

牛乳・乳製品摂取が身体活動・加齢に伴う 免疫機能の変化に及ぼす影響

国立健康・栄養研究所 室長 樋口 満

近年、我が国でも高齢者の人口増加に伴い、高齢者の健康保持に関して注目が集まっている。高齢者の健康保持に運動と栄養は重要であり、運動習慣の獲得により QOL が向上することが明らかになっている。高齢者の栄養摂取は社会経済的影響が強く、一人暮らしや身体に障害をもつ高齢者は、食事が不規則になったり栄養摂取が偏ったりする傾向がみられ、特にタンパク質摂取が不足することが明らかにされている。

一方、高齢者は感染症に罹りやすくしかもワクチン投与を受けていても効きにくい。これは、加齢に伴って免疫機能が低下するためと考えられている。加齢とともに変化する免疫機能は、抗体や補体などの体液性免疫よりも、リンパ球、マクロファージなどを中心とする細胞性免疫の変化が著しいことが知られている。その中でも、リンパ球の幼若化能の低下¹⁾、成熟 T 細胞 (CD3+) の数の減少²⁾、T 細胞のうちヘルパー T 細胞 (CD4+) の割合の増加もしくは維持、また T 細胞のうちキラー T 細胞 (CD8+) の割合の減少、ヘルパー T 細胞のうち Th1 の割合の減少、Th2 の割合の増加、さらにメモリー細胞 (CD45RO) の増加、ナイーブ細胞 (CD45RA) の減少³⁾ など、T 細胞に関連する免疫機能の変化は、加齢に伴い顕著である。このような加齢に伴う T 細胞の変化は、さらに IL-2 産生の低下⁴⁾、IL-3, IL-4 産生の増加⁵⁾、IL-6 産生の増加⁶⁾ をもたすことが報告されている。以上に述べた加齢に伴う免疫機能の低下は、高齢者の栄養状態によってさらに変化することが推測できる。たとえば、開発途上国の低栄養状態での易感染症との関連についての研究では、タンパク質摂取の不足が免疫機能の低下を招くことが明らかにされている⁷⁾。そこで、免疫機能の低下した高齢者にとって良質のタンパク質摂取は、十分に考慮されなくてはならないと考えられる。

特に、牛乳・乳製品は良質なタンパク質栄養食品であるが、我が国のそれらの摂取量は極めて低く、北欧のデンマークと比較すると約 1/3 にすぎない⁸⁾。そこで本研究では、はじめに日本とデンマークの食生活の違いを考慮し、両国の高齢者のタンパク質摂取、特に牛乳・乳製品の摂取の比較を行い、その食生活の違いが高齢者の免疫機能にどのような影響を与えているかを検討した。同時に血液採取を行い、血清を凍結保存し、血清サイトカイン濃度の二国間比較をあわせて行った。さらに日本の高齢者と若年者を対象に、加齢に伴う血中サイトカイン産生に関わる免疫機能の変化を検討した。

(研究1) 日本とデンマークの高齢者の栄養状態と免疫機能の比較

(方法)

1) 対象

被験者は、今までに慢性疾患に罹患しておらず、現在投薬を受けていない70歳から85歳までの日本人男性5名と68歳から80歳までのデンマーク人男性10名である。

2) 身体計測

各被験者に対して、身長、体重、皮下脂肪厚の身体計測をおこなった。皮下脂肪厚の測定には、栄研式皮脂厚計を用い、肩胛骨下部と上腕背部の2点を計測した。体脂肪率は、長峰らの式を用いて身体密度を算出し、それを Brzek の式に当てはめ推定値を求めた。被験者の属性は、表1-1に示した。

3) 食事調査

日常の栄養状態を比較するために、平常日連続4日間の食物摂取状況を調査した。食事調査は秤量法を用いた。被験者には、調査前に方法を説明し、原則として被験者自身が秤量を記録し、秤量不能のものについては目安量を記録し、毎回の食事の写真を撮るよう指示した。被験者の記録に基づき、日本人被験者の記録については「四訂日本標準食品成分表」⁹⁾を用いて各栄養素の摂取量を算出した。デンマーク人被験者の記録は、デンマーク人管理栄養士が各栄養素の摂取量を算出した。日本人被験者の栄養所要量は『第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—』⁹⁾を、デンマーク人の栄養摂取量は『スカンジナビアの栄養所要量 (1989)』¹⁰⁾を参考に、各栄養摂取量を比較した。

4) 採血および血液サンプルの保存

早朝空腹時に肘静脈からヘパリン加採血をおこない、遠心分離した。赤血球は生理食塩水で3回洗い、再び遠心分離を行った後、同量の純水で混合し溶血させ、直ちに-80℃で凍結保存した。サイトカイン測定用には、血漿を-80℃で凍結保存した。

5) 健康状態及び栄養状態の評価

各被験者の健康状態及び栄養状態を評価するため、以下の血液生化学的指標を測定した。生化学的測定は、外部検査会社(株式会社 SRL)に委託した。検査項目は、総タンパク量、アルブミン、 γ -GTP、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、血糖値、フルクトサミン、過酸化脂質、安定型ヘモグロビン A_{1c}、以上13項目である。

6) 血中ビタミン栄養状態の測定

ビタミン B₁₂は、溶赤血球を用いて、Takeuchi らのトランスケトラーゼの TDP 添加効果法で測定した。

7) 血清サイトカイン濃度の測定

血清中の IL-6、TNF- α の濃度は、市販のサイトカインキットを用い、ELISA 法で測定した。(R & D systems, USA)

8) 統計処理

各調査項目の2群間の検定には、Mann-Whitney のU 検定を用い、危険率は5%以下とした。

(結果)

1) 身体的特徴

被験者の身体的特徴を表1-1に示した。日本の被験者と比べて、身長、体重、体脂肪率ともにデンマークの被験者のほうが有意に高値を示した。

表1-1. 被験者の年齢と身体的特徴

	デンマーク	日本	
人数 (人)	10	5	
年齢 (yr)	72.5±3.6	77.2±7.3	
身長 (cm)	177.1±8.3	160.3±5.0	**
体重 (Kg)	85.2±14.7	59.1±7.1	**
BMI(kg/m ²)	27.1±4.1	23.0±1.8	*
体脂肪率 (%)	22.7±6.3	14.1±2.2	*
	平均値±SD	*: p<0.05	**: p<0.01

2) 栄養摂取状況

1日当たりのエネルギー摂取量と各栄養素の1日のエネルギー摂取量に対する割合を表1-2に示した。1日当たりのエネルギー摂取量は、日本群とデンマーク群ではほぼ同じエネルギー摂取量であった。1日当たりのエネルギー摂取量のうちタンパク質エネルギー比は、日本群のほうがデン

表1-2. 1日当たりのエネルギー摂取量

	デンマーク	日本	
総エネルギー摂取量 (Kcal)	2209±509	2341±586	
タンパク質 (g)	67±21	93±19	*
脂質 (g)	82±21	54±20	
糖質 (g)	242±88	346±86	*
エネルギー摂取比率 (%)			
タンパク質	13±3	16±3	*
脂質	35±9	20±3	**
炭水化物	44±10	59.5±5.7	**
アルコール	9±10	2.9±4.7	
	*: p<0.05	** : p<0.01	

マーク群より有意に摂取割合が高い傾向があった。糖質エネルギー比も日本群のほうがデンマーク群より有意に摂取割合が高かった。それに対し、脂質エネルギー比は、デンマーク群のほうが日本群より有意に高かった。アルコールエネルギー比も、デンマーク群のほうが日本群より高い傾向であった。

日本群とデンマーク群の各栄養素摂取の比較を表1-3に示した。日本群の方がデンマーク群より有意に摂取量が多かった栄養素は、総タンパク質量、総糖質量、ビタミンD、ビタミンE、ナトリウム、カリウム、鉄であった。デンマーク群の方が日本群より統計的に有意に多く摂取していた栄養素は、飽和脂肪酸、レチノールであった。所要量を満たしていない項目は次の項目である。デ

表1-3. 日本群とデンマーク群の栄養摂取量の比較

		デンマーク群	日本群	
脂質				
飽和脂肪酸		34±14	13±5	**
一価不飽和脂肪酸		24±8	17±7	
多価不飽和脂肪酸		10±7	13±5	
コレステロール	g	0.3±0.1	0.4±0.2	
ビタミン				
ビタミンA	RE	1034±673	833±592	
レチノール	ug	573±482	321±338	**
ベータカロチン	ug	4541±5359	3015±2459	
ビタミンD	ug	3.6±4.4	8.2±4.9	*
ビタミンE	TE	4.4±1.6	10.1±4.6	
ビタミンB1	mg	1.2±0.5	1.2±0.4	
ビタミンB2	mg	1.6±0.6	1.6±0.4	
ナイアシン	mg	16.5±5.4	18.0±6.0	
ビタミンB6	mg	1.5±0.6	1.6±0.5	
ビタミンB12	ug	4.9±2.2	8.4±9.4	
ビタミンC	mg	97±62	151±91	
ミネラル				
Na	mg	2390±476	5398±2268	**
K	mg	2676±809	3634±970	*
Ca	mg	986±456	704±256	
Mg	mg	307±96	254±70	
P	mg	1312±503	1324±277	
Fe	mg	9.2±3.2	12.7±3.5	*
Cu	mg	346±1087	151±91	
Zn	mg	9.9±3.1	8.2±2.2	
乳類				
牛乳(g)	g	374±293	191±167	
牛乳(g)	g	318±282	160.0±185.1	
乳製品(g)	g	40±56	24±54	
バター(g)	g	16±19	0	*
平均値±SD		*: p<0.05 **: p<0.01		

ンマーク群では、ビタミン D の所要量が 5 ug に対し、3.6μg しか摂取していなかった。ビタミン E の所要量が10α-TE に対し、4.4α-TE の摂取であった。さらに、デンマーク群では鉄の所要量が10 mg に対し、9.2mg の摂取であり、亜鉛の所要量は10μg に対し、9.9μg の摂取であり、ほぼ充足したレベルに達していた。日本群において所要量を満たしていない栄養素は亜鉛であり、亜鉛の所要量が10μg に対し、8.2μg の摂取であった。

乳類は、デンマーク群の 1 日の摂取量平均値374g であるのに対し、日本群の平均値は191g であった。しかし、それぞれの群内で個人に摂取量のばらつきが大きく、両群間に有意な差は認められなかった。

3) 血液生化学的指標

血液中の栄養状態については、日本群だけ測定を行った。ただし総コレステロール、HDL-コレステロール、血糖値の 3 項目については日本群とデンマーク群を比較した。

日本群の血中栄養状態において、タンパク栄養状態の評価指標として、総タンパクとアルブミンを用いたが、それぞれの値は、 $7.5 \pm 0.7 \text{ g/dl}$, $4.4 \pm 0.3 \text{ g/dl}$ といずれも基準範囲内であり、日本群のタンパク栄養状況に異常は認められなかった。脂質代謝の指標として、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪を用いたが、日本群ではそれぞれ $184 \pm 22 \text{ mg/dl}$, $50 \pm 21 \text{ mg/dl}$, $119 \pm 71 \text{ mg/dl}$ とこれらも基準範囲内にあり、日本群の脂質代謝に異常は認められなかった。糖質代謝の指標として血糖値、フルクトサミン、グリコヘモグロビンを用いたが、日本群ではそれぞれ $125 \pm 23 \text{ mg/dl}$, $313 \pm 38 \mu\text{mol/l}$, $5.9 \pm 0.8\%$ といずれの項目も基準値より高く、全体として糖尿病傾向が認められた。日本群の尿素窒素、尿酸、クレアチニンの平均値は、いずれも基準範囲内にあり、腎機能に異常は認められなかった。日本群の γ -GTP の平均値は基準範囲内にあり、肝機能に異常は認められなかった。日本群の過酸化脂質の平均値も基準範囲内にあり、異常は認められなかった。

両群の血液生化学的指標項目の比較を表 1-4 に示した。総コレステロール、HDL-コレステロールについては、日本群とデンマーク群との比較を行った。総コレステロールは、有意な差はないものの、デンマーク群のほうが日本群より高値であった。逆に、HDL-コレステロールは、有意な差がないもののデンマーク群のほうが日本群より低値であった。日本群とデンマーク群の動脈

表 1-4. 血液生化学指標と血清インターロイキン 6 濃度

	デンマーク	日本
ヘモグロビン(g/dl)	9.0 ± 0.6	14.5 ± 0.9 **
総コレステロール(mg/dl)	193 ± 31	184 ± 22
HDLコレステロール(mg/dl)	46 ± 15	50 ± 21
血糖(mg/dl)	103 ± 22	124 ± 23
TDP効果(%)	19 ± 7	20 ± 7
血清中IL-6濃度(pg/ml)	2.0 ± 3.0	0.2 ± 0.4
	平均値±SD	**：p<0.01

硬化指数(=総コレステロール値/HDL-コレステロール)は、それぞれ 4.1 ± 1.3 , 4.5 ± 1.4 であり、デンマーク群がやや高かったが、統計的に有意な差は認められなかった。血糖値は、デンマーク群に比べ日本群は高値であった。ただし、両群に有意な差は認められなかった。

4) 血中ビタミン栄養状態

デンマーク群と日本群の血中ビタミン B_{12} をTDP添加効果で評価した(表1-4)。デンマーク群にビタミン B_{12} の潜在欠乏域にある者が1名、境界域にあるものは3名であった。日本群では B_{12} の潜在欠乏域にあるものはいなかったが、境界域にある者が5名中3名であった。

5) 血中サイトカイン濃度

静止期の抹消血中IL-6濃度は、デンマークの被験者のほうが高い傾向が認められた(表1-4)。しかし、両群に有意な差は認められなかった。TNF- α 濃度は、両群とも検出不能であった。

(考察)

日本人とデンマーク人の高齢者を対象に、連続4日間の食物摂取状況と血液中の栄養状態を調査し比較検討した。さらに、両群の血中サイトカイン濃度を比較し、栄養状態との関連を検討した。

両国の栄養所要量との比較において、エネルギー摂取量は両群とも充足しており、しかも両群に統計的な差は認められなかった。エネルギー源栄養素の摂取割合(エネルギー比率)では、デンマーク群は日本群より脂質の摂取割合が多かった。脂質のエネルギー比は、20%から25%が望ましいとされている。デンマーク群で脂質のエネルギー比が25%を越えるものは、10人中9人であったことから、デンマーク群はエネルギー摂取のバランスがかなり脂質に偏っていたと考えられる。一方日本群の脂質摂取量は、栄養所要量を満たし、脂質エネルギー比は20%であった。また、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸の摂取状況は、日本群が1:1.4:1.1で一価不飽和脂肪酸にやや偏っているもののほぼ同率であるのに対し、デンマーク群は、3.4:2.4:1の割合でかなり飽和脂肪酸に偏っていることから、デンマーク群は脂質を豊富に含む肉類、バター等の食品摂取が多い傾向が予想された。日本群はデンマーク群より糖質の摂取割合が有意に高かった。しかし、糖質のエネルギー比は50%以上がよいとされており、日本群が60%であるのに対し、デンマーク群は44%であった。以上に示したように、日本群の方がエネルギーバランスがとれている傾向が認められた。

ビタミン B_{12} 摂取量とTDP効果については、デンマーク群の1名が潜在性欠乏域を示し、境界域にあるものは、両群とも3名ずつであった。ビタミン B_{12} は、糖代謝に関与しており、糖質の摂取量が増えるとビタミン B_{12} の需要量も高まる。境界域を示した日本群の3名の糖質エネルギー比は50-61%であり、糖質の摂取量がTDP効果に影響した可能性も考えられる。しかし、デンマーク群の潜在性欠乏域にある1名と境界域にある3名はその糖質エネルギー比が33-48%であり、糖質の摂取量が影響したとは考えにくい。よって、デンマーク群はビタミン B_{12} 摂取量が少ない可能性が考えられる。

デンマーク群のヘモグロビンの平均値は、基準値の範囲より低く、日本群に比べ有意に低かった。食事調査による鉄分の摂取量からみても、デンマーク群は鉄の所要量を満たしておらず、鉄摂取量が

少ない傾向が示唆された。

デンマーク群のビタミンE摂取量は、栄養所要量を充足していなかったが、 β -カロチンやレチノールの摂取量は日本群より高く、脂溶性ビタミン摂取がビタミンEではなくAに依存している傾向が考えられる。

乳類の摂取状況は、デンマーク群が日本群より2倍摂取量が多かったが、統計的に有意な差がみられなかったのは、両群とも摂取量に個人差がみられ、両群とも食事調査を行った4日間のうち全く乳製品を摂取していない者と摂取量の非常に多いものとの幅が大きいためと考えられる。図1-1A, 1-1Bに示したように、乳類の摂取は、両群とも乳類を多く摂取しているグループとあまり摂取していないグループの2群にわかれる。このうち多く摂取しているグループではデンマーク群も日本群も

図1-1A. 乳量デンマークと日本の比較

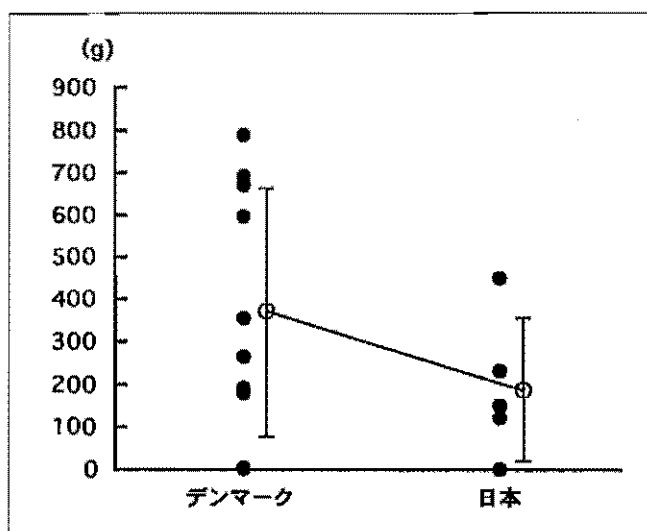
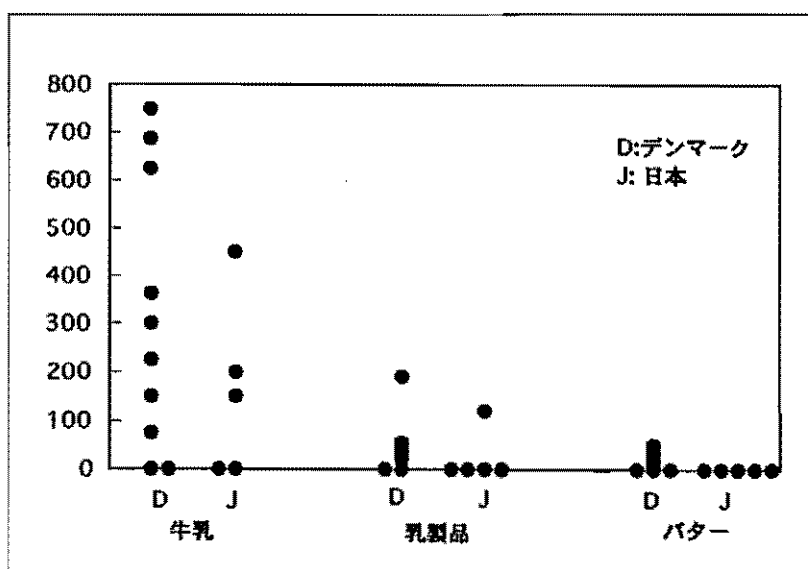


図1-1B. 品目別牛乳・乳製品摂取量



その主な摂取食品は牛乳であり、日本群5名中3名は少なくとも1日平均200g(牛乳1本分)の摂取をおこなっており、デンマーク群では1日に平均600g以上牛乳を飲んでいるものが3名いた。

デンマーク群では、乳製品の摂取量のうち摂取量の1/3はバターであったが、食事調査をおこなった4日間のうちバターを全く摂取していない者は10名中3名いた。これは、パンを主体とするデンマークの食事において、バターのかわりに植物油脂系のマーガリンが用いられてきているためと予想される。一般にバターの摂取量が多くなるとビタミンE摂取量も増すが、デンマーク群のビタミンE摂取量が低かったのは、バター以外のビタミンEを多く含む食品の摂取あるいは補給をおこなっていないためとも考えられる。

本調査において、マイトジェンなどで刺激をしていない静止期の抹消血中インターロイキン6(IL-6)濃度は、デンマークの被験者のほうが日本の被験者よりやや高い傾向が認められた。IL-6は、T細胞、マクロファージ、繊維芽細胞から分泌されるサイトカインで、様々な免疫反応とかかわっているが、特にB細胞活性化因子として知られている。また、加齢に伴い、*in vitro*で抹消血単核細胞(BMNC: Blood Mono Nuclear Cell)をマイトジェンで刺激すると、IL-2、産生は低下するが、IL-6、IL-4、IFN- γ などのサイトカイン産生は増加することが知られている。今回の調査は、日本、デンマーク両群とも静止期の血清中サイトカイン濃度を測定したため、高齢者のサイトカイン産生変化の特徴を示したこれら先行研究のような培養上清ではなかった。また、両群とも検出されたIL-6濃度は非常に微量であった。しかし、Honda M.らは、HIV感染者と36名の健常者の血清中IL-6濃度を比較した研究において、健常者であってもその血清中IL-6濃度の平均値は9.5pg/mlであり、微量ながら静止期の血清中IL-6濃度が検出されることを報告している¹⁰⁾。本研究の日本とデンマーク両群の静止期IL-6血中濃度の結果は、本田らの報告した健常者の値より低値であるものの、健常者の静止期の血清中IL-6濃度が微量ながら検出される報告と一致していた。

Lesourd B.M.は、健康な高齢者、やや栄養不良のみられる高齢者、極めて栄養不良の高齢者という栄養状態の異なる高齢者3群の免疫機能を比較し、アルブミンを指標とするタンパク質摂取状況が高齢者の免疫反応に関与することを明らかにしており、この時24時間培養後のIL-6濃度は、アルブミンレベルが低いほど低いことを報告している¹²⁾。本調査での食事摂取の両群比較では、むしろ日本の被験者のほうがデンマーク被験者に比べて有意にタンパク質摂取量は多かった。また、アルブミンレベルも日本の被験者の平均値4.4g/dlは、基準範囲(4.0-5.0g/dl)を満たしており、日本群の抹消血中IL-6濃度がデンマーク群より低かった原因が、タンパク質摂取の不足があったためとは考えにくい。むしろマイトジェン刺激のない血清中IL-6濃度は、感染症に罹患すると高まる¹³⁾ことから、デンマーク群の抹消血中IL-6濃度が日本群より高かったのは、何らかの炎症系の反応である可能性を考慮すべきかもしれない。

食事調査と血中栄養状態の結果からタンパク質以外の項目とIL-6濃度との関連をみたが、有意な相関を示す項目はなかった。しかし、加齢に伴う免疫機能のサイトカインの変化として、IL-2産生は加齢に伴って低下し¹⁾、反対にIL-6産生は増加し⁵⁾、これらサイトカイン産生の加齢に伴う変化が、

T細胞の免疫機能の変化に関与しているのではないかと考えられている¹⁴⁾。さらに Mazari L.らは、IL-6は栄養不良高齢者では年齢に関連したIL-6産生を招かない¹⁵⁾ことを報告していることから、高齢者の栄養状態とIL-6レベルとの関連を検討するうえで、今後日本の高齢者の抹消血中IL-6濃度がデンマーク被験者より低かった原因をさらに検討する必要がある。

(結論)

日本人の高齢男性5名とデンマーク人の高齢男性10名を対象に、食事調査、血中栄養状態、抹消血中のサイトカイン濃度を調査し、次の結論を得た。

1. 日本群とデンマーク群では、デンマーク群のほうが有意に身長、体重が大きいものの、一日あたりのエネルギー摂取量に差は認められなかった。
2. 日本群のエネルギー比が糖質60%、脂質20%で理想的であるのに対し、デンマーク群は糖質43%、脂質34%と、脂質に偏っており、しかも飽和脂肪酸の摂取割合が大きい特徴があることが示唆された。
3. 日本群は塩分摂取が過剰であり、一方亜鉛の摂取量が不足している傾向が認められたが、デンマーク群ではビタミンEと鉄の摂取が充足していない傾向が認められた。
4. デンマーク群は日本群に比べ、乳類の摂取量は約2倍であり、その主な摂取源は牛乳であった。
5. デンマーク群のほうが日本群より、静止期の抹消血中インターロイキン6 (IL-6) 濃度が高い傾向が認められた。

(研究2) 加齢に伴う免疫機能の変化とその血液栄養状態との関連についての検討

(はじめに)

研究1において、著者らは、栄養摂取状態が異なるデンマーク人高齢者と日本人高齢者を比較すると、血清中のIL-6濃度はデンマーク群のほうが高い傾向であったことを示した。食事の摂取量や血中栄養状態と血清中のIL-6濃度の相関がみられなかったことから、この結果は、その他の原因によってIL-6を産生するT細胞の数もしくはそのサイトカイン産生能の差が、デンマーク群と日本群の血清中のIL-6濃度の差としてあらわれたのではないかということが推測された。その原因となる可能性の一つは、血清中IL-6濃度の増加も加齢に伴って培養上清IL-6濃度が増加する免疫反応の変化と関連する可能性である。

そこで本研究は、加齢にともなったIL-6産生を増強する免疫機能がT細胞のどの機能と関連するかを明らかにするために、日常的に何も運動をおこなっておらず、栄養状態に顕著な差がないと考えられる日本人高齢者男性と若年者男性を対象に、IL-6分泌量を指標として、ヘルパーT細胞とサプレッサーT細胞のIL-6産生能を高齢者と若年者とで比較検討した。

(方法)

1. 対象

研究の対象者は、慢性疾患の病歴がなく、現在医師による病気の診断をうけていない者で、日常的に特に運動をおこなっていない、61歳から70歳までの高齢者男性6名と23歳から31歳までの若年男性6名である。実験にあたっては、被験者全員に実験の主旨を説明し参加の同意を得た。

2. 採血

採血は早朝空腹時に、安静状態で肘正中皮静脈より採取し、血中栄養状態を知るために血液学検査項目と血液生化学項目の測定用、細胞幼若化機能測定用、T細胞分離培養用にわけた。

3. 健康状態及び栄養状態の評価

各被験者の健康状態及び栄養状態を評価するため、以下の血液生化学的指標を測定した。生化学的測定は、外部検査会社(株式会社 SRL)に委託した。検査項目は、総タンパク量、アルブミン、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、血糖値、フルクトサミン、安定型ヘモグロビン A_{1c}、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、 γ -GTP、過酸化脂質、以上13項目である。

4. 白血球数と白血球球分画測定

白血球数と白血球分画の測定は、SRL(株式会社 SRL)に委託した。

5. 末梢血単核細胞(BMNC: Blood Mono Nuclear Cell)の調整

BMNCの分離は、比重勾配遠心法を用いた。LeucoSep tube (Greiner, Frickengausen, Germany)を用い、Lymphoprep 20ml (Lymphoprep Nyegaard, Oslo, Norway)にヘパリン 5 U/ml (Novo, Demark)を含む全血を加え、2800rpm, 20℃で20分間遠心した。分離させた BMNC は、1640PPMI (Gibco, Grand Island, NY, USA)で3回洗浄した。

6. マイトジェンによるリンパ球幼若化反応

BMNCを10%仔牛血清(FCS: Fetal Calf Serum)と1%抗生剤 Penicillin, Streptomycin, Glutamine (Sigma, USA)を加えた RPMI1640培地で96穴 round-bottom マイクロプレートを用い、3日間(72時間)培養した。細胞浮遊液は 3.3×10^5 とし、マイトジェンとしてフィトヘマグルチニン(PHA)を細胞浮遊液の10%加えた。培養は、37℃で5%CO₂に設定したインキューバーを用い、72時間後に³H-thymidine 0.02mLを加え、さらに24時間ハーベストした後、シンチレーターカウンター (Top count, Packard, USA)で測定した。

7. CD4+細胞とCD8+細胞の分離と培養

IL-6を産生するTh2細胞の細胞表面抗原は未だ特定されていないため、ヒト末梢血中のT細胞(CD4+とCD8+)を分画精製後培養し、その上清IL-6濃度からT細胞のサイトカイン産生能を推定する方法を用いた。BMNCは、Flow cytometry sorting法により、CD4+細胞とCD8+細胞に分離精製した。BMNCに3%FCSを加えたPhosphate-buffered saline(PBS)に浮遊させ、それぞれCD4 PE (Pharmingen, Japan)/CD8 FITC (Pharmingen, Japan), CD8 PE/CD4FITCで4℃、30分間培養後、3%FCSを加えたPBS液で2回洗浄し、Flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson Company)にて

CD4+細胞と CD8+細胞を分離精製した。精製した CD4+細胞と CD8+細胞は、リンパ球幼若化反応で用いた方法と同様に培養した。ただし、培養時間は、4 日間 (96時間) とした。CD4+細胞と CD8+細胞の培養標本の他に、BMNC の培養標本も用意し同様に培養した。それぞれ培養後は遠心沈殿をおこなったのち、上清はすぐに-80℃で保存し、サイトカイン測定用サンプルとした。

8. 細胞表面抗原の測定

採血直後に調整した BMNC は、フローサイトメトリーで測定した。BMNC を 3 %FCS を加えた PBS で 2 回洗浄し、 1.0×10^6 cells を FCS を加えた PBS 0.1ml に浮遊させ、あらかじめ抗体を加えた試験管で 4℃, 30 分間培養した。抗体の量は、抗体の種類に応じてマニュアルの推奨どおりの量を用いた。培養後、ラベルされた細胞を 3 %FCS を加えた PBS で 3 回洗浄し、ただちにフローサイトメーター (Beckton Dickinson, USA) で測定した。測定と分析のためにコンピューターソフトウェアは、Cell Quest (Beckton Dickinson, USA) を用いた。標識用の抗体は、PE (phycoerythrin) conjugated CD4 と FITC (fluorescein-isothiocyanate) conjugated CD8, CD45RA FITC, CD8PE と CD45RA FITC, CD45ROPE と CD4FITC, CD8 FITC であった。ネガティブコントロールとして、標識されていない細胞を用いた。フローサイトメーターにとりこむ細胞数を 10000 個に設定し、リンパ球とモノサイトを区別するために全細胞表示をあらかじめおこない、ゲートを決定した。分析は、CD4+ と CD8+ での CD45RA, CD45RO の発現をみた。

9. サイトカインの測定

培養後の上清を-80で保存し、IL-6 の濃度を測定した。測定は、市販されているサイトカインキットを用い、ELISA 法で測定した。(R&D systems, USA)

10. 統計処理

各調査項目の 2 群間の検定には Mann-Whitney の U 検定を用い、多群間の検定には Friedman test を用いた。危険率は 5 % 以下とした。

(結果)

1. 対象

被験者の属性を、表 2-1 に示した。被験者の体格は、若年者群の方が高齢者群より有意に身長が高かった。体重と体脂肪率は、両群に有意な差は認められなかった。

2. 健康状態及び栄養状態に関する血液生化学的指標

高齢者群と若年者群の血液生化学的指標の結果を表 2-2 に示した。総コ

表 2-1. 被験者の年齢と身体的特徴

	若齢者群	高齢者群	
数 (人)	7	6	
年齢 (歳)	27±3	65±4	**
身長 (cm)	170±4	163±5	**
体重 (kg)	67±10	61±11	
BMI(kg/m ²)	23±4	23±3	
体脂肪率(%)	20±6	20±4	
平均値±SD		**：p<0.01	

表 2-2. 血液生化学的指標

	若齢者群	高齢者群	
総タンパク(g/dl)	7.1±0.3	7.2±0.4	
アルブミン(g/dl)	4.6±0.1	4.4±0.3	
γ-GTP(IU/L)	38±30	52±44	
総コレステロール(mg/dl)	171±31	208±27	*
HDL-コレステロール(mg/dl)	52±11	80±26	*
中性脂肪(mg/dl)	93±62	71±44	
尿素窒素 (mg/dl)	14.9±4.6	14.6±2.1	
尿酸(mg/dl)	6.4±1.3	6.0±0.9	
血糖(mg/dl)	100±23	94±14	
フルクトサミン(μmol/l)	229±9	246±19	
過酸化脂質(nMol/dl)	2.5±0.7	2.3±0.4	
クレアチニン(mg/dl)	1.1±0.1	1.1±0.1	
ヘモグロビンA _{1c} (%)	4.4±0.3	4.8±0.3	
平均値±SD		*: p<0.05	

コレステロール値と HDL-コレステロール値の 2 項目は、高齢者群のほうが若年者群より有意に高かった。総タンパク量、アルブミン、中性脂肪、血糖値、フルクトサミン、安定型ヘモグロビン A_{1c}、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、γ-GTP、過酸化脂質は、高齢者群、若年者群ともに基準値範囲内にあり、両群の平均値に有意な差は認められなかった。

3. 白血球数と白血球分画

高齢者群と若年者群の白血球数と白血球分画の割合を表 2-3 に示した。高齢者と若年者では、白血球数、リンパ球数、好中球数の平均値に有意な差は認められなかった。

4. PHA によるリンパ球幼若化反応

高齢者群と若年者群の PHA によるリンパ球幼若化能の結果を、表 2-3 に示した。高齢者群と若年者群の PHA によるリンパ球幼若化能に有意な差は認められなかった。

表 2-3. 若年者群と高齢者群の白血球数とその分画

	若齢者群	高齢者群
白血球数 (cell/μl)	5629±1624	5217±1280
リンパ球数 (cell/μl)	1465±881	1424±396
好中球数 (cell/μl)	3785±818	3541±1207
		平均値±SD

5. リンパ球表面抗原の比較

CD4+T 細胞の数は、高齢者群と若年者群に有意な差は認められなかった。CD8+T 細胞の数は、

高齢者群のほうが若年者群に比べ有意に低値であった(図2-1)。CD45RO+T細胞とCD45RA+T細胞の出現割合の比(CD45RO+/CD45RA+)、CD4+分画におけるCD45RA+とCD45RO+出現割合、CD8+分画におけるCD45RA+とCD45RO+出現割合を表2-4に示した。それぞれの項目において、高齢者群と若年者群に有意な差は認められなかった。

図2-1. 若年者と高齢者のCD4+とCD8+の数

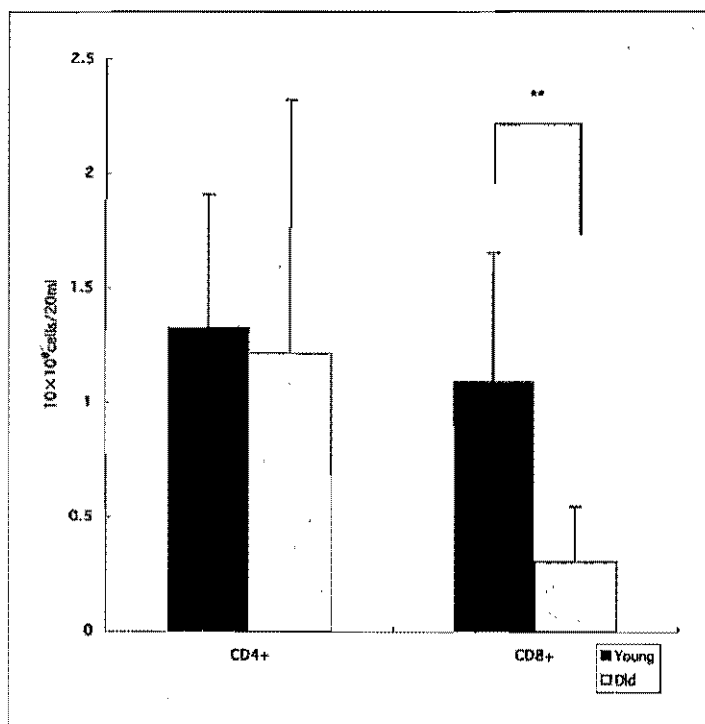


表2-4. ナイーブT細胞とメモリーT細胞の出現割合

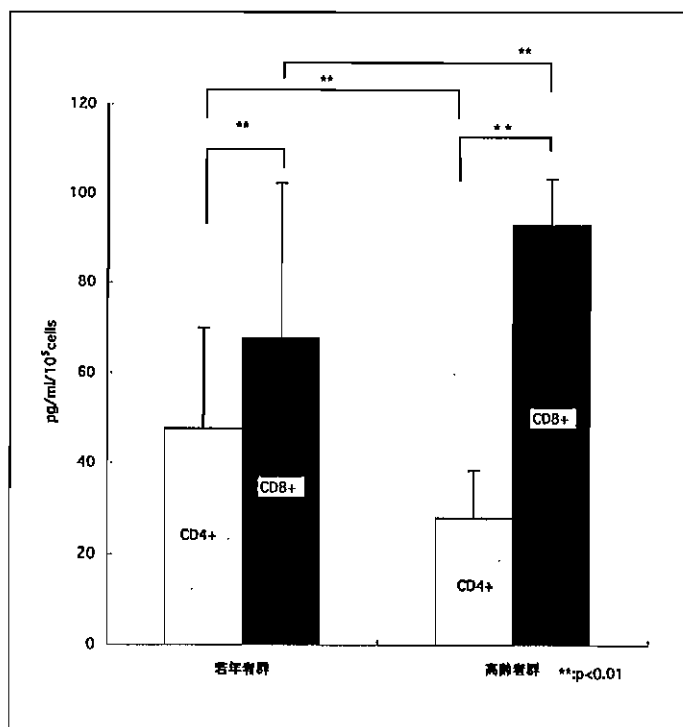
	若齢者群	高齢者群
CD45RO+/CD45RA+比	0.18±0.05	0.29±0.14
CD4+/CD45RA+ (%)	29±13	25±10
CD4+/CD45RO+ (%)	28±7	33±4
CD8+/CD45RA+ (%)	33±9	35±11
CD8+/CD45RO+ (%)	15±10	19±8
	平均値±SD	

6. サイトカイン産生

BMNC培養上清4日目のIL-6濃度は、高齢者群が826±24pg/ml/10⁶cellsで、若年者群は516±88pg/ml/10⁶cellsと高齢者群が若年者群より有意に増加した。図2-2にCD4+T細胞とCD8+T細胞の4日間培養上清IL-6濃度を示した。CD4+T細胞培養上清では、高齢者群よりむしろ若年者群のほうがIL-6濃度が高く、加齢にともなうIL-6濃度の増加傾向は認められなかった。CD8+T

細胞培養上清は、高齢者群のほうが若年者群にくらべて有意に IL-6 濃度が高く、加齢にともなう IL-6 濃度の増加傾向が認められた。CD4+T 細胞培養上清と CD8+T 細胞培養上清では、IL-6 濃度の変化について両群に統計的に有意な差が認められた。

図 2-2 . CD4+と CD8+分画の IL-6 濃度



(考察)

本研究は、加齢にともなって IL-6 産生を増強する免疫機能が T 細胞のどの機能と関連するのかを明らかにするために、日常的に特別な運動を行っておらず、栄養状態に顕著な差がないと考えられる日本人男性のうち高齢者と若年者を対象に、IL-6 分泌量を指標として、ヘルパー T 細胞とサプレッサー T 細胞の IL-6 産生能を高齢者と若年者とで比較検討した。

本研究の結果において IL-6 濃度は、BMNC 上清と CD8+ 上清は、高齢者群のほうが若年者群より有意に高く、加齢にともない IL-6 産生能が増加する傾向が認められた。しかし、両群とも IL-6 産生は、CD4+ より CD8+ での増加のほうが有意に高く、IL-6 産生能は、CD8+ 依存であることが示唆された。

最近 Wakikawa ら¹⁶⁾は、C57BL/6 マウスの脾臓の CD4+, CD8+ を分画し、マイトジェン刺激後の IL-2, IL-4, IFN- γ 産生の比率をフローサイトメトリーで算定し、IFN- γ の産生は CD8+ で顕著であるが、IL-2 と IL-4 については、CD4+ での産生が高齢群、若齢群ともに顕著であることを明らかにしている。一方、Mu XY ら¹⁷⁾は、フローサイトメトリーを用い、高齢マウス群は若齢マウス群より CD8+T 細胞の分画の IL-4, IFN- γ , TNF- α 産生が顕著であり、若齢マウス群は CD8+T 細胞の分画で IL

-2 産生の割合が顕著であったことから、CD8+T 細胞は CD4+T 細胞に比べ IL-4 と IFN- γ 産生の割合が高く、CD4+T 細胞は CD8+T 細胞に比べ IL-2 産生の割合が大きいことを報告している。

本研究では、高齢者群、若齢者群とも IL-6 産生が、CD4+より CD8+で有意に高く、IL-6 産生能は、CD8+依存であることが示された。IL-6 は、IL-4 と同じ Th2 タイプの T 細胞から分泌されるサイトカインであることから、本研究の結果は、Wakikawa ら¹⁶⁾の結果とは一致せず、むしろ Mu XY ら¹⁷⁾の結果に一致するものと考えられる。

本研究において、高齢者群は総コレステロール値と HDL-コレステロール値が若年群より有意に高かったが、両群とも基準値の範囲内にあったことから、高齢者群は総コレステロール値と HDL-コレステロール値が高いものの両群の栄養状態はほぼ一致していると考えられた。一方高齢者群と若齢者群では、白血球数、リンパ球数、PHA によるリンパ球幼若化能、メモリー T 細胞とナイーブ T 細胞の出現割合に有意な差はみられなかったが、CD8+T 細胞数は、高齢者群が有意に高値を示し、BMNC 培養 4 日目上清 IL-6 濃度も高齢者群のほうが有意に高値を示した。また、高齢者群と若年者群の血中栄養状態の各項目とこれら免疫機能測定項目では有意な相関がみられる項目がなかったことから、栄養状態の充足している高齢者群と若年者群では、白血球数、リンパ球数、PHA によるリンパ球幼若化能には顕著な差はみられないが、CD8+T 細胞の数や培養上清 IL-6 濃度は、栄養状態にかかわらず加齢にともなって増加する傾向のあることが示唆された。

Krause D. ら¹⁸⁾は、血中アルブミン、ヘモグロビン、ビタミン B₁₂、葉酸が基準値範囲にあつて、低栄養状態ではない高齢女性は、若年群と比較して PHA によるリンパ球幼若化能、T 細胞数、CD4+T 細胞数、CD8+T 細胞数には顕著な差はみられなかったことを報告している。本研究の結果でも、PHA によるリンパ球幼若化能、CD4+T 細胞数は若齢者群と比較して高齢者群に有意な差は認められなかったが、CD8+T 細胞数は高齢者群では有意に少なかった。本研究の対象が男性であり、Krause D. ら¹⁸⁾の対象と異なることから、今後高齢者の栄養状態とその免疫反応との関連を検討するうえで、男女差や日常の身体活動状況等も考慮し、さらに検討する必要がある。

結 論

本研究は、加齢にともなって IL-6 産生を増強する免疫機能が T 細胞のどの機能と関連するのかを明らかにするために、日常的に特に運動をおこなっておらず、栄養状態に顕著な差がないと考えられる日本人の高齢男性と若年男性を対象に、IL-6 分泌量を指標として、ヘルパー T 細胞とサブプレッサー T 細胞の IL-6 産生能を比較検討し、次の結論を得た。

1. 本研究の結果において IL-6 濃度は、BMNC 上清と CD8+上清は、高齢者群のほうが若齢者群より有意に高く、加齢にともない IL-6 産生能が増加する傾向が認められた。また、両軍とも IL-6 産生は、CD4+より CD8+での増加の方が有意に高く、T 細胞の IL-6 産生能は、CD8+依存であることが示された。

2. 栄養状態がほぼ同じ高齢者群と若年者群では、白血球数、リンパ球数、PHA によるリンパ球幼若化能、CD45RO+/CD45RA+に有意な差はみられないが、T細胞表面マーカーの CD4+/CD8+比と培養上清 IL-6 濃度は、栄養状態にかかわらず加齢に伴って増加する傾向のあることが示唆された。

今後の課題

デンマーク群は体脂肪率が日本群より高く、肥満傾向であった。また、エネルギー脂質比も日本群に較べて有意に高かった。肥満者は非肥満者に比べて感染症の罹患率や癌の発生率が高いことが知られている^{19,20)}が、高齢肥満者はこの変化が大きく、BMI>26.5以上の60歳以上の肥満者は、ナチュラルキラー細胞傷害活性とマイトジェンに対する幼若化能が、同年齢群の正常者および他年齢群の正常者と肥満者に比べて有意に低いことが報告されている²¹⁾。また、成熟リンパ球が増殖する際、主たるエネルギー源がグルコースであることから²²⁾、肥満者ではリンパ球においてこのグルコース利用が低下する可能性がある。したがって、デンマーク群と日本群のナチュラルキラー細胞傷害活性とマイトジェンに対する幼若化能を比較検討することで、脂質エネルギー比のこれら免疫機能に対する影響を検討することが可能となる。

デンマーク群はビタミンEの摂取量がその所要量を充足しておらず、日本群に較べても低値を示した。ビタミンEは、細胞膜のリン脂質からのアラキドン産生を抑制し、その結果プロスタグランジン E2 (PGE2) 産生を低下させることが知られている²³⁾。PGE2 は、T細胞増殖因子である IL-2 の産生を抑制する働きがあることから、ビタミンEの欠乏は加齢にともなうマイトジェンに対する幼若化能やサイトカイン産生能の変化をさらに助長する可能性が考えられる。また、ビタミンEと亜鉛は抗酸化機能をもつ食品群であって、加齢により活性酸素による細胞への障害（長年の暴露）を防ぐ機能をもつと考えられていることから、高齢者の免疫機能と関連すると考えられている。従って、デンマーク群と日本群のマイトジェンに対する幼若化能とサイトカイン産生能を比較検討することで、ビタミンEのこれら免疫機能に対する影響を検討することが可能となる。

本研究の日本群の被験者は、5人中1人はヨーグルトを毎日摂取し、3人は毎日牛乳を摂取しており、そのうち一人は毎食1本の牛乳を飲んでいて、今回の被験者集団は高齢者の中でも食事や健康に注意を払い、健康維持を心がけている集団であったといえよう。しかし乳類の摂取量は幅があり、牛乳を飲む習慣のある人となない人とで、ほぼ二つの集団に分かれることが本研究で示唆された。そこで、今後牛乳を飲む習慣のある集団と飲む習慣のない集団をわけ、その免疫機能に対する影響を検討することで、免疫機能への牛乳・乳製品の影響がより明らかになると考えられる。

本研究によって、栄養状態がほぼ同じ男性高齢者群と若齢者群では、白血球数、リンパ球数、PHA によるリンパ球幼若化能、CD45RO+/CD45RA+に有意な差はみられないが、対象者の栄養状態にかかわらず、CD8+T細胞数は加齢に伴って減少し、培養上清 IL-6 濃度は加齢にともなって増加する

傾向のあることが示唆された。また、IL-6 産生は CD8+T 細胞に依存することが示唆されたことから、高齢者の栄養状態違いがこれらの免疫反応に及ぼす影響を検討する必要がある。

高齢者にとって、免疫機能の低下は易感染症だけでなく死にも繋がりがねない重要な問題である。免疫機能は、加齢に伴って低下することが知られているが、栄養や運動習慣が、その機能低下にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど明らかにされていない。今年度の研究において、日本の高齢者男性とデンマークの高齢者男性では、その食品摂取に様々な違いがあることが明らかになった。この違いは、そのまま栄養状態の異なる集団のモデルになると考えられる。そこで、来年度においては、両国の高齢者を対象に免疫機能を調査することで、加齢に伴う免疫機能に栄養がどのような影響を及ぼすかを検討する。また、運動習慣を加味することで、加齢に伴う免疫機能に栄養と運動との両要素がどのような影響を及ぼすかを明らかにすることが可能となる。

(文献)

- 1) Nagel J.E., Chopra R.K., Chrest F.J., MaCoy M.T., Schneider E.L., Holbrook N.J., and Alder W.H., (1988) Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin stimulated cells from elderly donors. *J. Clin. Invest.* 81:1096-1102
- 2) Ales-Martinez J.E., Alvarez-Mon M., Merino F., Martinez-Ales C., Durantez A., and De La Hera A. (1988) Decreased TcR-CD3+T cell numbers in healthy aged humans. Evidence that T cell defects are masked by a reciprocal increase of TcR-CD3-CD2+natural killer cells. *Eur J. Immunol* 18:1827-1830
- 3) Cossarizaa, A., Ortotoli, C., Paganelli R., Monti D., Barbieri D., Sansoni P., Fagiolo U., Forti E., Londei M., and Fransecchi C. (1992) Age-related imbalance of virgin (CD45RA+) and memory (CD45RO+) cells between CD4+ and CD8+ T lymphocytes in humans: a study from newborns to centenarians. *J. Immunol. Res.* 4:118-126
- 4) Kubo M., and Cinadea B. (1990) Polymorphism of age-related changes in interleukin (IL) production: differential changes of T helper subpopulations, synthesizing IL-2, IL-3, and IL-4. *Eur. J. Immunol.* 20:1289-1296
- 5) Ershler W.B., Sun W.H., Binkley N., Gravenstein S.G., Volk M.J., Kamoske G., Klopp R.G., Roecker E. B., Dayners R.A., and Weindruch R. (1993) Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production modifiable by dietary restriction. *Lymphokine & Cytokine Res.* 12:225-230
- 6) Chandra R.K. (1983) Nutrition, Immunity, and Infection: present knowledge and future directions. *Lancet*; 1(8326Pt1):688-691
- 7) Danskemes Kostvaner 1995 Hovedresultater, Levnedsmiddelstyrelsen (1996)

- 8) 「四訂日本標準食品成分表」科学技術庁資源調査会編 一橋出版(1997)
- 9) 第六次改定 日本人の栄養所要量－食事摂取基準－. 平成11年6月 厚生省
- 10) 第五次改定 日本人の栄養所要 第一出版 平成6年(1995)
- 11) Honda M., Kitamura K., Mizutani Y., Oishi M., Arai M., Okura T., Igarashi K., Yasudawa K., Hirano T., Kishimoto T., Mitsuyasu R., Chermann J. C. and Tokunaga T. (1990) Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2 R in HIV-induced diseases. *J. Immunol.* 45: 4059-4064
- 12) Lesourd B.M., Mazari L. and Ferry M. (1998) The role of nutrition in immunity in the aged. *Nutrition Rev.* 56(1):S113-S125
- 13) Lesourd B.M. and Mazari L. (1997) Immune responses during recovery from protein-energy malnutrition. *Clin. Nutr.* 16(suppl. 1):37-46
- 14) 宮島篤、北村俊雄、荒井直子 サイトカインの分子生物学 羊土社 p50-53 1995
- 15) Mazari L. and Lesourd B.M. (1998) Nutritional influences on immune response in healthy aged persons. *Mechanisms of aging and development* 104:25-40
- 16) Wakikakwa A., Utsuyama M., Wakabayashi A., Kitagawa M., and Hirokawa K. (1999) Aged-related alteration of cytokine production profile by T cell subsets in mice : a flow cytometric study. *Exp. Gerontol.* 34(2):231-242
- 17) Mu X.Y. and Thoman M.L. (1999) The age-dependent cytokine production by murine CD8+T cells as determined by four color flow cytometry analysis. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 4(3):B116-123
- 18) Krause D., Mastro A.M., Handte G., Smiciklas-Wright H., Miles M.P. and Ahluwalia N. (1999) Immune function did not decline with aging apparently healthy, well nourished women. *Mechanisms of Aging and development* Vol. 112, Issue1, 43-57
- 19) Tanaka S., Inoue S., Isoda F., Waseda M., Ishihara M., Yamakawa T., Sugiyama A., Takamura Y., and Okuda K. (1993) Impaired Immunity in Obesity : Suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. *Int. J. Obes.* 17:631-636
- 20) Nieman DC., Nehlsen-Cannarella SL., Henson DA., Butterworth DE., Fagoaga OR. And Rainwater BJ. : Immune response to obesity and moderate weight loss. *Int. J. Obes.*, 20:353-360(1996)
- 21) 森口覚(1999) 運動と免疫能. *Health Digest* vol. 14 No. 2
- 22) Oka T., Moriguchi S., Oonishi K., Chikamori Aoyama M., Kitazato K. and Kishino Y. (1996) Alteration of Energy Substrates utilized by small and large thymocytes in resting and stimulating state. *Nutr. Res.* 16:841-850
- 23) 森口覚(1995)細胞性免疫能辛み多栄養と運動との関連性に関する研究. *日本栄養・食糧学会誌* 48(1):1-8