

NK 活性を増強する乳成分の探索研究

順天堂大学医学部免疫学講座：竹田 和由
(現所属：順天堂大学大学院医学研究科 研究基盤センター 細胞機能研究室)

要 旨

発癌や癌転移、ウイルス感染症の初期防御において重要だとされている Natural Killer 細胞(NK 細胞)の活性が、乳の飲用により影響されるかを検討した。BALB/c マウスに3週間、脱脂粉乳、全脂粉乳、またはクリームを経口投与し、脾臓細胞の細胞傷害活性(NK 活性)、無刺激での IFN- γ 産生量、抗マウス CD3 抗体を用いた T 細胞活性による IFN- γ 産生量を比較検討した。その結果、脱脂粉乳では NK 活性の増強が見られなかったが、全脂粉乳またはクリームの経口投与により NK 活性の増強が観察された。体重の推移に有意な差が無かったことから、この NK 活性の増強は栄養状態の差によるものではないと考えられた。NK 活性の変化に 관련된 IFN- γ 産生の変化は認められなかった。興味深い事に、クリーム中に含まれる何らかの成分が NK 活性を増強することが示唆された一方で、クリームと脱脂粉乳の併用投与がクリーム単独投与よりも有意に NK 活性を増強させた。以上の結果から、乳(全脂粉乳)の飲用で NK 活性が増強することが示され、その主な有効成分はクリームに含まれることが示唆されたが、乳として摂取することで、より NK 活性を増強させる効果が高まることが示唆された。

緒 言

Natural Killer 細胞(NK 細胞)は自然免疫系に属する細胞傷害活性を有するリンパ球で、発癌サーベイランス、癌の転移抑制、ウイルス感染時の初期防御に当たる細胞として広く認知されており、NK 細胞の活性化は発癌やウイルス感染の予防となることが知られている¹⁻⁴⁾。また最近では、ヨーグルトや乳酸菌飲料の摂取が NK 細胞の細胞傷害活性(NK 活性)を増強するとの報告に基づき⁵⁻⁸⁾、ヨーグルトや乳酸菌飲料の摂取による NK 活性の増強が感染症予防効果を発揮する可能性が広く一般の注目を集めている^{9,10)}。

牛乳にも免疫活性化成分が含まれる可能性が考えられ、その候補として、ホエイタンパク、カルシウム、ビタミン・ミネラル等が上げられている¹¹⁾。しかし、乳に含まれる脂肪酸の28.9%を占めるとされるオレイン酸に関しては、NK活性を抑制するとの

報告¹²⁾と、有意な抑制効果はない¹³⁾という報告があり、牛乳の飲用がNK活性に及ぼす影響には未だに結論が出されていない¹⁴⁾。

本研究では、マウスに脱脂粉乳や全脂粉乳等を経口投与し、脾臓細胞のNK活性の変化、NK活性に深くかかわるIFN- γ 産生の変化を調べ、牛乳の飲用がNK細胞の活性に影響を与えうるか検討した。

実験方法

1. 実験動物

6週令のBALB/c Wild type マウスを日本チャールズリバー（神奈川県横浜市）から購入後、1週間の馴化飼育を行った後にゾンデを用いて下記の試料を3週間経口投与した。全ての実験は、「動物愛護及び管理に関する法律」「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づく順天堂大学動物実験等管理規則および関係する法令を遵守し、倫理委員会の承認を得て行った。

2. 実験試料と投与方法

実験系1では、蒸留水、10%脱脂粉乳、10%脱脂粉乳とタンパク質量を合わせた13.3%全脂粉乳、10%脱脂粉乳とカロリー量を合わせた7.4%全脂粉乳を各0.4ml毎日3週間、ゾンデを用いて経口投与した。栄養成分表をもとに計算した各投与物100mlの栄養成分（単位はg）とエネルギー（単位はkcal）は表1のとおりである。

実験系2では、蒸留水、10%脱脂粉乳、3.3%クリーム、10%脱脂粉乳および3.3%クリームを各0.4ml毎日3週間、ゾンデを用いて経口投与した。栄養成分表をもとに計算した10%脱脂粉乳、3.3%クリームの100mlあたりの栄養成分（単位はg）とエネルギー（単位はkcal）は表2のとおりである。

実験に使用した全ての試料は、株式会社 明治 研究本部 食機能科学研究所より供与を受けた。

3. 分析方法

マウスから脾臓を摘出し、赤血球を溶血して脾臓細胞を得た。その後、NK細胞感受性のYAC-1細胞を標的細胞として4時間クロム遊離試験を通法に従って行い、脾臓細胞の細胞傷害活性を調べた^{6, 15)}。

脾臓細胞を 10% heat-inactivated 牛胎児血清 (JRH Bioscience, KS, USA) と 2 mM l-グルタミン (和光純薬、大阪)、25 mM NaHCO₃ (和光純薬)、5 x 10⁻⁵ M 2-merucaptoethanol (和光純薬) を添加した RPMI1640 medium(日水製薬、東京)で 2.5 x 10⁶ cells/ml に調整後、96 well flat bottom plate (Corning Inc., NY, USA) に 5 x 10⁵ cells/well で播種した。抗マウス CD3 抗体 (1 · g/ml) (eBioscience, CA, USA) の刺激有りと無しの条件で、5%CO₂ コンディションの加湿インキュベータを用いて 37°C で 48 時間培養した後に、その上清を採取した¹⁶⁾。採取した上清中の IFN- γ の量を、マウス IFN- γ 特異的 ELISA kit (Becton-Dickinson, MA, USA) を用いて評価した。

4. 統計解析

NK 活性値、上清中の IFN- γ 量、および体重の変化は、10 匹のマウスの平均の値を StatView 5.0 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo) を用いて Turkey Kramer test によって解析し、 $p < 0.05$ を統計的に有意差があるとした。

結果

1. これまで数多くの脾臓単核球のNK活性を測定してきたが、それらの結果に比べると、実験系 1 でのNK活性の値は全体的に低い傾向にあった。しかし、脱脂粉乳の投与では蒸留水に比べて有意なNK活性の増加は認められなかった。これに対し、全脂粉乳の投与では、13.3%全脂粉乳では全てのEffector/Target ratio (E/T ratio) で、7.4%全脂粉乳では 3点のE/T ratioで、蒸留水に比べて有意なNK活性の増強が認められた。また、脱脂粉乳との間にも、13.3%全脂粉乳と7.4%全脂粉乳の投与では E/T ratio= 100 の1点ではあるが、有意なNK活性の増強が認められた。(図 1 a)

IFN- γ の産生に関しては、無刺激では有意な増加は認められなかったが、抗 CD3 抗体で刺激した場合には、7.4%全脂粉乳で有意な IFN- γ 産生の増強が見られた。(図 1b) 実験期間における体重の推移には有意な差は認められなかった。(図1c)

以上から、全粉乳の摂取により脾臓においてNK活性が増強することと、抗原を認識した場合のT細胞によるIFN- γ の産生が増強されていることが示唆され、またこの様な免疫機能の増強は脱脂粉乳の摂取では誘導されないことが示された。これらの結果から、脱脂粉乳で欠損しているクリーム成分にNK活性および T細胞からのIFN- γ 産生を増強する物質が含まれていることが示唆され、実験系 2 に進んだ。

2. 実験系 1 では、NK活性が全体的に低い値であったため、これを改善すべくNK細胞への感受性が標準的な値を示すYAC-1細胞株を選び出した後に実験を行い、その結果、標準的な脾臓細胞のNK活性の値が得られた。

蒸留水に比べて、脱脂粉乳の投与では前回の実験系と同様にNK活性は増強されなかった。これに対し、クリーム投与では3つの E/T ratioで、脱脂粉乳とクリームの併用投与では4つ全てのE/T ratioで、蒸留水に比べて有意なNK活性の増強が見られた。また、脱脂粉乳の投与との比較では、全E/T ratioで、クリームの投与、または脱脂粉乳とクリームの併用投与により有意なNK活性の増強が認められた。興味深いことに、全E/T ratioで、脱脂粉乳とクリームの併用投与により、クリーム単独投与に比べて有意なNK活性の増強が認められた。(図 2a)

一方で、IFN- γ の産生に関しては、無刺激でも、抗 CD3 抗体で刺激した場合でも、各群間に有意な差が認められなかった。(図 2b)

実験期間における体重の推移には有意な差は認められなかった。(図2c)

以上の結果から、クリームを経口摂取することで有意にNK活性が上昇し、さらに、牛乳の摂取に近いと考えられる脱脂粉乳とクリームの同時摂取により、クリームよりもさらに強いNK活性の増強が誘導されることが示された。

考 察

今回の研究結果から、3週間の0.4 mlの10%脱脂粉乳の摂取では NK活性の増強は認められなかったが、タンパク質量またはカロリーを合わせた全脂粉乳の摂取でNK活性が増強することが示された。また、3.3%クリームの摂取でも NK活性が増強することから、その成分はクリーム中に含まれることが示唆された。

NK活性の増強は全脂粉乳または3.3%クリームの摂取で誘導されたが、無刺激な状態でのIFN- γ 産生の増強は観察されなかった。無刺激な状態でのIFN- γ 産生は生体内でのIFN- γ 産生の状態をより反映していると考えられる。また、IFN- γ はプロバイオティクスや β -グルカンの飲用によるNK活性の増強に関与していることが示されている^{6,7,15)}。従って、今回の結果は、全脂粉乳またはクリームによるNK活性の増強には、プロバイオティクス等とは異なってIFN- γ は関与せず、type I IFN等の作用によりNK活性が増強されている可能性が示唆された¹⁾。一方で、抗CD3抗体でT細胞を刺激した場合には、7.4%全脂粉乳の摂取においてIFN- γ 産生が有意に増強されていた。これは、抗

原を認識したT細胞からのIFN- γ 産生が増強されていることを示唆するものである。従って、何らかの抗原を認識したT細胞によるIFN- γ 産生が、全脂粉乳の経口摂取によるNK活性の増強に関与している可能性も考えられる。T細胞を欠損したヌードマウスや *RAG*^{-/-}マウス、さらには *IFN- γ* ^{-/-}マウスを用いての解析を行えば、さらなる情報が得られると考えられる。

乳中のホエータンパク、カルシウム、ビタミン・ミネラル等が免疫機能を増強する可能性が、これまでに示唆されている¹¹⁾。しかし、*in vitro*で乳脂肪はIFN- γ の産生を抑制すると報告されており¹⁷⁾、また、脂肪酸の内DHEやEPAを含む多価不飽和脂肪酸は免疫を低下させるとされている¹⁸⁾。さらには、牛乳中の脂肪酸の28.9%を占めるとされるオレイン酸にもNK活性を抑制するとの報告がある¹²⁾。従って、乳脂肪によるNK活性を含む免疫能の活性化に関しては否定的な報告が多く、乳脂肪は抑制的に免疫を制御するとされている。その一方で、乳中のオリゴサッカライドがTLR4を介して樹状細胞を活性化し、Th1やTh17を増殖する因子を産生させることが報告されている¹⁹⁾。この報告は、乳中のオリゴサッカライドがT細胞のIFN- γ 産生を増強することによってNK細胞を活性化させる可能性を示唆している。また、ラクトフェリンにもNK活性を増強する効果があることが報告されている²⁰⁾。これらの乳中のオリゴサッカライドやラクトフェリンは、おそらく脱脂粉乳の画分に含まれると考えられ、これらの結果は脱脂粉乳の摂取によってもNK活性が増強されることを示唆している。しかし本研究では、脱脂粉乳の経口摂取ではNK活性は増強されず、クリームに含まれる何らかの成分が単独でNK活性を増強することが示唆された。その一方で、興味深いことに、NK活性の増強の程度は、クリーム単独投与よりも脱脂粉乳とクリームを同時に投与した群の方で有意に高かった。従って、クリーム中に含まれる何らかの成分は、単独でNK活性を増強させる一方で、この成分が、オリゴサッカライドやラクトフェリン等の脱脂粉乳に含まれる成分と相互作用を起こし、立体構造の変化や消化吸収の速度の変化、体内での分解速度の低下、活性化シグナルの相乗的増強、等により、さらに強くNK活性を増強する可能性も考えられる。また、3週間に渡る投与のため、乳中の成分が腸内細菌叢に影響を与え²¹⁾、その結果としてNK活性が上がっている可能性も考えられる。

乳が免疫に及ぼす効果を調べたいいくつかの報告には、in vitroでの解析のみの報告や、乳中の成分を単離して投与した結果の報告も見受けられる。今回の研究結果は、単離した成分の投与ではなく、ある成分を欠損した乳の投与による in vivoでの解析が、乳の飲用が免疫機能に及ぼす影響に関して新しい示唆を与えうる研究となる可能性を示している。

結 語

マウスにおいて、クリーム中に含まれる何らかの物質が、全脂粉乳の経口摂取によるNK活性を増強する主成分であることが明らかにされ、さらに、全脂粉乳として摂取することで、より効果的にNK活性を増強させることが示唆された。この結果は、ヒトでも乳の飲用がNK活性を増強する可能性を示していると考えられる。また、牛乳中に含まれるNK活性を増強させる成分は単一ではなく、複数の成分が、成分間の相互作用、さらには腸内細菌叢や生体との相互作用の結果、相乗的にNK活性を増強させることも示唆された。

謝 辞

今回、研究期間内に学内での移動があり、またNK活性を測定するYAC-1細胞のNK細胞による傷害活性への感受性の低下から、当初の計画に比べ研究の遂行が遅れたことをお詫び致します。また、研究に用いた試料の提供とともに、研究の遂行にあたり貴重な御意見を頂いた、牧野聖也氏をはじめとする株式会社 明治 研究本部 食機能科学研究所の研究者の方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**, 187-376 (1989).
- 2) Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* **356**, 1795-1799 (2000).
- 3) Biron, C. A., Byron, K. S. & Sullivan, J. L. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1731-1735 (1989).
- 4) Ogata, K. *et al.* Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin. Exp. Immunol.* **124**, 392-397 (2001).
- 5) Nagao, F., Nakayama, M., Muto, T. & Okumura, K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2706-2708 (2000).
- 6) Takeda, K. *et al.* Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 109-115 (2006).
- 7) Takeda, K. & Okumura, K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *J. Nutr.* **137**, 791S-793S (2007).

- 8) Makino, S. *et al.* Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J. Dairy Sci.* **89**, 2873–2881 (2006).
- 9) Makino, S. *et al.* Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Br. J. Nutr.* **104** (2010).
- 10) Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H. & Yamada, H. Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 2246–2250 (2011).
- 11) Meydani, S. N. & Ha, W. K. Immunologic effects of yogurt. *Am. J. of Clin. Nutr.* **71**, 861–872 (2000).
- 12) Jeffery, N. M., Cortina, M., Newsholme, E. A. & Calder, P. C. Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* **77**, 805–823 (1997).
- 13) Yaqoob, P. *et al.* Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am. J. Cli. Nutr.* **67**, 129–135 (1998).
- 14) Carrillo, C., Cavia Mdel, M. & Alonso-Torre, S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutr. Hosp.* **27**, 978–990 (2012).

- 15) Yuminamochi, E., Koike, T., Takeda, K., Horiuchi, I. & Okumura, K. Interleukin-12- and interferon- γ -mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. *Immunology* **121**, 197–206 (2007).
- 16) Uno, T. *et al.* Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. *Nat. Med.* **12**, 693–698 (2006).
- 17) Zanabria, R., Tellez, A. M., Griffiths, M., Sharif, S. & Corredig, M. Modulation of immune function by milk fat globule membrane isolates. *Journal of dairy science* **97**, 2017–2026 (2014).
- 18) Rasmussen, L. B., Kiens, B., Pedersen, B. K. & Richter, E. A. Effect of diet and plasma fatty acid composition on immune status in elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 572–577 (1994).
- 19) Kurakevich, E., Hennet, T., Hausmann, M., Rogler, G. & Borsig, L. Milk oligosaccharide sialyl(a2,3)lactose activates intestinal CD11c⁺ cells through TLR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 17444–17449 (2013).
- 20) Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K. & Abe, F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J. Infect. Chemother.* **20**, 666–671, 20
- 21) Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T. & Gabrielli, O. Prebiotics in human milk: a review. *Dig. Liver Dis.* **38 Suppl 2**, S291–294 (2006).

図表と説明

表 1 : 実験系 1 で使用した 10%脱脂粉乳、13.3%全脂粉乳、7.4%全脂粉乳の栄養成分
(栄養成分 : g, カロリー : kcal)

	蛋白質	脂質	炭水化物	灰分	カロリー
10%脱脂粉乳	3.4	0.1	5.3	0.8	36.9
13.3%全脂粉乳	3.4	3.5	5.2	0.8	66.5
7.4%全脂粉乳	1.9	1.9	2.9	0.4	37.0

表 2 : 実験系 2 で使用した 10%脱脂粉乳、3.3%クリームの栄養成分
(栄養成分 : g, カロリー : kcal)

	蛋白質	脂質	炭水化物	灰分	カロリー
10%脱脂粉乳	3.4	0.1	5.3	0.8	36.9
3.3%クリーム	0.1	3.3	0.2	0.03	31.8

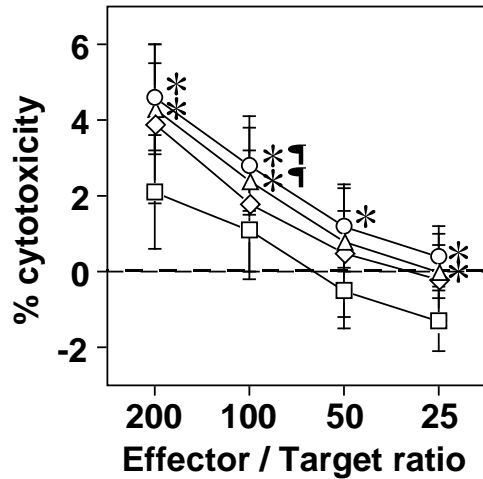


図 1 a : 蒸留水、10%脱脂粉乳、13.3%全脂粉乳、または 7.4%全脂粉乳の経口投与による NK 活性の変化

各群 10 匹の BALB/c マウスに、0.4 ml の蒸留水(□)、10%脱脂粉乳(◇)、13.3%全脂粉乳(○)、または 7.4%全脂粉乳(△)を 3 週間毎日経口投与した後、脾臓細胞の YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を、表示された effector/target ratio の条件で 4 時間の ^{51}Cr 遊離試験を行い調べた。グラフは各群における全てのマウスの脾臓細胞の細胞傷害活性の値の平均値と標準偏差を示す。*は蒸留水投与群と比較して、†は脱脂粉乳投与群と比較して、有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

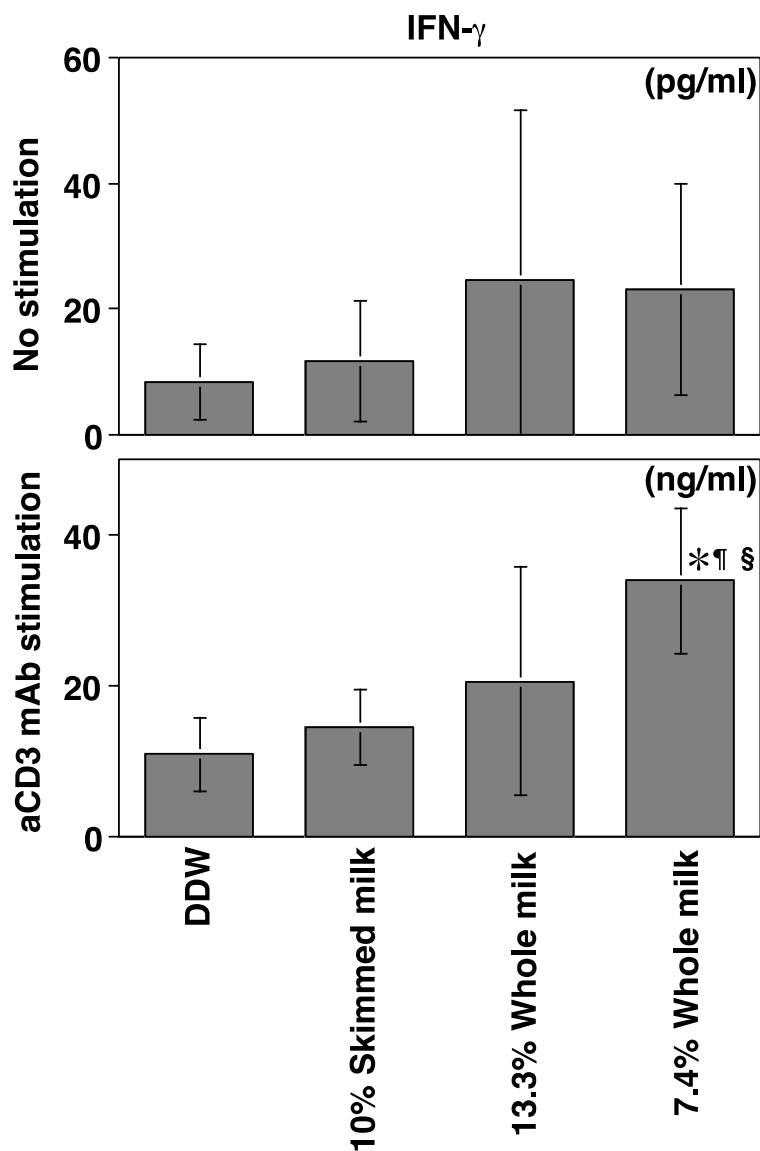


図 1b : 蒸留水、10%脱脂粉乳、13.3%全脂粉乳、または 7.4%全脂粉乳の経口投与による IFN- γ 産生の変化

図 1 a で用いた脾臓細胞を、無刺激または抗マウス CD3 抗体による刺激下で、48 時間培養し、その培養上清中に産生される IFN- γ の量を ELISA により調べた。グラフは各群における全てのマウスの脾臓細胞の培養上清中の IFN- γ の量の平均値と標準偏差を示す。*は蒸留水投与群と比較して、¶は脱脂粉乳投与群と比較して、§は 13.3%全脂粉乳と比較して有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

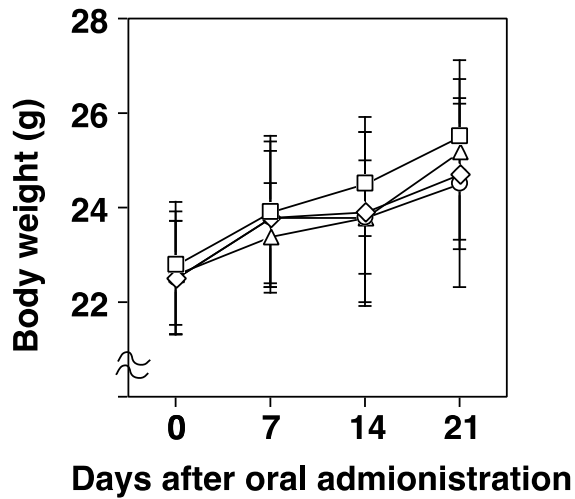


図 1c: 蒸留水、10%脱脂粉乳、13.3%全脂粉乳、または 7.4%全脂粉乳の経口投与による体重の変化

図 1 a、b で示した実験において、各実験群のマウスの体重を経口投与の初日から 7 日おきに測定した。グラフは各群における全てのマウスの体重の平均値と標準偏差を示す。蒸留水:□、10%脱脂粉乳:◇、13.3%全脂粉乳 (タンパク量一致) :○、7.4%全脂粉乳 (カロリー量一致) :△

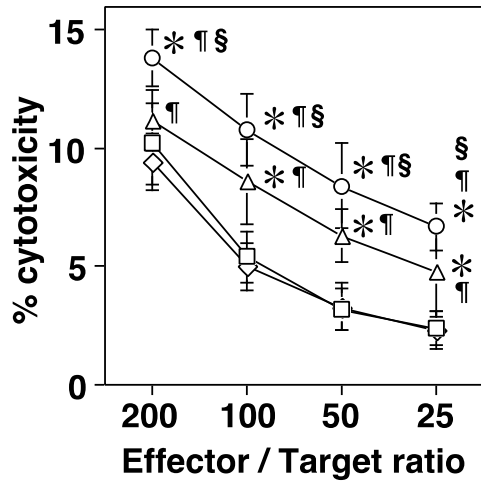


図 2a : 蒸留水、10%脱脂粉乳、3.3%クリーム、または10%脱脂粉乳と3.3%クリームの経口投与によるNK活性の変化

各群 10 匹の BALB/c マウスに、0.4 ml の蒸留水(□)、10%脱脂粉乳(◇)、3.3%クリーム(△)、または10%脱脂粉乳と3.3%クリーム(○)を3週間毎日経口投与した後、脾臓細胞の YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を、表示された effector/target ratio の条件で4時間の ^{51}Cr 遊離試験を行い調べた。グラフは各群における全てのマウスの脾臓細胞の細胞傷害活性の値の平均値と標準偏差を示す。*は蒸留水投与群と比較して、†は脱脂粉乳投与群と比較して、§は3.3%クリームと比較して有意な差($p < 0.05$)があることを示す。

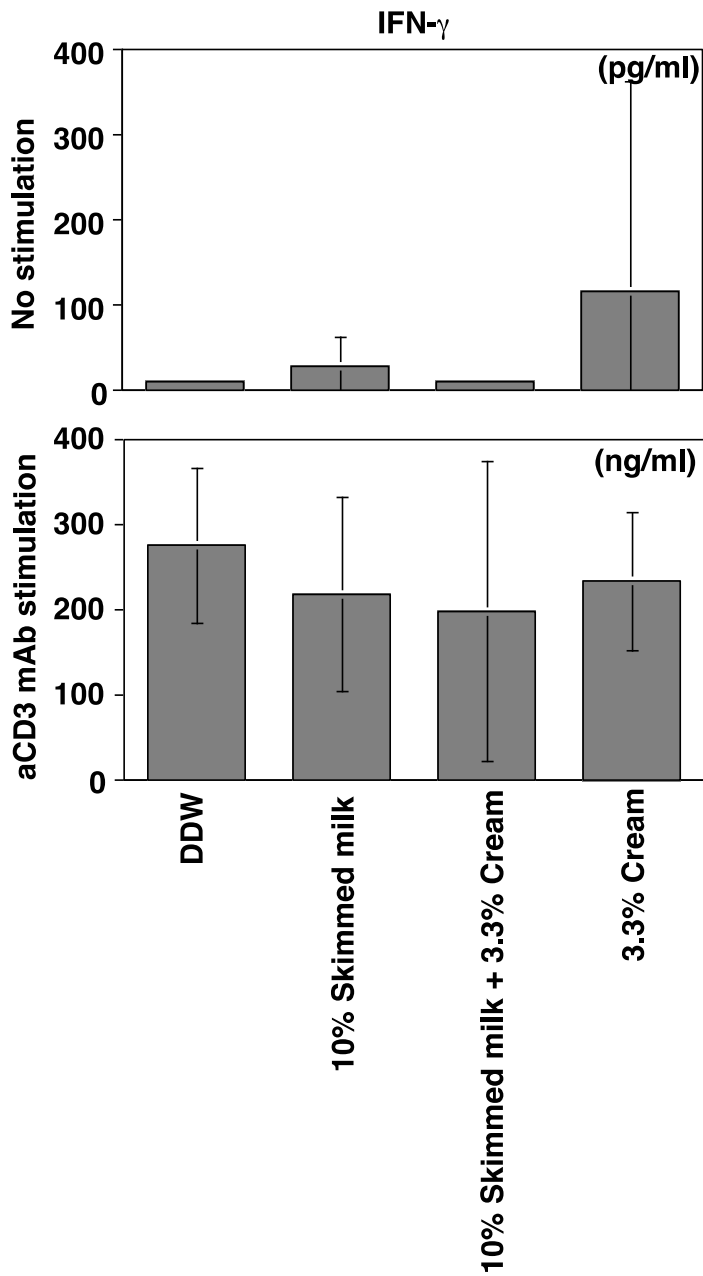


図 2b : 蒸留水、10%脱脂粉乳、3.3%クリーム、または10%脱脂粉乳と3.3%クリームの経口投与による IFN- γ 産生の変化

図 2a で用いた脾臓細胞を、無刺激または抗マウス CD3 抗体による刺激下で、48 時間培養し、その培養上清中に産生される IFN- γ の量を ELISA により調べた。グラフは各群における全てのマウスの脾臓細胞の培養上清中の IFN- γ の量の平均値と標準偏差を示す。

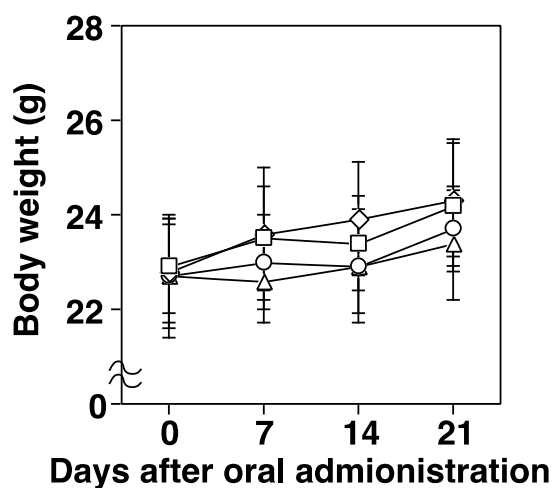


図 2c: 蒸留水、10%脱脂粉乳、3.3%クリーム、または10%脱脂粉乳と3.3%クリームの経口投与による体重の変化

図 2a、b で示した実験において、各実験群のマウスの体重を経口投与の初日から7日おきに測定した。グラフは各群における全てのマウスの体重の平均値と標準偏差を示す。蒸留水:□、10%脱脂粉乳:◇、3.3%クリーム:△、10%脱脂粉乳と3.3%クリーム:○