

「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

協同研究者：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tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 1(IL-1), interleukin 8(IL-8), soluble TNF receptor (sTNF R), L-1 receptor antagonist (IL-1ra)を検討した。初乳の乳漿中にはTNF α , IL-1 β , IL-8, sTNF R, IL-1raが検出された。sTNF R, IL-1raはそれぞれTNF α , IL-1 β に比較して段違いに高濃度であった。採取直後の初乳細胞にIL-1 β , IL-8, IL-1raのmRNAの発現が確認された。乳漿中のTNF α , IL-1, IL-8ならびに児の体内に侵入した初乳細胞の産生するTNF α , IL-1, IL-8が児の能動免疫増強に関与する可能性が示唆される。乳漿中の高濃度のsTNF R, 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, tumor necrosis factor α , interleukin 1, interleukin 8, soluble tumor necrosis factor receptor, 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¹⁾。そこで、この機序を知る端緒として初乳中のTNF α , IL-1, IL-8を測定し、一部の初乳細胞を用いて、IL-1, IL-8のmRNA発現を検討した。

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²⁾。近年、粘膜傷害は、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、TNF α , IL-1のそれぞれの作用に拮抗するsTNF R, IL-1raに注目して、初乳中のsTNF R, IL-1raを測定し、一部の初乳細胞を用いてIL-1raのmRNAの発現を検討した。

対象と方法：1. 初乳の採取と処理：初乳は分娩後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。初乳細胞はFicoll-Conray比重遠心(400 g 30分)にて採取した。

2. 乳漿と母体血清中のTNF α , IL-1, IL-8の測定：TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-8, sTNF RI, sTNF RII, IL-1ra濃度をELISAキット(Amersham社製)にて測定した。母体血清は分娩後2日に採取したものをを用いた。

3. 初乳細胞のIL-1 β , IL-8, IL-1raのmRNA発現の測定：母乳細胞よりRNAzolB(Cina/Biotech)を用いてRNAを抽出した。得られたtotal RNA量をOD260により測定し、その2 μ gよりrandom primer とreverse transcriptaseを用いてcDNAを合成した。IL-1 β , IL-8, IL-1raの特異的primer, またはコントロールとして β -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tableの通りである。IL-1 β , IL-1raのprimerは文献³⁾より選び、またIL-8についてはSouthern blotによりその特異性を確認した。PCR反応はPerkin-Elmer PJ9600を用い、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 60秒を30回繰り返した。

Table Cytokine primers

	primers (5'-sense primer and 3'-antisense primer)
β -actin	5'- AAC TGG GAC GAC ATG GAG AA-3' 5'-ATA CCC CTC GTA GAT GGG CA-3'
IL-1 β	5'-CTT CAT CTT TGA AGA AGA ACC TAT CTT CTT-3' 5'-AAT TTT TGG GAT CTA CAC TCT CCA GCT GTA-3'
IL-8	5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT-3'
IL-1ra	5'-GGC CTC CGC AGT CAC CTA ATC ACT CT-3' 5'-CCC AGA TTC TGA AGG CTT GCA TCT TG-3'

作成したPCR productは 2% agaroseで電気泳動し、ethidium bromideで染色した。分子量マーカーは Superladder-low (GeneSura lab.)を用いた。

結果：

1. 初乳と母体血清中のTNF α , IL-1, IL-8の濃度：初乳ではTNF α は約半数の検体で20~75000pg/mlの範囲で検出された(Fig.1)。IL-1 α は大部分の検体で<40pg/mlであったが、IL-1 β は約半数の検体で40~23000pg/mlの範囲で検出された(Fig.2)。IL-8は分娩後1日で4200~35000pg/mlの範囲で検出され、経日的に低下傾向を認めた(Fig.3)。母体血清では、大部分の検体でIL-8、全ての検体でTNF α , IL-1 β は検出されなかった(Fig.4)。

2. 初乳と母体血清中のsTNFR, IL-1raの濃度：初

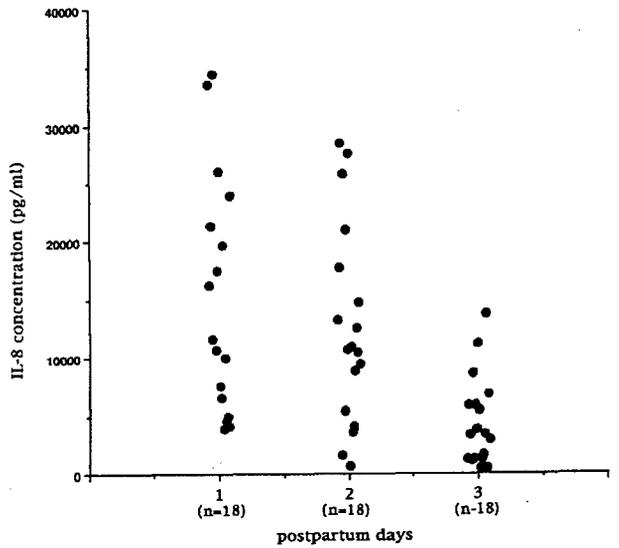


Fig. 3 IL-8 concentration in colostrum

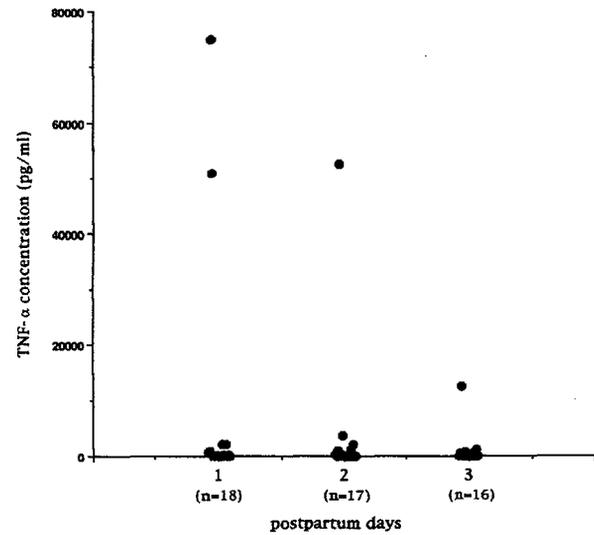


Fig. 1 TNF- α concentration in colostrum

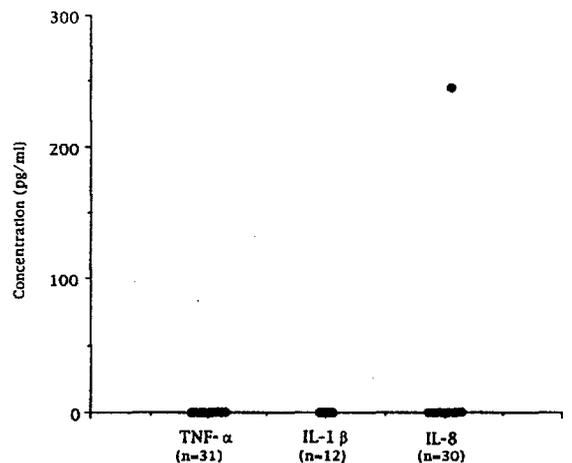


Fig. 4 Concentration of TNF- α , IL-1 β , IL-8 in maternal serum (2nd postpartum day)

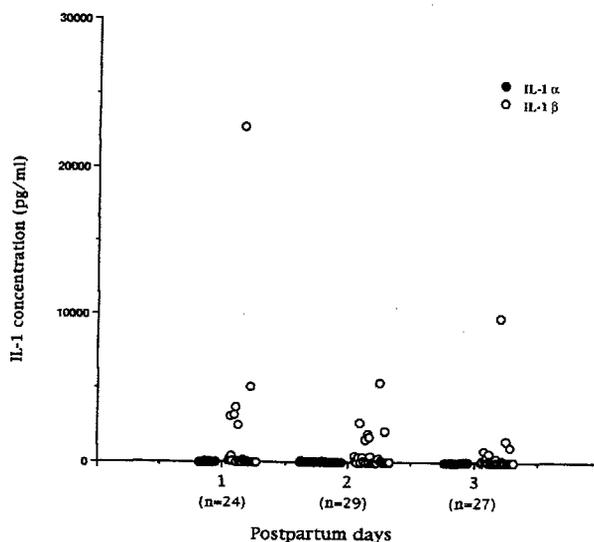


Fig. 2 IL-1 concentration in colostrum

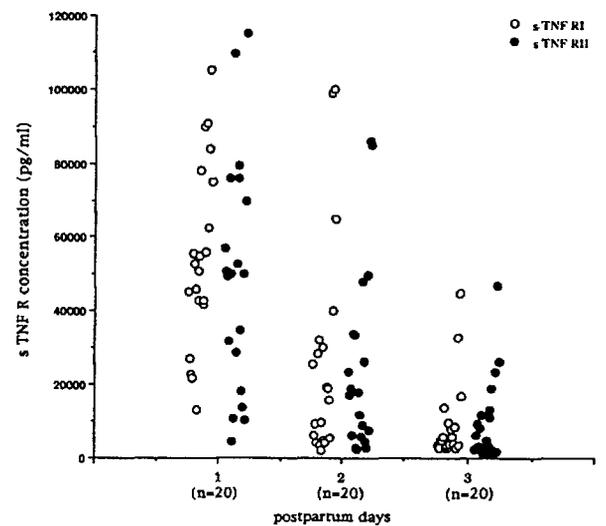


Fig. 5 sTNFR concentration in colostrum

乳では、sTNFRI, sTNFRIIがそれぞれ、分娩後1日で平均54000pg/ml, 49000pg/ml検出され経日的に低下した(Fig.5). IL-1raは分娩後1日, 2日でそれぞれ平均30000pg/ml, 33000pg/mlとほぼ同定度検出され、分娩後3日で平均15000pg/mlと低下した(Fig.6). 母体血清ではsTNFRI, sTNFRIIがそれぞれ平均1400pg/ml, 2400pg/ml検出され、sTNFRIIはsTNFRIよりも有意に高値を示した. IL-1raは検出されなかった(Fig.7). ペアで採取した分娩後2日の初乳と母体血清について、sTNFR濃度の関係を見ると、sTNFRI, sTNFRIIともに両者間に有意の相関はなかった(Fig.8, 9).

3. 初乳細胞のIL-1 β , IL-8, IL-1ra mRNAの発現：
分娩後1, 2, 3日の初乳細胞よりRNAを抽出し、RT-PCRで検討した結果、IL-1 β , IL-8, IL-1raのcDNA

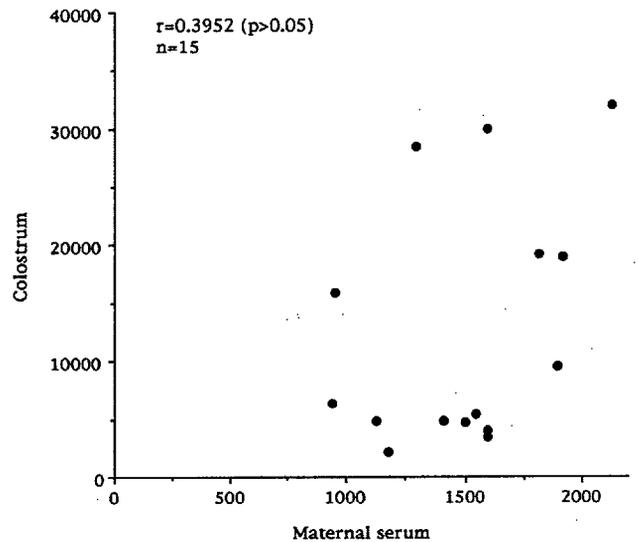


Fig. 8 Relationship of sTNF RI concentration between maternal serum and colostrum (2nd postpartum day)

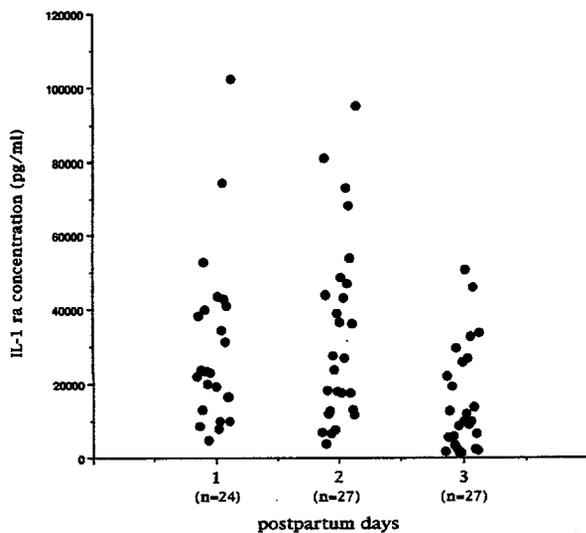


Fig. 6 IL-1 ra concentration in colostrum

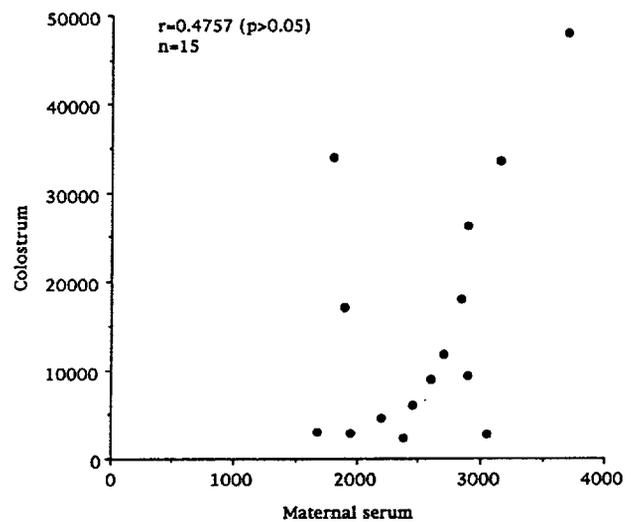


Fig. 9 Relationship of sTNF RII concentration between maternal serum and colostrum (2nd postpartum day)

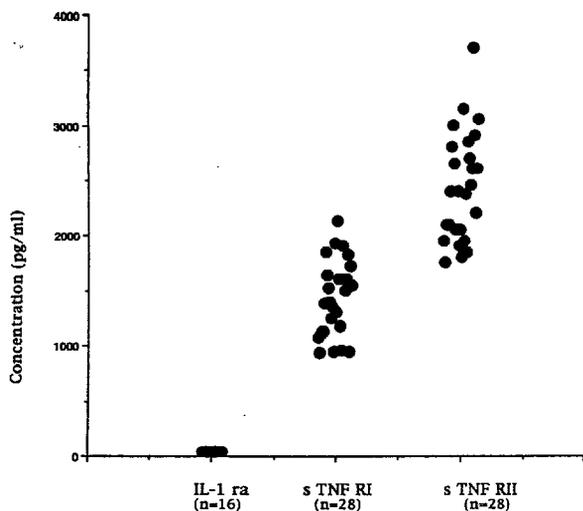


Fig. 7 Concentration of IL-1ra, s TNF R in maternal serum (2nd postpartum day)

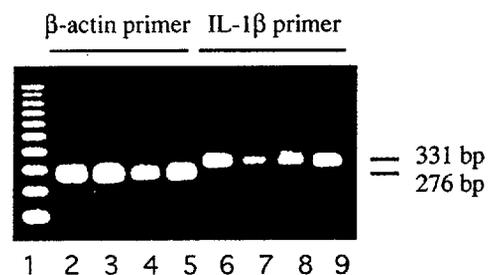


Fig. 10 Expression of IL-1 β mRNA in colostrual cells

1. superladder-low ds DNA marker
2-4, 6-8; colostrual cells (postpartum days 2,6; 1 day, 3,7; 2 days, 4,8; 3 days). 5,9; peripheral blood mononuclear cells (activated by LPS)

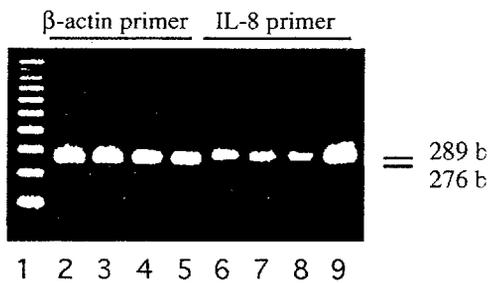


Fig. 11 Expression of IL-8 mRNA in colostrals cells

1. superladder-low ds DNA marker
 2-4, 6-8; colostrals cells (postpartum days 2,6: 1 da
 3,7: 2 days, 4,8: 3 days). 5,9; peripheral blood
 mononuclear cells (activated by LPS)

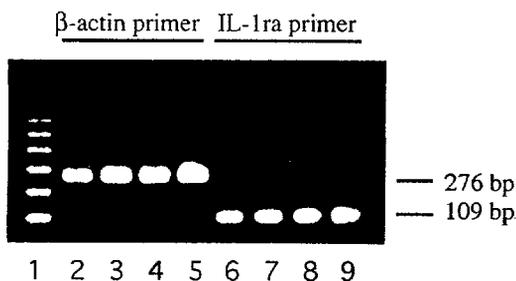


Fig. 12 Expression of IL-1ra mRNA in colostrals cells

1. superladder-low ds DNA marker
 2-4, 6-8; colostrals cells (postpartum days 2,6: 1 day,
 3,7: 2 days, 4,8: 3 days). 5,9; peripheral blood
 mononuclear cells (activated by LPS)

相当のbpのbandが認められた(Fig.10, 11, 12).

考案：TNF α , 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。母体血清中のTNF α , IL-1はほとんど検出されず, 採取直後の初乳細胞にIL-1 β mRNAの発現が見られることにより, 初乳中のTNF α , IL-1は乳腺局所で産生されていると思われる。初乳中のTNF α , IL-1は, 児の粘膜局所で, あるいは腸管より吸収されて全身で児の能動免疫を調整するかもしれない。また, 初乳細胞は児の体内に侵入すると推測されており¹⁰⁾, 児に侵入した後に産生したTNF α , IL-1が児の能動免疫能を増強する可能性もある。

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。母体血清中のIL-8はほとんど検出されず, 採取直後の初乳細胞にIL-8 mRNAの発現が見られることにより, 初乳中のIL-8も乳腺局所で産生されていると思われる。初乳中にはマクロファージに比較して少数ではあるが, 好中球やリンパ球(Tリンパ球優位)も存在する。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機能補強が考えられる¹¹⁾。また, IL-8は, 児の腸管局所の好中球やTリンパ球に作用して, 局所免疫を増強するかもしれない。

sTNFRは, TNFと結合し, その生理活性を中和する物質である¹²⁾。TNFRには, 分子量55kDaのタイプIレセプターと分子量75kDaのタイプIIレセプターがあり, それぞれ異なる情報を伝える可能性が示唆されている¹³⁾。sTNFR I, sTNFR IIはこの二種類のTNFRの細胞外領域のペプチド断片である。一方, IL-1raは細胞膜上の受容体を介して働くIL-1の作用に拮抗するタンパク因子である¹⁴⁾。両者とも, 単球・マクロファージや好中球により産生される。初乳中のsTNFR濃度は母体血清に比較して桁違いに高値であり, 母体血清中のsTNFR濃度とは有意の相関が見られなかった。また, IL-1raは母体血清中には検出されず, 採取直後の初乳細胞にIL-1ra mRNAの発現が証明された。これらは, 初乳中sTNFR, IL-1raの乳腺局所での産生を示唆する。

TNF α , IL-1は単球・マクロファージに働いて, TNF α , IL-1, IL-6, 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, sTNFR, IL-1raは, TNF α , 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も抑制して消炎機能を発揮する。初乳中のsTNFR, IL-1raは, それぞれTNF α , IL-1に比較して段違いに高値であり, 母乳の抗炎症作用の機序の一つを形成しているのかもしれない。

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.
- 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) Ehler, S., Smith, K.: Differentiation of T cell lymphokine gene expression: The in vitro acquisition of T cell memory. *J. Exp. Med.*, 173:25-36, 1991.
- 7) Finestain, G.S., Boyle, D.L., Yu, C., et al.: Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 37:644-652, 1994.
- 8) Schnorr, K.L. and Pearson, L.D.: Intestinal absorption of maternal leukocytes by newborn lambs. *J. Reprod. Immunol.*, 6:329-337, 1984.
- 9) 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.
- 10) Johnson, D. F., France, G.L., Marmer, D. J., et al.: Bactericidal mechanism of human breast milk leukocytes. *Infect. Immun.*, 28:314-318, 1980.
- 11) Van Zee, K.J., Kohno, T., Fischer, E., et al.: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4845-4849, 1992.
- 12) Dembic, Z., Loetscher, H., Gubler, U., et al.: Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 2:231-237, 1990.
- 13) 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 tumor necrosis factor (TNF), interleukin1(IL-1), interleukin8(IL-8), soluble TNF receptor(sTNFR), IL-1receptor antagonist(IL-1ra)を検討した.初乳の乳漿中には TNF, IL-1, IL-8, sTNFR, IL-1ra が検出された. sTNFR, IL-1ra はそれぞれ TNF, IL-1 に比較して段違いに高濃度であった.採取直後の初乳細胞に IL-1, IL-8, IL-1ra の mRNA の発現が確認された.乳漿中の TNF, IL-1, IL-8 ならびに児の体内に侵入した初乳細胞の産生する TNF, IL-1, IL-8 が児の能動免疫増強に関与する可能性が示唆される.乳漿中の高濃度の sTNFR, 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.