4-12)-NH_2	6	12	12	50	12
Acyl-18-(4-12)-NH_2	6	25	12	100	12
D-(4-12)-NH_2	3	12	3	6	6
Acyl-10-D-(4-12)-NH_2	3	6	3	12	6
Ac-RRWWCR-NH_2	12	25	12	50	6
($Ala^{8,13,18}$)-magainin II-NH_2	3	6	3	25	12

TABLE 3. In vitro antimicrobial activity of LFcin-derived peptides in Mueller-Hinton broth

Agent	MIC (μg/ml)		
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
LFcin B	50	>200	25
LFcin H(25mer)	>200	>200	>200
Acyl-6-(4-12)-NH_2	100	>200	100
Acyl-10-(4-12)-NH_2	6	50	6
Acyl-11-(4-12)-NH_2	12	50	3
Acyl-14-(4-12)-NH_2	12	50	12
Acyl-16-(4-12)-NH_2	25	50	12
Acyl-18-(4-12)-NH_2	50	100	25
D-(4-12)-NH_2	50	>200	12
Acyl-10-D-(4-12)-NH_2	12	100	6
Ac-RRWWCR-NH_2	100	>200	25

the activity of LFcin B (2), these ions were not likely involved in the increased MIC of the peptide in Mueller-Hinton broth, because the concentrations of Ca^{2+} and Mg^{2+} in Mueller-Hinton broth were low (0.15 and 0.21 mM, respectively) and similar to those in 1% Bacto Peptone. Other constituents may be responsible for the diminished activity of LFcin B in Mueller-Hinton broth, and N-acylated derivatives may overcome such blocking effects of medium ingredients. D enantiomer peptides can survive digestion by proteases secreted by microorganisms. This and previous studies (1, 5, 12) indicate advantages of D enantiomer derivatives in antimicrobial applications.

The hemolysis activity of the 11-mer LFcin B analog is reported to be very low (10), and D-(4-12)-NH_2 did not exert a toxic effect against animal cells at concentrations active for the inhibition of microorganisms in our preliminary evaluation. Oral application is a possible route for the therapeutic uses of the derived compounds, because oral administration of the N-acylated and D enantiomer derivatives in mice resulted in no lethal toxicity at doses as high as 100 mg/kg of body weight (unpublished data).

REFERENCES

1. **Alvarez-Bravo, J., S. Kurata, and S. Natori.** 1994. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. **302:**535–538.
2. **Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita.** 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J. Appl. Bacteriol. **73:**472–479.
3. **Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita.** 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta **1121:**130–136.
4. **Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita.** 1993. Role of cell binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. J. Appl. Bacteriol. **75:**478–484.
5. **Chapple, D. S., D. J. Mason, C. L. Joannou, E. W. Odell, V. Gant, and R. W. Evans.** 1998. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. Infect. Immun. **66:**2434–2440.
6. **Chen, H.-C., J. H. Brown, J. L. Morell, and C. M. Huang.** 1988. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. FEBS Lett. **236:** 462–466.
7. **Hoek, K. S., J. M. Milne, P. A. Grieve, D. A. Dionysius, and R. Smith.** 1997. Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. Antimicrob. Agents Chemother. **41:**54–59.
8. **Houghten, R. A., C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, and J. H. Cuervo.** 1991. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. Nature **354:**84–86.
9. **Hwang, P. M., N. Zhou, X. Shan, C. H. Arrowsmith, and H. J. Vogel.** 1998. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. Biochemistry **37:**4288–4298.
10. **Kang, J. H., M. K. Lee, K. L. Kim, and K.-S. Hahm.** 1996. Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of

bovine lactoferrin. Int. J. Pept. Protein Res. **48**:357–363.

11. **Odell, E. W., R. Sarra, M. Foxworthy, D. S. Chapple, and R. W. Evans.** 1996. Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. FEBS Lett. **382**:175–178.
12. **Wade, D., A. Boman, B. Wåhlin, C. M. Drain, D. Andreu, H. G. Boman, and R. B. Merrifield.** 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:4761–4765.
13. **Wakabayashi, H., S. Abe, T. Okutomi, S. Tansho, K. Kawase, and H. Yamaguchi.** 1996. Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. Microbiol. Immunol. **40**: 821–825.
14. **Wakabayashi, H., S. Abe, S. Teraguchi, H. Hayasawa, and H. Yamaguchi.** 1998. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. Antimicrob. Agents Chemother. **42**:1587–1591.
15. **Wakabayashi, H., T. Hiratani, K. Uchida, and H. Yamaguchi.** 1996. Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. J. Infect. Chemother. **1**:185–189.

Biosci. Biotechnol. Biochem., **63** (5), 955–957, 1999

Inhibition of Iron/Ascorbate-Induced Lipid Peroxidation by an N-Terminal Peptide of Bovine Lactoferrin and Its Acylated Derivatives

Hiroyuki WAKABAYASHI, Hiroshi MATSUMOTO, Koichi HASHIMOTO, Susumu TERAGUCHI, Mitsunori TAKASE, and Hirotoshi HAYASAWA

Biosci. Biotechnol. Biochem., **63** (5), 955-957, 1999

Note

Inhibition of Iron/Ascorbate-Induced Lipid Peroxidation by an N-Terminal Peptide of Bovine Lactoferrin and Its Acylated Derivatives

Hiroyuki WAKABAYASHI,† Hiroshi MATSUMOTO,* Koichi HASHIMOTO,* Susumu TERAGUCHI, Mitsunori TAKASE, and Hirotoshi HAYASAWA

*Nutritional Science Laboratory and *Biochemical Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., 5-1-83 Higashihara, Zama, Kanagawa 228-8583, Japan*

Received December 16, 1998; Accepted January 15, 1999

Bovine lactoferrin (LF) and lactoferricin B (LFcin B), an antimicrobial peptide derived from bovine LF, inhibited thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) formation in a iron/ascorbate-induced liposomal phospholipid peroxidation system. The inhibition of TBARS formation occurred with N-acylated 9-mer peptides with a core sequence of LFcin B and, compared to LFcin B, their antioxidant effect was clearly observed at a concentration almost 100 times lower.

Key words: lactoferrin; lactoferricin; antioxidant; TBARS; acylation

Lactoferrin (LF), an iron-binding protein belonging to the transferrin (TF) family, is present in many exocrine secretions of mammals and in the secondary granules of neutrophils. It has a variety of biological activities *in vitro* and *in vivo* including antimicrobial activity, immunomodulatory effects, and antioxidant activities.[1,2] Antimicrobial peptides much more effective than LF were found to be generated upon digestion of this protein with gastric pepsin or other aspartic proteinases.[3] The active peptides of human LF (lactoferricin H) and bovine LF (lactoferricin B, LFcin B) were isolated, sequenced, and found to be derived from the homologous N-terminal regions of the molecules.[4] Later, it was reported that both LFcin B and LF effectively inhibit tumor metastasis[5] as well as the LPS-induced IL-6 response in monocytes,[6] and stimulate IL-8 release from neutrophils.[7] Other studies have shown that an N-terminal region of the LF molecule overlapping the LFcin sequence is responsible for the antimicrobial activity of LF[8] and the binding of LF to several biological substances and cells.[9,10] LFcin may be a peptide or a region with the integrated functions of LF.

Previous studies have shown that LF inhibits lipid peroxidation[11,12] with an assay system of liposomal phospholipid peroxidation induced by Fe^{3+} ion and ascorbic acid. The mechanism of lipid peroxidation in this system could be assumed as follows. Fe^{3+} is reduced to Fe^{2+} by ascorbic acid (a), where LF chelates Fe^{3+} in a noncatalytic form, and thereby blocks this and the following reactions. When Fe^{2+} is present, O_2 produces O_2^- or H_2O_2, and H_2O_2 and LOOH (lipid hydroperoxide) are converted to HO· and LO·, respectively (b)(c).[13,14]

(a) Ascorbic acid $+ Fe^{3+} \rightarrow$ Dehydroascorbic acid $+ Fe^{2+}$

(b) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$

(c) $LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$

These products eventually yield cytotoxic lipid aldehydes, detected as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) or malonedialdehyde (MDA). Matsue *et al.* reported that LF hydrolysates treated with proteases such as pepsin, as well as LF, inhibit MDA formation in a solution containing DNA, bleomycin, and Fe^{2+} or ascorbic acid.[15]

We studied the effects of LFcin B on TBARS formation in the iron/ascorbate-induced liposomal phospholipid peroxidation system, because LFcin is likely to be a multi-functional peptide, but it does not have the iron-binding motif of LF. In addition, 9-mer peptides from LFcin B were chemically acylated to confer hydrophobicity and were tested for antioxidant activity in an effort to develop more potent peptide derivatives.

Bovine LF was produced by Morinaga Milk Industry Co. (Tokyo, Japan) and its iron-saturation was almost 14%. LFcin B was prepared from bovine LF pepsin hydrolysate as described previously.[4] Using a 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy and solid-phase methodology, peptides were synthesized on a 4-(2′,4′-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl) phenoxyacetamido-ethyl resin or preloaded HMP resin (Perkin-Elmer Japan Co. Applied Biosystems Division, Chiba, Japan) using an automated synthesizer (433A, Perkin-Elmer). For N-acylation of the peptides, the resin was treated with the desired fatty acid activated *in situ* as a HOBt/HBTU ester. Crude peptides were purified by reverse-phase HPLC. The synthesized peptides are shown in Table 1. Assay of TBARS formation was done by the method of Gutteridge[16] with some modifications. Liposomes were prepared by vigorous agitation of a mixture consisting of 5 mg/ml egg yolk lecithin in 10 mM HEPES and 0.15 M NaCl (pH 7.4) for 5 min at 37°C under oxygen-free nitrogen and the mixture was then left at 4°C for 1 h. The supernatant in 0.5-

† To whom correspondence should be addressed. Hiroyuki WAKABAYASHI, Fax: +81-462-52-3049; E-mail: Hiroyuki_Wa@msn.com

Abbreviations: LF, lactoferrin; LFcin, lactoferricin; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; MDA, malonedialdehyde; SOD, superoxide dismutase

ml portions was dispensed into a number of tubes. Then, 50 μl of 112 μM $FeNH_4(SO_4)_2$, 50 μl of 532 μM ascorbic acid, and 100 μl of test compound solution were added to the tubes followed by vigorous mixing for 5 s. The samples were incubated at 37°C for 1 or 2 h. Three ml of 2.9 M HCl containing 1.0% sodium arsenite was added to each tube. The tubes were mixed and centrifuged at 2,500g for 15 min, 3 ml of the clear supernatant was carefully removed and added to 1 ml of 1% thiobarbituric acid in 0.05 M NaOH, and each sample was heated for 15 min in a boiling water bath. After cooling, the turbidity was removed by filtration, and TBARS formed in each sample was measured photometrically at 532 nm. Statistical analysis was done using the unpaired two-tailed t test to compare two groups.

Effects of LF-related compounds on TBARS formation were assayed in the system of liposomal phospholipid peroxidation during 2 h of incubation (Fig. 1). Fe^{3+} ion and ascorbic acid added to this system caused considerable TBARS formation. In the presence of Fe^{3+} and ascorbic acid, LF and a positive control, DL-α-tocopherol, had an inhibitory effect on the reaction as shown in previous studies.[11,12] LFcin B also decreased the levels of TBARS formation with a lesser effectiveness compared with that of LF.

To examine the effects of LFcin-derived peptides on oxidation reactions, the synthesized peptides shown in Table 1 were tested. Table 2 shows the effects of these peptides and reference compounds on TBARS formation during 1 h of incubation. DL-α-tocopherol and two metal-chelating agents, o-phenanthroline and Quin 2, had significant inhibitory effects, while an O_2^- scavenging agent, SOD, had a promotive effect in this system. Among the peptides synthesized, LFcin B(14–25), a peptide corresponding to the C-terminal half of LFcin B with few cationic amino acids, increased TBARS formation. On the other hand, N-terminal acylated analogs of the 9-mer core region of LFcin B effectively inhibited the reaction and their activity was evident at a concentration almost 100 times lower than that shown by LFcin B. The inhibitory effectiveness of these peptides appeared to be dependent on the carbon chain length of the acyl group, with those with longer carbon chains showing higher effectiveness. An acylated D enantiomer derivative of LFcin B(4–12)-NH_2 inhibited the reaction with the same effectiveness as the corresponding L isomer peptide. Another cationic antimicrobial peptide tested as a

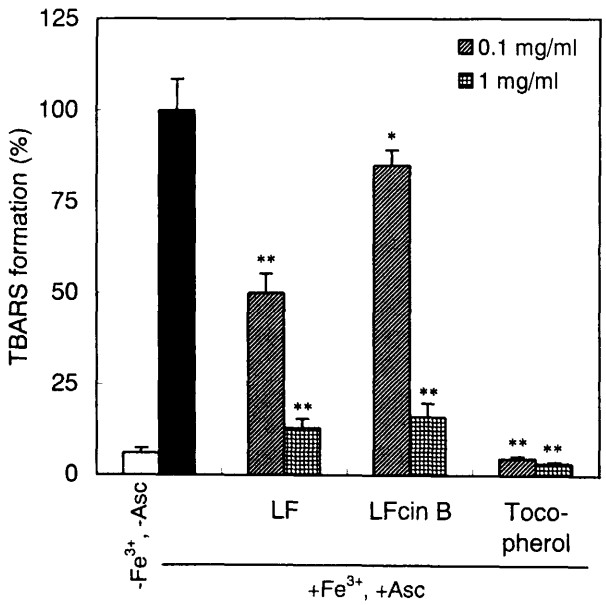


Fig. 1. Effects of LF and LFcin B on TBARS Formation from Liposomal Phospholipids.

Test compounds were incubated with Fe^{3+} ions and ascorbic acid (Asc) in a liposomal system for 2 h. The TBARS formed was measured photometrically at 532 nm and the results are presented as mean ± SD of 5 tests in percent relative to the control containing only Fe^{3+} ions and ascorbic acid. The data were statistically analyzed comparing control values and values obtained in the presence of the indicated concentrations of each test agent. *$P<0.05$, **$P<0.005$.

Table 1. Structures of the Peptide Derivatives Used in This Study

Peptide name	Structure
LFcin B	**FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF**
LFcin B(14–25)	**GAPSITCVRRAF**
Acyl6-(4–12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_4CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl10-(4–12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_8CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl14-(4–12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{12}CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl16-(4–12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{14}CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
Acyl18-(4–12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_{16}CO$-**RRWQWRMKK**-NH_2
D(4–12)-NH_2	D-(**RRWQWRMKK**)-NH_2[a]
Acyl10-D(4–12)-NH_2	$CH_3(CH_2)_8CO$-D-(**RRWQWRMKK**)-NH_2[a]
Ac-RRWWCR-NH_2[b]	CH_3CO-**RRWWCR**-NH_2

Peptides were chemically synthesized except for LFcin B which was purified from a pepsin hydrolysate of bovine LF.

[a] D indicates D enantiomer derivative from the peptide.

[b] Reference from [17].

Table 2. Effects of LFcin-derived Peptides and Reference Compounds on TBARS Formation

Compounds	TBARS formation (%) at indicated concentration (mg/ml)			
	0.001	0.01	0.1	1
LFcin B	ND[a]	ND	93.1	25.2
LFcin B(14–25)	ND	ND	129.9	159.9
Acyl6-(4–12)-NH_2	102.5	88.1	45.1	12.7
Acyl10-(4–12)-NH_2	96.0	40.8	13.3	8.1
Acyl14-(4–12)-NH_2	92.0	40.8	9.8	12.1
Acyl16-(4–12)-NH_2	91.0	37.3	10.4	12.1
Acyl18-(4–12)-NH_2	83.8	24.3	11.3	14.6
D(4–12)-NH_2	ND	ND	85.5	83.3
Acyl10-D(4–12)-NH_2	89.3	49.5	13.9	7.7
Ac-RRWWCR-NH_2	ND	ND	64.6	10.2
DL-α-Tocopherol	49.5	16.7	6.4	4.2
o-Phenanthroline	27.7	31.6	16.9	11.5
Quin 2	47.6	7.3	6.7	6.1
SOD	99.0	109.4	119.5	115.2

Test compounds were incubated with Fe^{3+} ions and ascorbic acid in a liposomal system for 1 h. The resulting TBARS formed was measured photometrically at 532 nm and the results are presented as a percent relative to the control containing only Fe^{3+} ions and ascorbic acid.

[a] ND: not determined.

reference compound, Ac-RRWWCR-NH_2,[17] also inhibited TBARS formation.

In this study, LFcin B and LF had similar antioxidant effects, consistent with those shown in other biological activities.[5-7] This supports the hypothesis that the LFcin region is a multi-functional domain of LF. One molecule of LF binds two Fe^{3+} ions at binding sites different from the LFcin region. However, it has been reported that LF effectively solubilizes excess Fe^{2+} ions in test solutions, suggesting binding of higher numbers of Fe^{2+} ions to LF[18] and that LF pepsin hydrolysate inhibits Fe^{2+}-induced MDA formation in a DNA and bleomycin system.[15] These findings imply that LFcin B interacts with Fe^{2+} ions not in a strict chelating manner and inhibits lipid peroxidation. Matsue *et al.* proposed that LF also binds ascorbic acid and this is one of the antioxidant mechanisms of LF in the iron/ascorbate-induced oxidation system.[15] To clarify the antioxidant mechanism of LFcin B, investigations involving interactions of the peptide with iron ions or ascorbic acid are necessary. As a reference peptide, a cationic antimicrobial peptide Ac-RRWWCR-NH_2 was tested and inhibited TBARS formation. This peptide has been identified as the most potent 6-mer antimicrobial peptide in synthetic peptide combinatorial libraries[17] and shares sequence similarity with RRWQWR in LFcin B. We adapted hydrophobic motifs to a highly cationic sequence, RRWQWRMKK, of LFcin B and examined the activity. The N-acylated peptides examined significantly inhibited TBARS formation. Acylation of the peptide may result in a higher affinity for liposomal phospholipids. A number of physiologically important peptides and proteins are known to have a covalently linked fatty acid which is often essential for their biological activity and for stable associations with cellular membranes.[19,20] It has been reported that introducing an acyl group into a non-acylated peptide led to strong interaction with a phospholipid membrane.[21] Our observations revealed a novel biological role for acylated peptides.

References

1) Brock, J., Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol. Today*, **16**, 417-419 (1995).
2) Lönnerdal, B. and Iyer, S., Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.*, **15**, 93-110 (1995).
3) Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., and Kawase, K., Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, **74**, 4137-4142 (1991).
4) Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M., Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1121**, 130-136 (1992).
5) Yoo, Y.-C., Watanabe, S., Watanabe, R., Hata, K., Shimazaki, K., and Azuma, I., Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 184-190 (1997).
6) Mattsby-Baltzer, I., Roseanu, A., Motas, C., Elverfors, J., Engberg, I., and Hanson, L. Å., Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr. Res.*, **40**, 257-262 (1996).
7) Shinoda, I., Takase, M., Fukuwatari, Y., Shimamura, S., Köller, M., and König, W., Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 521-523 (1996).
8) Li, Y. M., Tan, A. X., and Vlassara, H., Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. *Nature Med.*, **1**, 1057-1061 (1995).
9) Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J., and Spik, G., Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.*, **312**, 839-845 (1995).
10) Legrand, D., Mazurier, J., Elass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J., and Spik, G., Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry*, **31**, 9243-9251 (1992).
11) Gutteridge, J. M. C., Paterson, S. K., Segal, A. W., and Halliwell, B., Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochem. J.*, **199**, 259-261 (1981).
12) Shinmoto, H., Dosako, S., and Nakajima, I., Anti-oxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induced lipid peroxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 2079-2080 (1992).
13) Nakano, M. and Sakurai, T., Lipid peroxidation by chelated iron compounds. *Yukagaku*, **39**, 784-790 (1990).
14) Halliwell, B., Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs*, **42**, 569-605 (1991).
15) Matsue, M., Matsuyama, J., and Kiyosawa, I., Interaction of lactoferrin with ascorbate and the relationship with bleomycin-dependent DNA damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 358-362 (1995).
16) Gutteridge, J. M. C., The measurement of malondialdehyde in peroxidised ox-brain phospholipid liposomes. *Anal. Biochem.*, **82**, 76-82 (1977).
17) Houghten, R. A., Pinilla, C., Blondelle, S. E., Appel, J. R. Dooley, C. T., and Cuervo, J. H., Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, **354**, 84-86 (1991).
18) Nagasako, Y., Saito, H., Tamura, Y., Shimamura, S., and Tomita, M., Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution. *J. Dairy Sci.*, **76**, 1876-1881 (1993).
19) Towler, D. A. and Gordon, J. I., The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 69-99 (1988).
20) Branton, W. D., Rudnick, M. S., Zhou, Y., Eccleston, E. D., Fields, G. B., and Bowers, L. D., Fatty acylated toxin structure. *Nature*, **365**, 496-497 (1993).
21) Niidome, T., Okamoto, K., Kawakami, R., Ohmori, N., Mihara, H., and Aoyagi, H., Interaction of lipophilized mastoparan with phospholipid membranes. *Pept. Chem.*, **33**, 217-220 (1996).