

## 「ヒト母乳とサイトカイン」

分担研究：母乳物質の人体への影響に関する研究

帝京大学

研究協力者：吉野加津哉、柱新太郎、沖津祥子

### 要約：

母乳による児の能動免疫増強ならびに母乳の抗炎症作用の機序を知るために、初乳中の interleukin 1(IL-1)、interleukin 8(IL-8)、IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)を検討した。初乳の乳漿中にはIL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-1raが検出された。IL-1raはIL-1 $\beta$ に比較して段違いに高濃度であった。初乳マクロファージはLPS刺激培養で末梢血単球と同程度のIL-1産生能を有しており、採取直後の初乳細胞にIL-8mRNAの発現が確認された。乳漿中のIL-8ならびに児の体内に侵入した初乳細胞の産生するIL-1、IL-8が児の能動免疫増強に参与する可能性が示唆される。乳漿中の高濃度のIL-1raの存在は、母乳の抗炎症作用の機序の一つかも知れない。

見だし語：colostrum、interleukin 1、interleukin 8、interleukin 1 receptor antagonist

### はじめに：

母乳は児の局所免疫を受動的に補強するのみならず、能動免疫の増強作用も示唆されている<sup>1,2</sup>。そこで、この機序を知る端緒として初乳中のIL-1 (interleukin 1)、IL-8(interleukin 8)を測定するとともに初乳マクロファージのIL-1産生能について検討した。更に、一部の初乳細胞を用いてIL-8の遺伝子発現 (messenger RNAの発現) を検討したので報告する。

一方、母乳には抗炎症的な性質があり、乳児の消化管粘膜の傷害を防御すると言われている<sup>3</sup>。近年、粘膜傷害は、TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor)や前述のサイトカインが誘因となることが明らかにされた。そこで、IL-1の作用に拮抗するIL-1ra(IL-1 receptor antagonist)に注目して、初乳中のIL-1raの測定を試みたので、合せて報告し、若干の考察を加えたい。

### 対象と方法：

1. 初乳の採取と処理：分娩後1-3日に採取

した。乳漿は500 g 15分遠沈して細胞分離後、その上清を10,000 g 10分遠心し脂肪を分離して得た。乳漿は測定まで-80℃に保存した。初乳マクロファージと母体末梢血単球は図1に示す方法にて分離調製し、直ちに使用した。

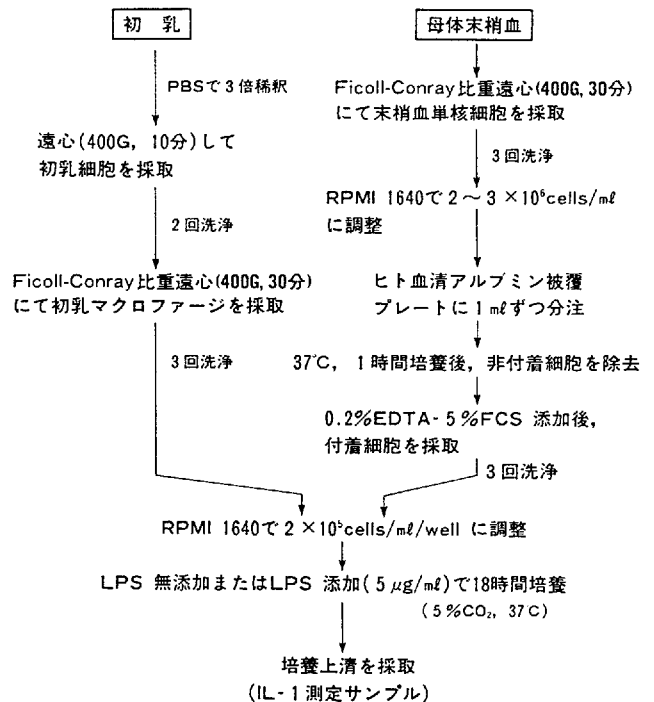


図1. Interleukin 1 (IL-1)測定サンプルの採取

PBS : phosphate buffered saline  
FCS : fetal calf serum  
LPS : lipopolysaccharide

2. 乳漿中のIL-1、IL-8の測定：IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-1ra濃度をELISAキット(Amersham社製)にて測定した。

3. 初乳マクロファージと母体末梢血単球によるIL-1産生：初乳マクロファージと母体末梢血単球を図1の如く培養し、培養上清中のIL-1活性を図2に示す如くbioassay法を用いて測定した。

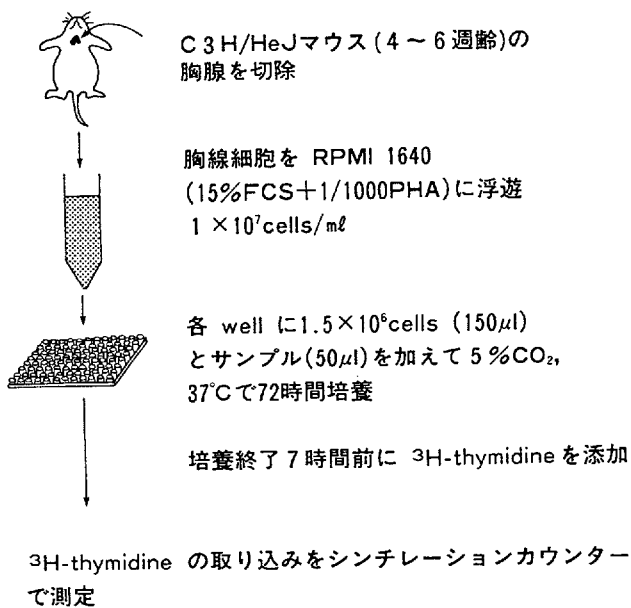


図2. Interleukin 1の測定

FCS : fetal calf serum  
PHA : phytohemagglutinin

4. IL-1 $\alpha$ 並びにIL-1 $\beta$ 活性の測定：培養上清のIL-1活性測定時に、十分量の家兎抗ヒトIL-1 $\alpha$ 抗体または抗ヒトIL-1 $\beta$ 抗体を加えて残存するIL-1活性を測定して、それぞれIL-1 $\beta$ とIL-1 $\alpha$ 活性とした。

5. 初乳細胞のIL-8 mRNA 発現の測定：母乳細胞よりRNAzolBを用いてRNAを抽出した。得られたtotal RNA量をOD 260により測定し、2 $\mu$ gをrandom primer とreverse transcriptaseによりcDNAを合成した。IL-8 primerまたはコントロールとして $\beta$ -actinのprimerと共にPCR反応を行ってそれぞれの特異的cDNAを増幅した。用いたprimerはIL-8の5'sense primerは5'-ATGACTTCCAAGGGGCCGTGGCT-3'で、3'antisense primerは5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCT-3'であり、 $\beta$ -actinの5'sense primerは5'-AACTGGGACGACATGGAGAA-3'、3'anti-sense primerは5'-ATACCCCTCGTAGATGGCA-3'である。PCR反応は94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 60秒を30回繰り返した。作成したPCR productは2% agaroseで電気泳動し、ethidium bromideで染色した。分子量マーカーとしてはPharmaciaのDRI gestを用いた。また、

IL-8のPCR productを確認するために、前述のgelをNylon N+ membraneに転写し、IL-8のcDNA probe (金沢大学 松島綱治博士より供与)を用いてSouthern blotを行なった。検出法はAmersham社のGene Imagesを使用した蛍光法による。

結果：

1. 初乳中のIL-1、IL-8、IL-1raの濃度：初乳の乳漿中のIL-1 $\alpha$ は、分娩日数にかかわらず、大部分の検体で<40pg/mlであったが、IL-1 $\beta$ は、約半数の検体で52-3075pg/mlの範囲で検出された(図3)。また、IL-8は分娩後1日で6600-34500pg/mlの範囲で顕著に検出され、経日と共に低下傾向を認めた(図4)。一方、IL-1raは1850- 81000pg/mlと高濃度に検出された(図5)。

2. 初乳マクロファージと母体末梢血単球のIL-1産生能(図6)：LPS添加または無添加にかかわらず、いずれの培養上清にもIL-1活性が認められた。LPS無添加の場合、初乳マクロファージ培養上清のIL-1活性は、母体末梢血単球のそれよりも有意に低値であった。また、LPS添加初乳マクロファ

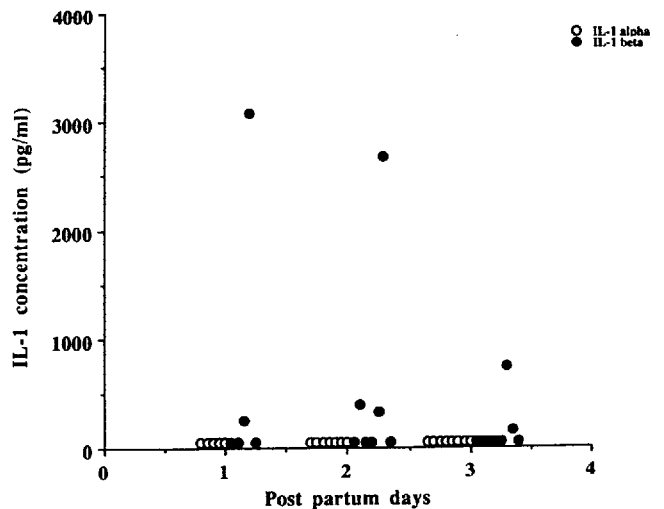


Fig. 3 IL-1 concentration in colostrum

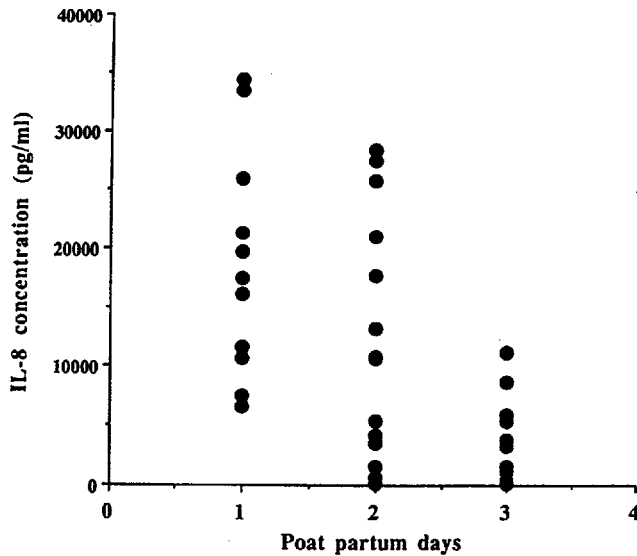


Fig. 4 IL-8 concentration in colostrum

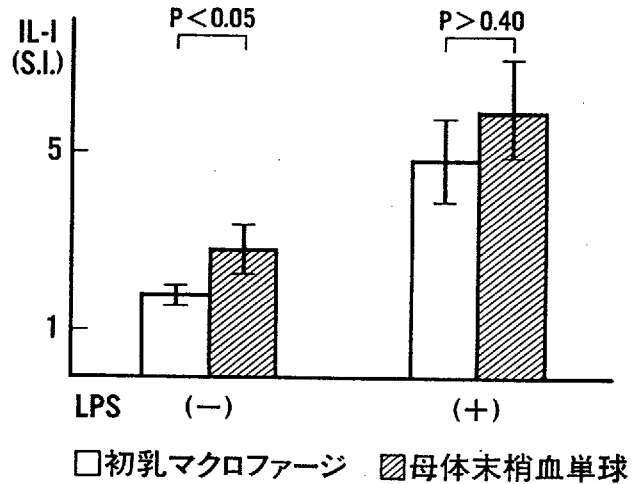


図6. 初乳マクロファージと母体末梢血単球による Interleukin 1 (IL-1) 産生

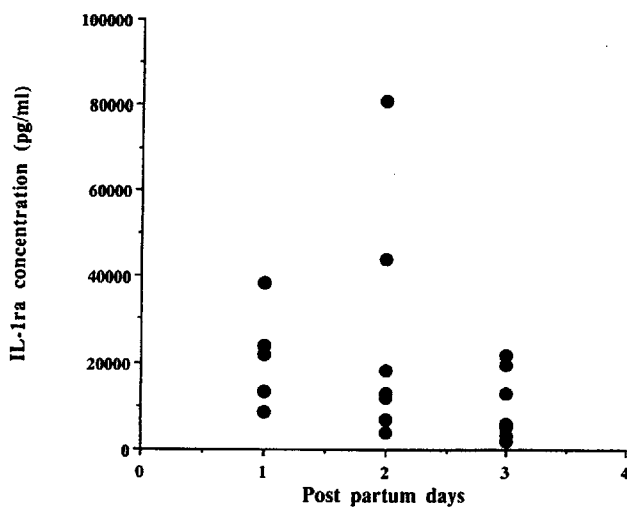


Fig. 5 IL-1ra concentration in colostrum

ージ培養上清は、母体末梢血単球のそれと同程度にIL-1活性が認められた。

3. 初乳マクロファージの産生するIL-1 $\alpha$ 並びにIL-1 $\beta$ 活性：図7に示す如く、初乳マクロファージ培養上清中のIL-1活性は、LPS添加または無添加にかかわらず、主としてIL-1 $\beta$ によるものであった。

4. 初乳細胞のIL-8 mRNAの発現 (図8)：分娩後2日と3日の初乳細胞よりRNAを抽出し、RT-PCR法を用いてIL-8のmRNAの発現を検出した。IL-8のbandの理論的長さは289bp、 $\beta$ -actinは276bpであり、マーカーの長さと比較して、IL-8相当のbpのbandを認めた。更に、IL-8 cDNA probeを用いたSouthern blot法の結果より、IL-8のPCR productのbandはIL-8特異的であることが確認された。

考案：

IL-1はT細胞、B細胞の増殖・分化や好中球の活性化を促進するなどの多様な生物学的活性を有する免疫増強因子である。その反面、量的に増加すれば、炎症を惹起する主要因子でもある。初乳の乳漿の一部にはIL-1が認められ、そのsubtypeはIL-1 $\beta$ から

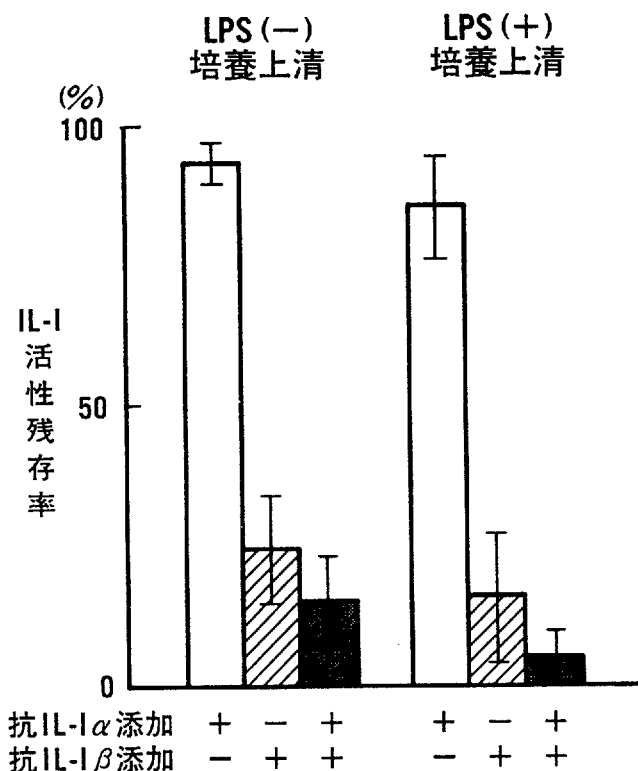


図7. 初乳マクロファージの産生するIL-1の $\alpha$ ならびに $\beta$ 活性

なっていた。これは、培養初乳マクロファージ産生のIL-1 subtypeの活性優位性がIL-1 $\beta$ にshiftしている所見と一致していると思われる。いずれにせよ、初乳中のIL-1濃度は概ね低値であることから、生体に有為な生物学的活性として働く可能性は有るものの、炎症誘発作用はないと思われる。初乳細胞は児の体内に侵入すると推測されており<sup>67)</sup>、児に侵入した後に産生したIL-1が児の能動的免疫機能を増強する可能性はある。

IL-8は、好中球の活性化因子であり、殊に、好中球のみならず、Tリンパ球の強力な走化因子でもある。IL-8の作用は、IL-1と同様に感染防御（殺菌作用）と炎症誘発作用の両面を有することも事実である。乳漿中にはIL-8が有意に認められた。2検体による予備実験ではあるが、初乳細胞にIL-8 mRNAの発現が証明されたことから、乳漿中のIL-8の由来は初乳マクロファージが示唆される。初乳中にはマクロファージに比し少数ではあるが、好中球やリンパ球（T細胞が優位）も検出できる。これらの細胞は乳腺局所で産生されたIL-8により乳漿中に走化した可能性がある。これらの細胞による児の感染防御能の賦与が論ぜられているが<sup>68)</sup>、母乳中のIL-8の児に対する功罪とともに、更に検討を要するものと考えられる。

IL-1raは、細胞膜上の受容体を介して働くIL-1の作用に拮抗する蛋白因子であり、単球・マクロファージや好中球により産生される<sup>69)</sup>。IL-1は単球・マクロファージに働いて、IL-1、TNF、IL6、IL-8など、炎症に関わるサイトカインを産生して炎症を増大する。従ってIL-1raのIL-1拮抗作用は、IL-1のみならず、その他の炎症誘発サイトカインの産生を抑制して消炎機能を発揮する。乳漿中のIL-1raはIL-1に比較して段違いに高値であった。初乳中のIL-1対IL-1ra比の関係から推論すれば、乳漿は抗炎症的側面が強いとも考えられる。

文献：

- 1) Stephens, S., Brenner, M.K., Duffy, S.W., Lakhani, P.K., Kennedy, C.R., and Farrant, J.: The effect of breast-feeding on proliferation by infant lymphocytes in vitro. *Pediatr. Res.*, 20:227-231, 1986.
- 2) Goldblum, R.M., Schanler, R.J., Garza, C. and Goldman, A.S.: Human milk feeding enhances the urinary excretion of immunologic factors in low birth weight infants. *Pediatr. Res.*, 25:184-188, 1989.

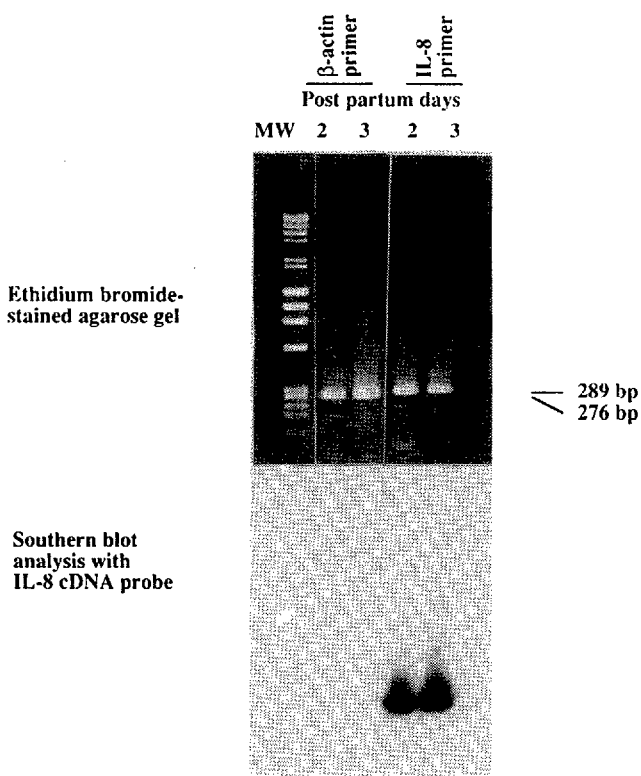


Fig. 8 Expression of IL-8 mRNA in colostrual cells

- 3)Pabst, H. F., Godel, J., Grace, M., Cho, H. and Spady, D. W.: Effect of breast-feeding on immune response to BCG vaccination. *Lancet*,1:295-297. 1989.
- 4)Pabst, H.F. and Spady, D. W.: Effect of breast-feeding on antibody response to conjugate vaccine. *Lancet*,336:269-270. 1990.
- 5)Goldman, A.S., Thorpe, L.W., Goldblum, R. M., et al.:Anti-inflammatory properties of human milk. *Acta Paediatr. Scand.*, 75:689-695, 1986.
- 6)Schnorr, K.L. and Pearson, L.D.:Intestinal absorption of maternal leukocytes by newborn lambs. *J. Reprod. Immunol.*, 6:329-337, 1984.
- 7)Xanthou, M., Jain, L., Vidyasagar, D., Ghai, V., Shimada, S. and Blend, M.:In vivo kinetics of human milk leukocytes after ingestion by the newborn. In:Stern, L., Orzalesi, M., Friis-Hansen, B., ed., *Physiologic Foundations of Perinatal Care*, Vol 3, Elsevier, Amsterdam, 1989, p.106-114.
- 8)Johnson, D. F., France, G.L., Marmer, D. J., et al.:Bactericidal mechanism of human breast milk leukocytes. *Infect. Immun.*, 28:314-318, 1980.
- 9)Dinarello, C.A.:Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 177:1627-1652, 1991.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:

母乳による児の能動免疫増強ならびに母乳の抗炎症作用の機序を知るために、初乳中の interleukin1(IL-1)、interleukin8(IL-8)、IL-1 receptor antagonist(IL-1ra)を検討した。初乳の乳漿中には IL-1、IL-8、IL-1ra が検出された。IL-1ra は IL-1 に比較して段違いに高濃度であった。初乳マクロファージは LPS 刺激培養で末梢血単球と同程度の IL-1 産生能を有しており、採取直後の初乳細胞に IL-8mRNA の発現が確認された。乳漿中の IL-8 ならびに児の体内に侵入した初乳細胞の産生する IL-1、IL-8 が児の能動免疫増強に關与する可能性が示唆される。乳漿中の高濃度の IL-1ra の存在は、母乳の抗炎症作用の機序の一つかも知れない。