

加齢に伴う細胞性免疫能低下に対する大豆たん白質食及び運動トレーニングの影響

EFFECT OF SOY PROTEIN ISOLATE (SPI) AND EXERCISE TRAINING ON THE DECREASE OF CELLULAR IMMUNE FUNCTIONS WITH AGING

岸野泰雄・森口 覚・沖嶋直子（徳島大学医学部）

Yasuo KISHINO, Satoru MORIGUCHI and Naoko OKISHIMA

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of soybean protein isolate (SPI) and exercise training on the decrease of cellular immune functions with aging. Male Fischer rats, 3 (young) and 15 (old) months old, were fed a diet containing 20% casein or 20% SPI, and trained on a treadmill at 10 m/min, 30 min/day, 5 days/week for 4 weeks. Proliferations of peripheral blood lymphocytes (PBL) with phytohemagglutinin (PHA) and concanavalin A (Con A) were remarkably decreased in old rats compared to those of young rats regardless of the difference of dietary protein. Exercise training improved proliferation of PBL with Con A in old rats to the level of sedentary young rats, whereas proliferation of PBL with PHA was improved only in old rats of SPI group by exercise training. The proportions of T cell subsets (helper T cell, Th and suppressor T cell, Ts) in PBL of SPI group were higher than those of control group in both young and old rats. The production of interleukin 2 (IL2) from splenocytes agreed with the results of PBL proliferation with PHA and Con A in young rats, whereas the production of IL2 from splenocytes of old rats was higher than that of young rats in both control and SPI groups, and was in conflict with the results of PBL proliferation with PHA and Con A. These findings suggest that exercise training can improve the decrease of cellular immune functions with aging, which is not associated with the production of IL2, and that SPI diet also improves the decrease of cellular immune functions in old rats through an increased proportion of Th cells and an increased production of IL1 from macrophages. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 115-119, 1994.

加齢に伴い宿主免疫能，なかでもT細胞やマクロファージを中心とする細胞性免疫能が著明に低下することが知られている¹⁾。高齢者の健康保持・増進を図るうえでもこの加齢に伴う細胞性免疫能の低下を防止あるいは遅延させることが望まれる。我々は24カ月齢の老齢ラットに遊泳運動を行うことにより，低下した脾リ

ンパ球幼若化能や肺胞マクロファージ（AM）貪食能が若齢ラットのレベルまで回復すること，並びにAMの活性化Tリンパ球より産生されたマクロファージ活性化因子（MAF）に対する反応性（予備力）が有意に改善されることを見出し，既に報告している²⁾。また，宿主細胞性免疫能に及ぼす運動トレーニングの影響を

みる場合、宿主栄養状態、とくに食餌たん白質レベルとの関連を見出し、通常レベル（20%）より僅かに高いたん白質レベルのほうが AM 食食能に対する運動トレーニング効果を高める作用のあることを報告している³⁾。さらに、宿主細胞性免疫能を指標として運動トレーニング効果を食餌たん白質の質的差異並びに食餌たん白質レベルから検討し、その結果、食餌たん白質レベルに関係なくカゼイン群に比し SPI 群で脾細胞からの interleukin 2 (IL2) 産生や末梢血リンパ球中のヘルパー T 細胞 (CD4⁺CD8⁻) の割合が高い傾向にあることを見出している⁴⁾。そこで、本研究では加齢に伴う細胞性免疫能低下に対する SPI 食投与の影響、並びにトレッドミルを用いて運動トレーニングを行った場合の宿主細胞性免疫能への影響について15カ月齢の老齢ラットを用いて、カゼイン食投与の場合と比較検討した。

Table 1. Compositions of experimental diets

	Casein	SPI
	% in diet	
Casein	20	
SPI		20
Sucrose	10	10
α -Cornstarch	57	57
Cod liver oil	1.6	1.6
Soybean oil	6.4	6.4
Mineral mixture	4	4
Vitamin mixture	1	1
Energy	4.2 kcal/g or 17.6 kJ/g	

Table 2. Body and spleen weights, and numbers of immune cells

	Body wt. (g)	Spleen wt. (g)	Splenocytes ($\times 10^{-6}$ cells/g)	PBL ($\times 10^{-6}$ cells/mL)	AM ($\times 10^{-6}$ cells/100 g BW)
YC-Sed	175.3 $\pm$ 6.4	0.54 $\pm$ 0.02	5.40 $\pm$ 1.42	0.40 $\pm$ 0.08	1.99 $\pm$ 0.44
YC-Ex	184.0 $\pm$ 7.6	0.57 $\pm$ 0.09 [#]	4.71 $\pm$ 1.22	0.61 $\pm$ 0.23	1.73 $\pm$ 0.17
YS-Sed	187.0 $\pm$ 17.4	0.64 $\pm$ 0.03	5.56 $\pm$ 1.44	1.50 $\pm$ 0.14 [#] ^{##}	1.07 $\pm$ 0.21 [#]
YS-Ex	219.7 $\pm$ 68.8	0.60 $\pm$ 0.12	3.41 $\pm$ 0.64 [*]	1.03 $\pm$ 0.05 ^{**}	1.56 $\pm$ 0.20 [*]
OC-Sed	355.7 $\pm$ 92.7 [@]	0.68 $\pm$ 0.10	2.83 $\pm$ 0.14 [@]	0.89 $\pm$ 0.18 [@]	1.07 $\pm$ 0.12 [@]
OC-Ex	297.3 $\pm$ 7.2	0.69 $\pm$ 0.05	2.56 $\pm$ 0.31	0.69 $\pm$ 0.22	1.10 $\pm$ 0.19
OS-Sed	263.7 $\pm$ 22.1	0.56 $\pm$ 0.09	5.13 $\pm$ 1.45	0.66 $\pm$ 0.38	1.68 $\pm$ 0.33
OS-Ex	325.0 $\pm$ 94.9	0.67 $\pm$ 0.11	3.30 $\pm$ 0.84	1.18 $\pm$ 0.01	1.62 $\pm$ 0.90

Significantly different from sedentary rats; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Significantly different from sedentary rats fed casein diet; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Significantly different from sedentary young rats fed the same diet: @ $p < 0.05$.

実験方法

動物

特異病原体に感染していない3 (young) 及び15カ月齢 (old) の雄性 F344 ラット (日本 SLC), 各20匹を20%カゼイン食 (control) あるいは20% SPI 食 (Table 1) で4週間飼育するとともに、各群を安静群 (Sed) と運動トレーニング群 (Ex) に分けた。運動トレーニング群にはトレッドミルを用いて、10 m/分、30分間の運動を5日/週行なった。実験期間中、体重及び摂食量を毎日測定した。

脾細胞の調製

ラットをネンブタール麻酔下で脱血後、無菌的に脾臓を摘出した。脾臓を滅菌したステンレススチールのスクリーンに通すことにより、脾細胞を単離した。

末梢血リンパ球 (PBL) の調製

ヘパリン処理末梢血を Percoll (比重1.0875) 溶液上に重層、遠心することにより PBL を採取した。

PBL のマイトジェンに対する反応性

PBL をウエル当り 1×10^5 の濃度で96ウエルの microtiter plate に加えた後、T細胞マイトジェンである Phytohemagglutinin (PHA; 10 μ g/mL) 及び Concanavalin A (ConA; 5 μ g/mL) と共に37℃の5% CO₂ インキュベーター内で培養した。72時間後、1.0 μ Ci の [³H]-thymidine を各ウエルに加え、さらに24時間、37℃で培養した。得られた結果はマイトジェン刺激によって得られた cpm を培地のみとの培養で得られた cpm で割った stimulation index (SI) として表した。

脾細胞からの IL2 産生

脾細胞培養上清中の IL2 活性は recombinant IL2 (rIL2) を用いた場合の CTLL-2 細胞の増殖と比較することにより算定された。

PBL 中の T 細胞サブセットの解析

ヘパリン処理末梢血を FITC 標識抗ラット CD4 並びに PE 標識抗ラット CD8 モノクローナル抗体で染色後、FACSscan により PBL 中の T 細胞サブセットの割合を測定した。

AM 食食能並びに AM からの IL1 産生

^{51}Cr ラベルのオプソニン化羊赤血球に対する AM 食食能を測定した。また、AM からの IL1 産生は AM を LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と 24 時間培養後の上清を用いて、C3H/HeJ マウスの胸腺細胞の増殖を指標として測定

した。

統計学的解析

本研究で得られたデータは mean $\pm$ SD で表し、ANOVA により統計学的に処理された。有意水準は $p < 0.05$ とした。

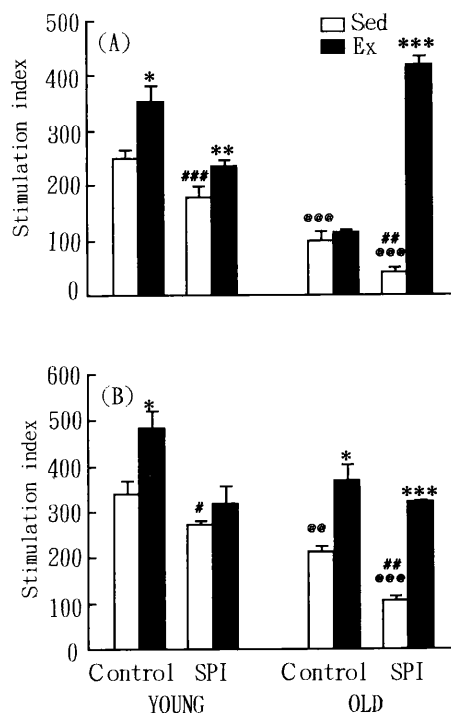


Fig. 1. Proliferation of peripheral blood lymphocytes (PBL) with PHA (A) or Con A (B) in young and old rats fed casein or SPI diet for 4 weeks. Significantly different from sedentary rats; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from rats fed casein diet; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Significantly different from sedentary young rats fed the same diet; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$.

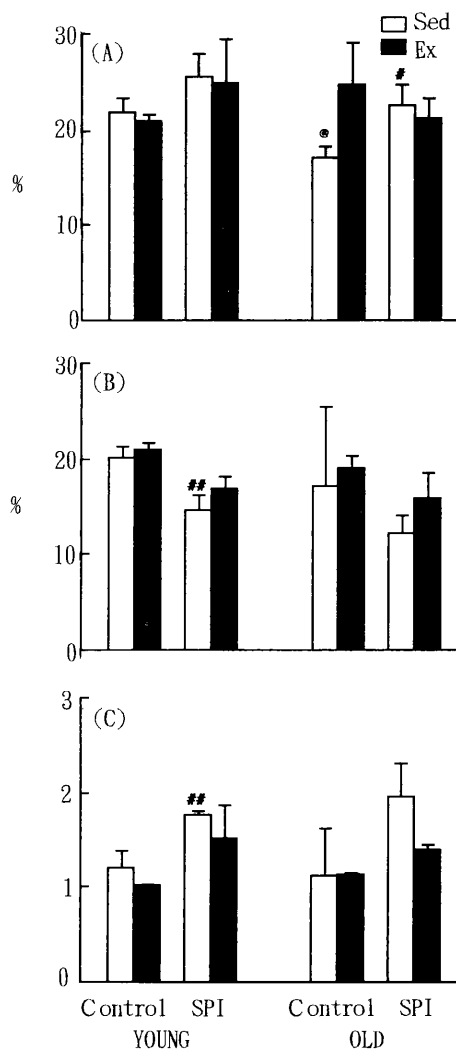


Fig. 2. Proportions of $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ (A) and $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ (B) T cells and the ratio of $\text{CD4}^+\text{CD8}^-/\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ T cells (C) in peripheral blood lymphocytes (PBL) of young and old rats fed casein or SPI diet for 4 weeks. Significantly different from rats fed casein diet; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Significantly different from sedentary young rats fed the same diet; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$.

結果及び考察

体重、脾重量並びに免疫担当細胞数

体重は old ラットに比し young ラットで低値であったが、脾重量については両群間に差異を認めなかった (Table 2)。また、脾細胞数は運動トレーニングにより両群とも減少する傾向にあった。

PBL の幼若化能

Young ラットの PBL 幼若化能は control 群に比し SPI 群で有意に低値であったが、運動トレーニングを行うことにより両群とも有意な上昇を示した (Fig. 1)。このことは細胞性免疫能を指標とした場合食餌たん白質として SPI に比しカゼインのほうが良質のたん白質であることを示唆しており、運動トレーニング効果も SPI 群よりも control 群で大きいことを認めた。Old ラットの PBL 幼若化能は young ラットに比し著明に低下しており、その傾向は SPI 群において顕著であった。さらに、old ラット PBL の Con A に対する幼若化能が運動トレーニングにより control 及び SPI 群とも亢進され、young ラットのレベルにまで改善されることを認めた。この結果は老齢ラットに遊泳運動を行った場合の我々の結果²⁾と一致しており、加齢により低下した細胞性免疫能が運動トレーニングを行う

ことにより若齢ラットのレベルにまで回復する可能性を示唆するものである。また、PHA に対する幼若化能は SPI 群では運動トレーニングにより著明な亢進を認めたのに対し、control 群では運動トレーニング効果をほとんど認めなかったことから、若齢ラットとは異なり、カゼインよりも SPI のほうが老齢ラットにおける運動トレーニング効果を得るには適したたん白質源であることが示唆された。

PBL 中の T 細胞サブセットの割合

全般的に PBL 中の T 細胞サブセットの割合は control 群に比し SPI 群において $CD4^+CD8^-$ (ヘルパー) T 細胞 (Th) の増加並びに $CD4^-CD8^+$ (サブプレッサー) T 細胞 (Ts) の減少を認めた。その結果、 $CD4^+CD8^-/CD4^-CD8^+$ 比は young ラットの SPI 群では control 群に比し有意な上昇を認めた (Fig. 2)。また、old ラットでは control 群において Th 細胞の有意な減少を認めたが、SPI 群では young ラットとはほぼ同等の割合を維持していた。このことから、old ラットの SPI 群にみられた PBL 幼若化能に対する運動トレーニング効果は PBL 中の T 細胞サブセット、特に Th 細胞の割合の増加と関連することが示唆された。

脾細胞からの IL2 産生

T 細胞増殖因子である IL2 の脾細胞からの産生は

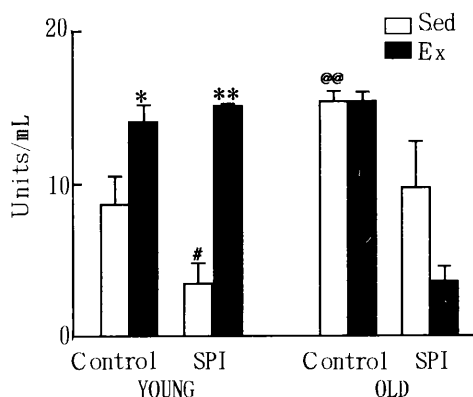


Fig. 3. Interleukin-2 (IL-2) production from splenocytes of young and old rats fed casein or SPI diet for 4 weeks. Significantly different from sedentary young rats; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Significantly different from rats fed casein diet; # $p < 0.05$. Significantly different from sedentary young rats fed the same diet; @@ $p < 0.01$.

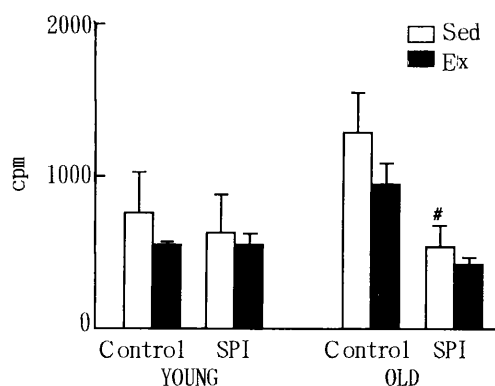


Fig. 4. Phagocytosis of ^{51}Cr -opsonized sheep red blood cells (SRBC) by alveolar macrophages (AM) of young and old rats fed casein or SPI diet for 4 weeks. Significantly different from old rats fed casein diet; # $p < 0.05$.

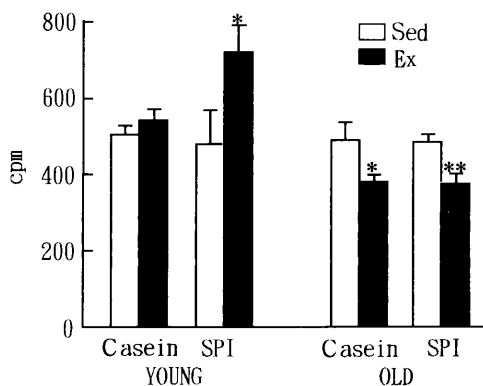


Fig. 5. Interleukin-1 (IL-1) production from alveolar macrophages (AM) of young and old rats fed casein or SPI diet for 4 weeks. Significantly different from sedentary rats; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 1にみられる PBL 幼若化能の結果とほぼ同様の傾向にあり, young ラットでは control 群に比し SPI 群で IL2 産生は有意に低下しており, 運動トレーニングにより脾細胞からの IL2 産生が両群ともほぼ同程度に亢進されることを認めた。このことは, young ラットでは Con A 刺激に応じて脾リンパ球から IL2 が産生され, その程度は SPI 群よりも control 群において高く, 運動トレーニングにより IL2 産生がさらに亢進することを示唆している。しかし, old ラットでは control 群の脾細胞からの IL2 産生が young ラットに比し有意に高いことを認めたが, しかし, Fig. 1に示す如く, PBL 幼若化能は低値であったことから, old ラットでは IL2 産生が young ラットより亢進していても, それに対する T リンパ球の感受性が低下していることが示唆された。さらに, 運動トレーニングによる影響も control 群ではほとんど認めなかった。Old ラット脾細胞からの IL2 産生は SPI 群でも young ラットに比べ高い傾向にあり, 運動トレーニングにより

IL2 産生はむしろ逆に著明に減少した (Fig. 3)。

AM 食食能と AM からの IL1 産生

AM 食食能については young ラットにおいて食餌たん白質の質的差異や運動トレーニングによる影響をほとんど認めなかった (Fig. 4)。Old ラットでは control 群において AM 食食能の亢進を認めた。また, 安静時の IL1 産生については食餌たん白質の質的差異並びに加齢の影響をほとんど認めなかった。Young ラットの SPI 群において, AM からの IL1 産生が運動トレーニングにより有意に亢進することを認めたが, old ラットでは control 及び SPI 群とも逆に運動トレーニングにより有意に低下することを認めた (Fig. 5)。このことから young ラットの SPI 群では運動トレーニングにより AM からの IL1 産生が亢進し, 次いで T リンパ球からの IL2 産生の上昇が誘導され, その結果として運動トレーニングに伴うリンパ球幼若化能の亢進が誘導されたものと考察した。しかし, old ラット AM からの IL1 産生 については運動トレーニング効果を全く認めなかったことから, 運動トレーニングに伴う PBL 幼若化能の改善にはマクロファージが関与していないことが示唆された。

文 献

- 1) Makinodan T (1980): Age influence of the immune system. *Adv Immunol*, 2, 287-330.
- 2) 森口 覚, 三輪仁美, 大西恵子, 岸野泰雄 (1994): 運動と栄養—栄養および加齢の影響—. *運動生化学*, 6, 102-110.
- 3) Ueda N, Kayashita J, Moriguchi S and Kishino Y (1990): Effect of dietary protein levels on immune functions of exercised rats. *Nutr Res*, 10, 429-437.
- 4) 森口 覚, 三輪仁美, 岸野泰雄 (1993): 運動トレーニング時における分離大豆たん白質 (SPI) 食の宿主細胞性免疫能に及ぼす影響. *大豆たん白質研究会会誌*, 14, 83-88.