

〔原 著〕

ヒトラクフェリンがヒト単球系細胞の ケモタキシスに与える影響

湯本 泰弘, 中島 啓介, 藤原 純, 池田 雅美, 小鷲 悠典

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

Effects of human lactoferrin on the chemotactic response of human monocytic cells

Yasuhiro YUMOTO, Keisuke NAKASHIMA,
Jun FUJIWARA, Masami IKEDA, Yusuke KOWASHI

Department of Periodontology and Endodontology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Human lactoferrin (hLf) has been reported to inhibit lipopolysaccharide (LPS) interaction with CD14 by suppressing TNF- α production of LPS-stimulated monocytes. However, it is unclear whether hLf affects the chemotaxis of monocytes. The present study investigated the effects of hLf on the monocyte chemotactic response to LPS. Human monocytic cells, THP-1, were cultured in RPMI1640 medium in the presence (treated) or absence (untreated) of 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ (100 nM) for 24 hr. The THP-1 cells were then washed and transferred to the upper chamber set in a 24-well culture plate; the medium in the lower chamber contained either formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP; 100 nM), LPS from *Escherichia coli* (10 ng/ml), or purified hLf (200 μ g/ml). Following a 1-hr incubation, the membrane on the floor of the upper chamber was removed and stained with Diff-Quik® to measure the absorbance at 595 nm. Quantification of the chemotactic response of cells was made by calculation of the chemotactic index (absorbance in the presence of chemoattractants/ absorbance in the absence of chemoattractants). Cell growth was monitored with Alamar Blue®. The TNF- α and LDH levels in the culture supernatant were also measured. In the untreated cells, the mean chemotactic indices of fMLP, LPS, and hLf were 3.78, 3.19, and 1.75, respectively. The indices of fMLP + hLf and LPS + hLf were 3.30 and 2.09. Similar results were observed in the treated cells. Cell growth was not affected by the addi-

受付: 平成16年3月30日

tion of fMLP, LPS, or hLf. The TNF- α and LDH levels in culture supernatant increased as a result of the introduction of LPS ; however, the elevated levels were reduced by the addition of hLf. These findings suggest that hLf suppresses by the neutrophils is bound to LPS, which leads to the inhibition of TNF- α release and the chemotactic response to LPS.

Key words : Lactoferrin, Chemotaxis, Monocyte, THP-1, CD14

緒 言

生理学的抗菌物質として知られるヒトラクトフェリン (hLf) は、分子量約80 kDaで692アミノ酸残基からなる鉄結合糖蛋白質で、乳汁、涙、唾液などの外分泌液あるいは好中球の二次顆粒などに広く分布している。好中球由来のhLfは生体内で感染や炎症が生じると大量に放出される。最近、hLfがグラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) と結合することによりその生物学的活性を抑制することが報告され、宿主防御因子の一つとして注目されている¹⁻⁵⁾。

歯周炎は歯面あるいは歯根面に沈着したプラークによって発症し、細菌と感染防御機構との間の相互作用によって増悪、緩解を繰り返しながら進行する。その炎症性反応は、プラーク中に存在する歯周病原性細菌およびその構成成分の一つであるLPSが歯周ポケット上皮を通過し歯肉に入り込むことにより惹起される。炎症性反応に伴い産生された炎症性メディエーターにより毛細血管の透過性が亢進し、白血球が組織内に限らず歯周ポケット内にまで遊走することが知られている。歯周ポケット内の歯肉溝滲出液 (GCF) 中および歯周組織には毛細血管から浸出してきたそれら炎症性細胞の他に好中球由来のhLfが存在している。1980年代から、歯周病研究の領域でもGCF中のhLf量と歯周病の病態との関連性について研究がされてきた。Smithら⁶⁾は成人性歯周炎患者では健常者に比較してGCF中のhLf量が多いことを報告したが、hLfは好中球中の二次顆粒に存在するため歯周ポケッ

トにおける好中球の簡便なマーカーとして考えられてきた。また、1990年代になってからはKalfasらの研究グループが、歯周病細菌へのhLfの結合⁷⁾、歯周病原性細菌の線維芽細胞あるいは上皮細胞への付着に対するhLfの影響⁸⁾、歯周病原性細菌によるhLfの分解⁹⁾などについて報告している。しかしそのhLfが白血球の走化性に与える影響や、歯周病原性細菌由来のLPSと結合し生物学的活性に与える影響については未だ不明な点が多い。

本研究では、宿主防御機構において重要な役割を果たしている単球の化学走化性 (ケモタキシス) にhLfが与える影響を解明することを目指した。

材料および方法

1. 供試細胞株と培養方法

供試細胞株として、ヒト骨髓単球性白血病細胞株THP-1 (ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク、大阪、日本) を使用した。細胞はRPMI1640培地 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A) に非働化ウシ胎仔血清 (FCS ; Gibco) を10%添加し、ペニシリンGカリウム (100 U/ml, 明治製菓、東京) および硫酸ストレプトマイシン (100 μ g/ml, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A) を含む培地 (10% FCS 添加 RPMI 1640 培地) を使用し37°C, 5%CO₂存在下で培養した。

2. 試薬

hLfとして精製ヒトラクトフェリン (ICN Pharmaceuticals, Inc., Aurora, OH, U.S.A) を使

用した。走化因子のポジティブコントロールとして Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP; Sigma), LPSとして*Escherichia coli* (O 111:B 4) 由来LPS (Sigma) を使用した。また, THP-1 細胞表層のCD14発現促進のために $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (活性型ビタミン D_3 ; Sigma) を使用した。

3. 測定法

1) 培養上清中TNF- α 量および乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の測定

1×10^6 個/mlに調整したTHP-1 細胞に hLf (200 μ g/ml) あるいはLPS (10 ng/ml) をそれぞれ単独あるいは同時に添加し, 24時間37°C, 5%CO₂存在下で培養した。1,000 \times gで10分間遠心操作を行った後, 培地上清中TNF- α 量およびLDH活性をそれぞれヒトTNF- α ELISAキット (BioSource International, Camarillo, California, U.S.A) およびCytotoxicity detection kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を使用して測定した。

2) 細胞増殖測定

1×10^6 個/mlに調整したTHP-1 細胞に hLf (200 μ g/ml) あるいはLPS (10 ng/ml) を単独あるいは同時に添加し, 24時間37°C, 5%CO₂存在下で培養した。培地にアラマブルー (和光純薬, 大阪) を10 μ l 添加し4時間37°C, 5%CO₂存在下で培養し, その後に測定波長570 nm, 参照波長600 nmで吸光度を測定し細胞数を測定し細胞増殖の指標とした。

3) 化学走化性 (ケモタキシス) の測定

あらかじめ活性型ビタミン D_3 を培地に添加することでCD14発現を増強させた活性化THP-1 細胞および未添加の非活性化THP-1 細胞を各々 1×10^6 個/mlとなるように調整した。ケモタキシスチャンバーとして24穴トランスウェル (Corning Inc,

NY, U.S.A), 培地としてRPMI1640にヒト血清アルブミン (Sigma) を1%添加したものを使用した。上部チャンバーに 1×10^6 個/mlに調整したTHP-1 細胞を入れ, 下部チャンバーに走化因子としてfMLP (100 nM), hLf (200 μ g/ml) あるいはLPS (10 ng/ml) を単独あるいは同時にに入れて1時間37°C, 5%CO₂存在下で培養した。培養後, メンブレンを貫通している細胞をディフクイック (国際試薬, 神戸) を用いて染色し, 595 nmにおける吸光度を測定した。化学走化性は, ケモタキシスインデックス (CI; 走化性因子存在下での吸光度/走化性因子非存在下での吸光度) を用いて評価した。

4. 統計処理

測定値間の比較は分散分析により行い, 危険率5%未満を有意と判定した。

結 果

1. hLf添加による培養上清中TNF- α 量およびLDH活性への影響

THP-1 細胞培養系にhLfを単独で添加してもTNF- α 産生量は変化しなかった (図1)。TNF- α 産生量はLPSを添加すると有意に (約100倍) に増加したが, LPSと同時にhLfを添加するとLPSを単独で添加した場合と比較して有意に (約2/3) 減少した。LDH活性はTHP-1 細胞培養系にhLfを単独で添加すると有意に減少した (図2)。また, LDH活性はLPSを単独で添加すると有意に (約2倍) 上昇したが, LPSと同時にhLfを添加するとLDH活性の上昇は約1.5倍にとどまった。

2. hLf添加による細胞増殖への影響

THP-1 細胞培養系にhLfあるいはLPSを添加することにより細胞増殖の抑制傾向が認められたが, 統計学的有意差は認められなかった (図3)。

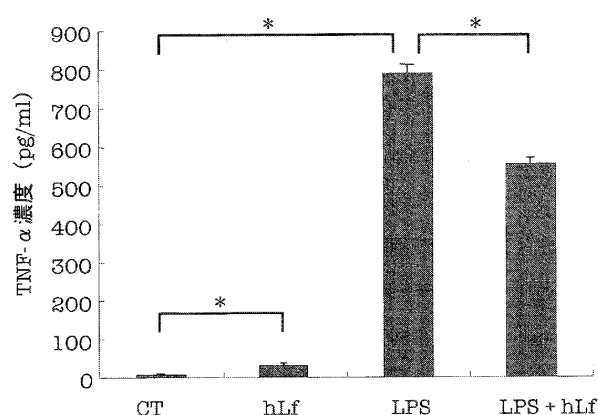


図1 hLfがTNF- α 産生に与える影響
CT: 対照群, hLf: ヒトラクトフェリン (200 μ g/ml), LPS: *E.coli*由来リポ多糖 (10 ng/ml)
* $p < 0.05$

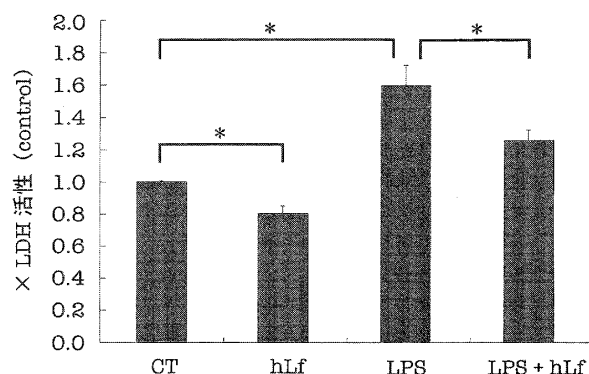


図2 hLfがLDH活性に与える影響
CT: 対照群, hLf: ヒトラクトフェリン (200 μ g/ml), LPS: *E.coli*由来リポ多糖 (10 ng/ml)
* $p < 0.05$

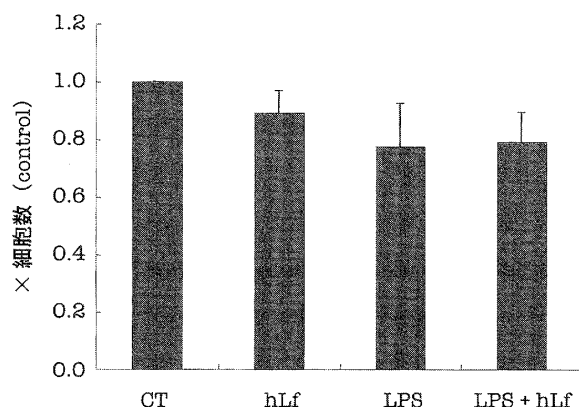


図3 hLfが細胞増殖に与える影響
CT: 対照群, hLf: ヒトラクトフェリン (200 μ g/ml), LPS: *E.coli*由来リポ多糖 (10 ng/ml)

3. hLf添加によるケモタキシスへの影響

非活性化THP-1細胞（活性型ビタミンD₃非添加）においては、hLfを単独で添加するとCIが有意に増加した（図4）。また、fMLP, LPSを各々単独で添加するとCIが有意に増加した。fMLP, LPS各々とhLfを同時に添加するとCIはfMLPでは有意に変化しなかったが、LPSでは有意に減少した。

活性化THP-1細胞（活性型ビタミンD₃添加群）においては、コントロール群のCIが非活性化細胞の約4倍に上昇した（図5）。hLfを単独

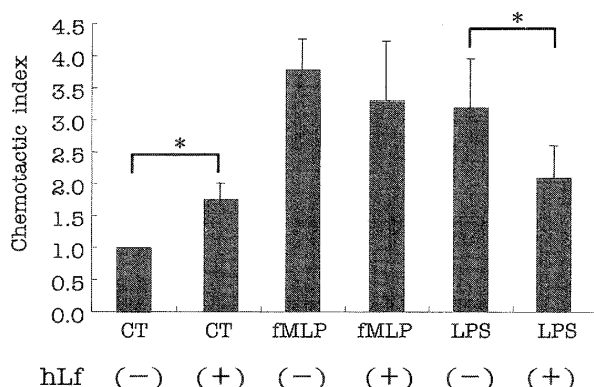


図4 hLfがケモキシスに与える影響（ビタミンD₃非添加群）
CT: 対照群, hLf: ヒトラクトフェリン (200 μ g/ml), fMLP: ポジティブコントロール (100 nM), LPS: *E.coli*由来リポ多糖 (10 ng/ml)
* $p < 0.05$

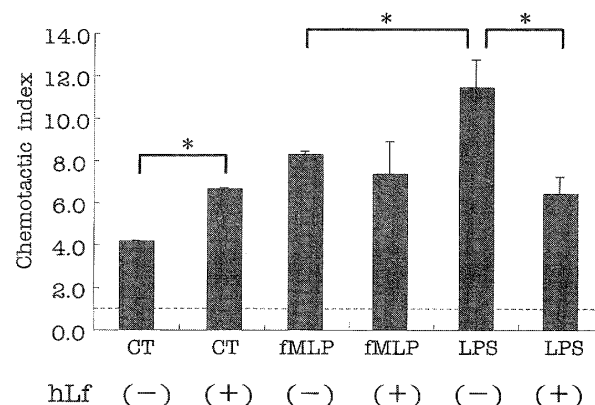


図5 hLfがケモキシスに与える影響（ビタミンD₃添加群）
CT: 対照群, hLf: ヒトラクトフェリン (200 μ g/ml), fMLP: ポジティブコントロール (100 nM), LPS: *E.coli*由来リポ多糖 (10 ng/ml) (波線はビタミンD₃非添加群における対照群のCIを表す) * $p < 0.05$

で添加するとCIは有意に増加した。fMLP, LPSを各々単独で添加するとCIはコントロール群に比べ有意に増加した。非活性化細胞と異なり, LPSを添加した場合はfMLPを添加した場合に比べて有意に高いCIを示した。非活性化細胞の場合と同様に, fMLP, LPS各々とhLfを同時に添加するとCIはfMLPでは有意に変化しなかったが, LPSでは有意に減少した。

考 察

TNF- α は, 細菌由来のLPS刺激により単球・マクロファージなどから産生され局所での起炎症反応, 細胞障害反応, アポトーシスなどを引き起こし, 炎症においてその発症と病態の進行および修復において重要な役割を果たすと考えられている。特にTNF- α の重要な作用の一つである破骨細胞の活性化とそれに伴う骨吸収は, 歯周病の進行に大きく関与している¹⁰⁻¹³⁾。

本研究では, まず, hLfの添加がLPS刺激によりTHP-1細胞から産生されるTNF- α に影響を与えるか検討した。その結果, 1) THP-1細胞培養系にhLfを添加してもTNF- α 産生量に大きな変化は認められなかった, 2) LPSを添加するとTNF- α 産生量は約100倍に増加した, 3) LPSと同時にhLfを添加するとTNF- α 産生量はLPS単独添加時と比べて有意に減少した, という所見が得られた。これらの結果はChoeらの報告と一致している¹⁴⁾。Assumaらは実験的歯周炎モデルにおいてTNF- α に対するアンタゴニストを用いることによって炎症性反応や骨吸収を抑制したと報告している¹⁵⁾。また, Stashenkoらは歯周病患者において健康な部位と比べて炎症のある歯周組織では有意にTNF- α の量が高かったと報告している¹⁶⁾。さらに, Robertsらは慢性の成人性歯周炎において健康な歯周組織と比べて炎症のある歯周組織では有意にTNF- α のmRNA発現量が高かったと報告している¹⁷⁾。これらのことから, hLfの添加により認められた

THP-1細胞からのTNF- α 産生抑制は, 歯周組織における炎症反応を軽減している可能性が示唆された。

本研究では, THP-1細胞培養系にhLfを添加するとLDH活性が抑制された。LPSと同時にhLfを添加するとLPS単独添加時と比べて有意にLDH活性が抑制された。これらの所見から, hLfには細胞死を抑制する作用がある可能性も考えられた。Valentiらは, 感染実験においてラクトフェリンで細胞を前処理することによりアポトーシスを抑制したと報告している¹⁸⁾。Lamsterらは歯周ポケットが深くなるにつれてGCF中のLDH活性が上昇することを報告している¹⁹⁾。Smithらは成人性歯周炎患者では健常人と比べてGCF中のLDH活性が高いことを報告している⁶⁾。また, Wolffらは歯周炎における細菌学的・臨床学的視標が悪化するに比例してGCF中のLDH活性が上昇することを報告している²⁰⁾。本研究の結果とこれまでの報告を考えあわせると, hLfがLPSの作用を緩和することにより過剰なTNF- α 産生および細胞死を抑制し歯周病原細菌に対する宿主防御機構の一翼を担っている可能性が示唆された。

hLfが細菌や真菌, ウイルスなどの増殖・成長を抑制する報告は多く見られる。しかし細胞増殖に与える影響については様々で, 成長を促進したり抑制したりと研究に用いる細胞により異なっている²¹⁻²³⁾。本研究ではTHP-1細胞の成長・増殖にhLfが与える影響を調べた。THP-1細胞にhLfあるいはLPSを単独で, LPSおよびhLfを同時に添加し, 28時間後に細胞増殖に与える影響を調べたが, 有意差は認められなかった。これらの所見から, hLfはTHP-1細胞ではその増殖に影響を与えず, 細胞毒性の観点からhLfは生体に対して安全であることが示唆される。今後は, さらなる安全性を確認するために他の様々な細胞を用いてこれを検証する必要があると考えられた。

グラム陰性菌の細胞膜に由来するLPSは、生体に対し毒素活性を示すことにより様々な炎症性反応を引き起こす²⁴⁾。細菌により感染した生体内局所ではサイトカインが産生され、白血球が遊走して炎症が惹起される。走化性因子には、非常に強力なfMLPのような細菌性蛋白質やペプチド、そして宿主の走化因子であるケモカイン（特にIL-8）、ロイコトリエンB₄などの好中球産生分子、及び補体系の活性化に由来する分子（C5a）などがある。感染部位への白血球の遊走は炎症の第一段階であり、生体免疫の上で重要な役割を果たしている。近年、LPSが単球やマクロファージを活性化する機序についての研究が広くなされてきた。LPS binding protein（LBP）は炎症の急性期に血清中に多く認められるLPS結合タンパクである²⁵⁾。LPSのリピドAにLBPが結合しLPS・LBP複合体として単球・マクロファージの細胞膜表層に存在するCD14に作用することが解明された。CD14はLPS受容体として免疫学的に重要な役割を担い、活性型ビタミンD₃の刺激によりその数が増加することが報告されている²⁶⁾。Provvediniらは前駆体単球は活性型ビタミンD₃刺激によって単球やマクロファージへ分化することを報告した²⁷⁾。Rigbyらは単球を活性型ビタミンD₃で刺激すると単球の様々な生物学的活性を増幅させることを報告した²⁸⁾。これらの報告から本研究では活性型ビタミンD₃によって活性化した状態でのケモタキシスの測定も宿主免疫機構を反映する上で重要であると考えた。本研究では、活性型ビタミンD₃添加により活性化したTHP-1細胞では、非活性化細胞に比べ対照群で約4倍ケモタキシスが亢進しており、全体的なケモタキシスの亢進が認められた。この所見は、活性型ビタミンD₃で20時間前処理を行うとfMLPによる単球のケモタキシスを増加させ、また化学誘引物質がなくてもケモタキシスが亢進するというGirasoleらの報告と一致す

る²⁹⁾。特に、LPS添加群においてその傾向が強く認められた。活性型ビタミンD₃刺激によりCD14分子とfMLP受容体が発現することが知られている³⁰⁾。活性化THP-1細胞では、非活性化細胞と異なりLPS添加群のCIがfMLP添加群より有意に高かったことから、活性型ビタミンD₃刺激によりCD14分子がfMLP受容体より影響を受けやすい可能性が示唆された。また、活性型ビタミンD₃添加群においてもhLfを添加することによりLPS添加群のケモタキシス亢進は抑制されたが、fMLP添加群には影響を与えなかったことから、hLfはfMLP受容体には影響を与えない可能性が示唆された。

本研究の結果から、hLfは通常は単球のケモタキシスを促進している可能性が示唆された。単球にはLfの受容体が存在することが知られており^{31,32)}、これらの受容体が単球のケモタキシスに関与している可能性も示唆される。従って、今後はhLfが単球に作用する機序や、細胞内でのシグナル伝達について詳しく調べる必要があると考えられる。一方、LPS存在下ではhLfは単球のケモタキシスを抑制している。hLfはLPSのリピドAに結合することが報告されており¹⁾、LBPのアンタゴニストとして働くことによりLPS・LBP複合体の形成を阻害していることが示唆され、結果的にLPSがCD14に結合するのを阻害しケモタキシスを抑制している可能性が考えられる。この抑制的な作用機序は本研究におけるLPS刺激によるTNF- α 産生および細胞死の抑制においても同様のことが考えられる。今後、CD14を介してのLPSシグナル伝達にhLfが与える影響や、最近研究が盛んに行われてるLPSの別の受容体であるToll-like receptorにあたえるhLfの作用についても詳しく検証する必要があると考えられる。

結 論

1. THP-1細胞にLPSを単独で添加すると、

培養上清中のTNF- α 濃度およびLDH活性が有意に上昇した。LPSと同時にhLfを添加すると、TNF- α 濃度およびLDH活性は有意に低下した。

2. THP-1細胞にLPSあるいはhLfを単独で添加しても細胞増殖には影響が認められなかった。

3. THP-1細胞にfMLPあるいはLPSを単独で添加するとケモタキシスの亢進が認められた。活性型ビタミンD₃により活性化した細胞に、LPSを添加するとfMLPを添加した場合よりもさらにケモタキシスを亢進させた。

4. hLfはfMLP添加によるケモタキシスの亢進には影響を与えなかったが、LPS添加によるケモタキシス亢進は有意に抑制した。活性型ビタミンD₃によりTHP-1細胞が活性化し表層のCD14分子の発現が増強されると、hLf添加による抑制効果はさらに著明になった。

以上の結果より、好中球から放出されるhLf自身は単球のケモタキシスを促進するが、歯周ポケット内のような環境ではLPSによる過剰なケモタキシス亢進を抑制し宿主防御機構に参与している可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、終始、本研究において御指導を頂きました故小鷺悠典教授に心より感謝を申し上げます。

文 献

- Appelmek BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J and Nuijens JH : Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* : 2628-2632, 1994.
- Caccavo D, Afeltra A, Pece S, Giuliani G, Freudenberg M, Galanos C and Jirillo E : Lactoferrin-lipid A-lipopolysaccharide interaction : inhibition by anti-human lactoferrin monoclonal antibody AGM10. *Infect Immun* : 4668-4672, 1999.
- Elass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J and Spik G : Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* : 486-491, 1998.
- Miyazawa K, Mantel C, Lu L, Morrison DC and Broxmeyer HE : Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells. *J Immunol* : 723-729, 1991.
- Wang D, Pabst KM, Aida Y and Pabst MJ : Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin. *J Leukoc Biol* : 865-874, 1995.
- Smith QT, Au GS, Freese PL, Osborn JB and Stollenberg JL : Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* : 466-475, 1992.
- Kalfas S, Andersson M, Edwardsson S, Forsgren A and Naidu AS : Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. *Oral Microbiol Immunol* : 350-355, 1991.
- Alugupalli KR, Kalfas S, Edwardsson S, Forsgren A, Arnold RR and Naidu AS : Effect of lactoferrin on interaction of *Prevotella intermedia* with plasma and subepithelial matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol* : 174-179, 1994.
- Alugupalli KR and Kalfas S : Degradation of lactoferrin by periodontitis-associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett* : 209-214, 1996.
- Thomson BM, Mundy GR and Chambers TJ : Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* : 775-779, 1987.
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD and Mundy GR : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumor necrosis factors. *Nature* : 516-518, 1986.
- Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR and Roodman GD : Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res* : 113-118, 1989.
- Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR and Roodman GD : Tumors producing human tumor necrosis factor induced hypercalcemia and osteoclastic bone resorption

- in nude mice. *Endocrinology* : 1424–1427, 1989.
14. Choe YH and Lee SW : Effect of lactoferrin on the production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *J Cell Biochem* : 30–36, 1999.
 15. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S and Graves DT : IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* : 403–409, 1998.
 16. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J and Socransky SS : Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* : 504–509, 1991.
 17. Roberts FA, McCaffery KA and Michalek SM : Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res* : 1833–1839, 1997.
 18. Valenti P, Greco R, Pitari G, Rossi P, Ajello M, Melino G and Antonini G : Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes* : protective effect of lactoferrin. *Exp Cell Res* : 197–202, 1999.
 19. Lamster IB, Harper DS, Fiorello LA, Oshrain RL, Celenti RS and Gordon JM : Lysosomal and cytoplasmic enzyme activity, crevicular fluid volume, and clinical parameters characterizing gingival sites with shallow to intermediate probing depths. *J Periodontol* : 614–621, 1987.
 20. Wolff LF, Smith QT, Snyder WK, Bedrick JA, Liljemark WF, Aeppli DA and Bandt CL : Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. *J Clin Periodontol* : 110–115, 1988.
 21. Amouric M, Marvaldi J, Pichon J, Bellot F and Figarella C : Effect of lactoferrin on the growth of a human colon adenocarcinoma cell line—comparison with transferrin. *In Vitro* : 543–548, 1984.
 22. Hagiwara T, Shinoda I, Fukuwatari Y and Shimamura S : Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem* : 1875–1881, 1995.
 23. Wolf JS, Li D, Taylor RJ and O'Malley BW, Jr. : Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* : 245–249, 2003.
 24. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, Schmidt G, Mamat U, Grimmecke HD, Kusumoto S and et al. : The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* : 169–190, 1993.
 25. Tobias PS, Mathison JC and Ulevitch RJ : A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem* : 13479–13481, 1988.
 26. Antal-Szalmas P, Strijp JA, Weersink AJ, Verhoef J and Van Kessel KP : Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* : 721–728, 1997.
 27. Provvedini DM, Deftos LJ and Manolagas SC : 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ promotes *in vitro* morphologic and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiation into macrophages. *Bone* : 23–28, 1986.
 28. Rigby WF : The immunobiology of vitamin D. *Immunol Today* : 54–58, 1988.
 29. Girasole G, Wang JM, Pedrazzoni M, Pioli G, Ballotta C, Passeri M, Lazzarin A, Ridolfo A and Mantovani A : Augmentation of monocyte chemotaxis by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. Stimulation of defective migration of AIDS patients. *J Immunol* : 2459–2464, 1990.
 30. Polla BS, Werlen G, Clerget M, Pittet D, Rossier MF and Capponi AM : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces responsiveness to the chemotactic peptide f-Met-Leu-Phe in the human monocytic line U937 : dissociation between calcium and oxidative metabolic responses. *J Leukoc Biol* : 381–388, 1989.
 31. Birgens HS : The monocytic receptor for lactoferrin and its involvement in lactoferrin-mediated iron transport. *Adv Exp Med Biol* : 99–109, 1994.
 32. Birgens HS, Hansen NE, Karle H and Kristensen LO : Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br J Haematol* : 383–391, 1983.