

免疫調節機能性食品素材としての牛乳 IgG

Key Words : 牛乳 ■ 免疫調節 ■ IgG

大谷 元*

はじめに

哺乳類の新生子は免疫系をはじめとした自己の感染防御機構が完成しない状態で出生する。そのため新生子は、種々の感染防御物質を母動物から胎盤や乳汁を介して獲得する。それら感染防御物質は、病原性微生物の細胞膜に損傷を与えたり、病原性微生物の増殖に必要な栄養素の利用を妨げたり、病原性微生物が新生子の細胞に結合することを防ぐことにより、新生子が感染するのを阻止する。

母動物が新生子に与える感染防御物質の中で最も重要なものは抗体（以下の記述では抗体と殆ど同意語で免疫グロブリンという用語も使用する、Ig）である。ヒトの抗体はIgG, IgM, IgA, IgEおよびIgDの5種類に分類されており、これらのうちでもIgGは全身免疫の主役として、IgA、とくにIgAの2量体に分泌片が結合した分泌型IgA (sIgA)は腸管粘膜をはじめとした局所免疫の主役として感染防御に寄与する。

ヒトやサルをはじめとした霊長類では、IgGは出生前に胎盤を通して母親の血液中の濃度と同程度の濃度が新生子に与えられるが、IgAは胎盤を通過できないために出生後の母乳成分として新生子に与えられる¹⁾。

一方、ウシやブタなどの有蹄類ではIgAだけでなく、IgGも胎盤を介して受け渡すことができないために、すべての抗体が母乳を介して新生子に渡される。そのために、表1に示すように人乳と比べて牛乳、とくに初乳には莫大な量のIgGが含まれる。有蹄類においては、出生後およそ48時間以内の初乳成分として新生子の腸管に取り込まれたIgGは腸管から速やかに吸収されて血液に移行して全身免疫に寄与するとともに、一部はsIgAとともに腸管の感染防御にあたる。なお、ウシIgGはIgG1とIgG2の2つのサブクラスからなり、血液ではそれらの割合はおおよそ1:1であるが、乳汁では前者がおおよそ90%を占めている。そのために、分娩時から最初の3週間に牛乳に分泌されるIgG1はおおよそ1.5kgにもものぼる¹⁾。

* OHTANI Hajime 信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻

表1 牛乳および人乳の免疫グロブリンの種類と濃度

免疫グロブリン クラス・サブクラス	牛乳			人乳	
	～濃度 (g/kg)～				
IgG	初乳; 32 ~ 212	成熟乳; 0.50 ~ 1.00	初乳; 0.43	成熟乳; 0.03 ~ 0.04	
IgG1	初乳; 20 ~ 200	成熟乳; 0.30 ~ 0.60	—		
IgG2	初乳; 12	成熟乳; 0.05 ~ 0.10	—		
sIgA	初乳; 3.5	成熟乳; 0.05 ~ 0.15	初乳; 17.35	成熟乳; 1.00	
IgM	初乳; 8.7	成熟乳; 0.03 ~ 0.04	初乳; 1.59	成熟乳; 0.10 ~ 0.02	
分泌片 (SC)	初乳; 0.5	成熟乳; 0.02 ~ 0.10	初乳; 2.09	成熟乳; 0.02	

母動物から新生子への抗体の受け渡しは母子免疫と呼ばれる。母子免疫により新生子に受け渡される抗体は、母動物が生息している環境の病原性微生物をはじめとした様々な抗原性物質に対するものである。そのため妊娠中の動物に病原性微生物を注射しておく、その動物が分娩後に分泌する乳汁には注射した病原性微生物に対する多量の抗体が含まれる。この現象に着目して妊娠中に特定の病原性細菌やウイルスを免疫したウシの分泌した乳汁 IgG をヒトの感染予防や治療のために用いようとする基礎研究が古くから活発に行われてきた。また、それらの結果に基づき、1992年に台湾において、ヒトで発症しやすい26種類の病原性細菌を注射したウシが分泌した牛乳を原料にした食品が販売されたのに端を発して、日本、韓国、アメリカ合衆国、ニュージーランド、インドネシアなどにおいてもそのような食品が販売されるに至っている。

そこで、本小論では、牛乳 IgG の機能性食品素材としての免疫調節機能についてまとめた。

1. 牛乳 IgG の抗原結合活性およびプロテイン G 結合活性の各種処理に対する安定性

IgG は相同な2本のポリペプチド鎖 (H鎖) とそれより分子量の小さい相同な2本のポリペプチド鎖 (L鎖) がジスルフィド結合で連結した分子量約16万の糖たんぱく質である。一般

に、たんぱく質溶液を加熱すると、たんぱく質は高次構造の変化や凝集を起し、生物活性を失う場合が多い。また、たとえ牛乳 IgG の抗体活性に富む食品を製造しても、その輸送や貯蔵過程に抗体活性が消失することや、食品として摂取したときに消化管内の強酸や酵素の作用により抗体活性を失うことが考えられる。

牛乳抗体の熱変性温度に関して Rugg *et al.*²⁾ および DeWit *et al.*³⁾ は、それぞれ 81℃ および 79℃ と報告している。Lindstrom *et al.*⁴⁾ は抗体の溶解している溶媒により熱変性温度は異なり、緩衝液 (pH 6.5) 中での変性温度は IgG1 で 79.4 ± 0.5℃、IgG2 で 76.7 ± 0.3℃ であるが、牛乳を限外濾過して得た乳糖や塩類などの低分子溶液中ではより高い温度の 81℃ であると報告している。また、Li-Chan *et al.*⁵⁾ は牛乳に高温短時間殺菌処理や噴霧乾燥処理を施しても IgG の高い抗原結合活性が維持できることを、また、Kobayashi *et al.*⁶⁾ および Murosaki *et al.*⁷⁾ は牛乳を低温スプレー乾燥しても高い抗原結合活性を維持できることを報告している。さらに、Facon *et al.*⁸⁾ は、チェダーチーズホエーから分離した IgG を膜殺菌後無菌的に UHT 乳に添加して 4℃、25℃ および 35℃ で保存した場合、少なくとも 5ヶ月間は添加した抗体活性は低下しないことを確認しており、Stephan *et al.*⁹⁾ は、初乳から調製した免疫グロブリン粉末を密閉容器で 5℃ または 37℃ で 4週間貯蔵しても細菌との結合能はほとんど低下しないことを報告している。これらの報告は、牛乳 IgG は加工や貯蔵

後も高い抗原結合活性維持することを示すものである。筆者らも¹⁰⁾、図1に示すように脱脂乳の63℃で60分間の熱処理、pH 4～10、37℃で24時間の保持などにおいて、牛乳IgGの抗原結合活性の85%以上が残存することや、脱脂粉乳を室温で12ヶ月間貯蔵しても抗原結合活性は殆ど低下しないことを確認している。一方、IgGはそのFc領域を介して細胞のFc受容体(Fcγレセプター)や細菌表面膜上のプロテインGと結合するが、DeLano *et al.*¹¹⁾ およ

び Shields *et al.*¹²⁾ はIgGのそれらへの結合領域は殆ど同じ領域であること報告している。筆者らは¹⁰⁾、図1に示すように脱脂乳の63℃で60分間の熱処理や図には示していないがpH 4～10、37℃で24時間の保持では牛乳IgGのプロテインG結合活性の85%以上が残存すること、並びに脱脂粉乳を室温で12ヶ月間貯蔵してもプロテインGとの結合活性は殆ど低下しないことを確認している。すなわち、これらのことは、牛乳に加工処理や貯蔵を施しても、牛乳IgGのFabおよびFc領域の免疫機能を高く維持できることを示している。

一方、Butler *et al.*¹³⁾ は30時間のペプシン消化において牛乳IgG1は完全にF(ab)₂とFcに分解されるがIgG2は全く分解されたいことやトリプシンの作用に対してIgG1はIgG2よりも高い抵抗性を示すことを報告しており、Rham & Isliker¹⁴⁾ は牛乳IgG1をトリプシンやペプシンで分解しても病原性微生物との結合活性を維持していると報告している。Brock *et al.*¹⁵⁾ は牛乳IgG1やIgG2のL鎖はペプシンやトリプシンでは全く消化されないことや牛乳IgG1

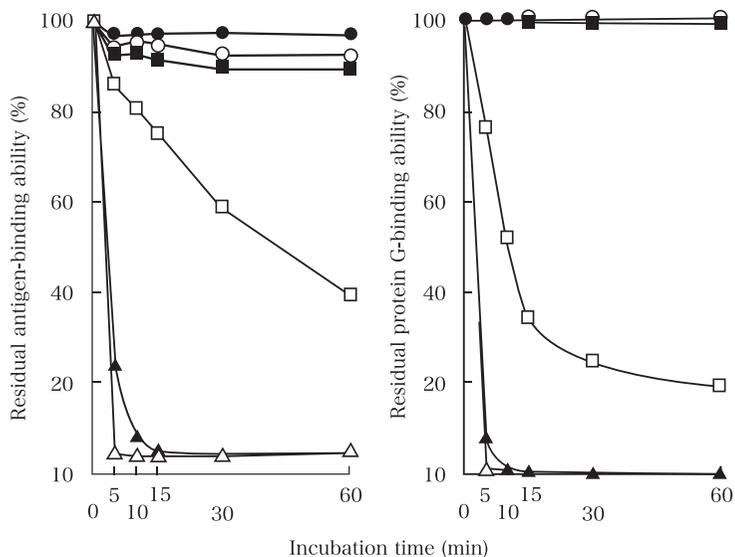


図1 加熱脱脂乳の残存抗原結合活性(左)と残存プロテインG結合活性(右)
加熱温度:40℃(●), 50℃(○), 63℃(■), 72℃(□), 80℃(▲), 90℃(△).
Ohnuki and Otani, *Animal Science Journal*, 2005

はキモトリプシンでは全く消化されないことを報告している。また、Ebina *et al.*¹⁶⁾ はヒトロタウイルスに対する高い抗体力価を持つ牛初乳に37℃で1時間、大量のトリプシンを作用させても抗体力価は全く低下しないことを観察している。Meisel¹⁷⁾ は単離した牛乳IgGよりも牛乳や脱脂乳中でのIgGの方が酵素による消化や酸による変性を受け難いことを示している。さらにBrüssow *et al.*¹⁸⁾ および Hilpert *et al.*¹⁹⁾ は、牛乳免疫グロブリン濃縮物を投与した新生児の糞便に顕著な抗ウイルス活性を検出している。筆者らは¹⁰⁾、牛乳IgGはpH 4でのペプシン消化では高い抗原結合活性とプロテインG結合活性を有しているが、それよりも反応pHが低くなるに伴い急激にそれらの結合活性を低下させること、並びに双方の結合活性ともに弱アルカリ性領域でのトリプシン、キモトリプシンおよびパンクレアチンなどの腸管プロテイナーゼ処理では高く維持されることを確認している。また、筆者らは²⁰⁾、牛乳IgGを直接マウスの胃内に投与すると投与6時間後までは投与した抗原結合活性の60%以上が胃で検出される

ことやプロテイン G 結合活性は抗原結合活性よりも早く失われることを観察するとともに、図 2 に示すように、牛乳 IgG1 投与後 48 時間までの糞便中に投与した IgG1 の約 58% の抗原結合活性と約 15% のプロテイン G 結合活性を回収した。すなわち、これらのことは、牛乳 IgG の抗原およびプロテイン G 結合活性は腸での消化に対して強い抵抗性を持ち、病原性微生物に対する牛乳 IgG の経口摂取により腸管における感染予防効果が期待できることを示唆している。

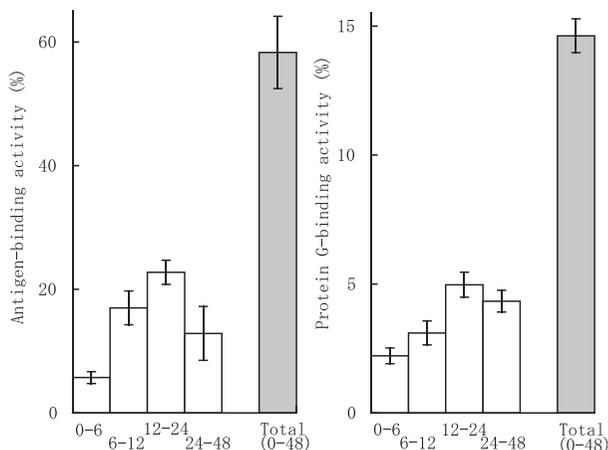


図 2 牛乳 IgG 投与後 48 時間までに回収したマウス糞便の抗原結合活性(左)とプロテイン G 結合活性(右) Ohnuki and Otani, *Milchwissenschaft*, 2006

2. 牛乳 IgG の感染予防効果

ヒトでの各種免疫グロブリンの産生量を比較すると、IgA の産生量が最も多く、体重 1 kg 当たり 1 日約 66 mg であり、次いで IgG の約 34 mg、IgM の約 7.9 mg である。また、産生される IgA の 2/3 以上は sIgA として消化器官や乳汁などの外分泌液に分泌される¹⁾。外分泌液に分泌された sIgA はペプシンやトリプシンなどの消化酵素に対して高い抵抗性を持ち、消化管や気管などで病原性微生物と結合してその微生物が上皮細胞に接着するのを防ぐとともに、ウイルスや毒素を中和することにより感染防御に寄与している。このことから、特定の病原性微生物を妊娠牛に免疫しておき、そのウシが分娩後に分泌する乳汁 IgG を sIgA の代替品としてヒトの健康維持のために用いようとする試みはおおよそ 100 年近く前からある。すなわち、1916 年、Giltner は妊娠牛の乳房の一つに *Beucella abortus* を注射すると、はじめは注射した乳房においてのみ、また、その後は注射を行わなかった他の三つの乳房からも *Beucella abortus* を凝集させる乳汁が分泌されたことを示している¹⁾。

1955 年、Petersen and Cambell は病原菌を予め注射したウシの乳汁によりヒトの感染症が予防できるという牛乳による感染予防理論を提唱し、その後、多くの研究者たちによりこの理論に基づく牛乳抗体の利用に関する数多くの研究成果が報告されてきた¹⁾。それらの成果を概略すると次のとおりである。

1) 生乳中への各種病原性微生物に対する特異抗体の生産

牛初乳や成熟乳には、元来、種々の病原性微生物に対する抗体が含まれる。Stepham *et al.*⁹⁾ は、通常飼育している 100 頭以上のウシの初乳から調製した抗体濃縮物 (IgG を 61%、IgA を 7%、IgM を 19% 含有) の認識している細菌の種類を調べ、表 2 に示す細菌を報告している。同様に、Li-Chan *et al.*²¹⁾ は、カナダのブリテイッシュコロンビア地域で飼育されている 254 頭のウシから搾乳した生乳中の IgG 量の平均は 1990 年で 0.28 mg/ml、1991 年で 0.25 mg/ml であるとともに、それらすべての生乳中に表 2 に示す 5 株の細菌に対する抗体活性を確認している。

一方、妊娠中に特定の病原性微生物を注射(免疫)しておき、その微生物に対する抗体を乳汁

表2 通常飼育している牛の初乳抗体が認識している微生物

Stepham *et al.* (1990) の報告 (100 頭以上の乳牛の初乳混合物について分析)

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*,
Proteus vulgaris, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*,
Staphylococcus aureus, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*,
Streptococcus faecalis, *Streptococcus viridans*, *Candia albicans*

Li-Chan *et al.* (1994) の報告 (254 頭の乳牛の初乳を個々に分析)

Shigella flexneri 1A, *Escherichia coli 0111*, *Escherichia coli 0128*,
Salmonella typhimurium, *Salmonella enteritidis*

に大量に生産させる試みは、1916年、Giltnerにより始めて報告されたことは既に述べたとおりであるが、わが国においても今からおよそ40年前に仁木および祐川らにより同様の研究が精力的に行われ、その成果は1965年から1967年に刊行された「栄養と食糧」誌に報告されている²²⁻²⁶⁾。近年、Li-Chan *et al.*²¹⁾は5種類の赤痢菌、病原性大腸菌およびチフス菌を乳牛に注射したところ、それら乳牛の初乳には注射した細菌に対する高い抗体活性が確認されたが注射しない細菌に対する抗体活性は非注射群の抗体活性と同程度であったことに基づき、病原性細菌の注射によりその細菌に対する特異抗体を初乳中に多量生産することができると結論している。

Saif *et al.*²⁷⁾は、Freundの不完全アジュバントでエマルジョンにしたウシロタウイルスを乳牛に注射すると、ウシロタウイルス単独で注射した場合と比べて高い抗体活性が検出されるとともに、ほとんどの抗体活性はIgG1およびIgG2クラスの抗体であったと報告している。合わせてSaif *et al.*²⁸⁾は、分娩9週間前の妊娠牛にFreundの不完全アジュバントとともにウシロタウイルスを筋肉内に注射し、その2週間後に同じ抗原を乳房内に注射することにより、血清と乳汁中にウシロタウイルスに対する高い抗体活性を確認できたと報告している。これらのことに基づき、Saif *et al.*²⁸⁾は、初乳中に高い抗体活性を得るためには免疫回数、免疫箇所、アジュバントの使用、免疫に用いる抗原量などが

重要であると結論している。Ebina *et al.*¹⁶⁾は、妊娠8ヶ月のホルスタイン種牛にFreundの完全アジュバントでエマルジョンにしたヒトロタウイルスを皮内注射し、その後、10日間隔で9回、そのウイルスのみを皮内注射することにより、アジュバントを全く用いずにロタウイルスのみを注射した場合と比べて明らかに高いロタウイルスに対する抗体活性を認めている。Brussow *et al.*¹⁸⁾は、分娩6週間前の乳牛に、ヒトロタウイルスの4種類の血清型をFreundの不完全アジュバントとともに皮内のリンパ節付近に注射し、その後、1週間間隔でロタウイルスのみを乳房内に2回注射し、次いで1週間後にロタウイルスを水酸化アルミニウムとともに乳房内リンパ節に注射し、さらにその1週間後に尻の筋肉内にFreundの不完全アジュバントとともにロタウイルスを注射した。また、分娩1週間前には水酸化アルミニウムとともにロタウイルスを静脈内注射した。そのようにして6回ロタウイルスを注射した乳牛が分娩後に分泌した最初の10日間の乳汁1000kgから50%の抗体を含む凍結乾燥物を10kg得たと報告している。同様に、Boesman-Finkelstein *et al.*²⁹⁾は、コレラ毒素、大腸菌の生産する毒素およびコレラ菌の外膜各2mgをFreundの不完全アジュバントでエマルジョンにして分娩4～5週間前と2～3週間前の乳牛に注射し、その1年後の分娩時の3週間前に同牛に3mgのそれら各抗原を同様に注射することにより、2年間に亘り高い特異抗体活性を持つ牛乳が得られたと報告し

ている。さらに、Galay *et al.*³⁰⁾ は、表3に示す26種類の病原性細菌の混合物を妊娠牛に注射すると、初乳中の各病原性細菌に対する抗体量は注射しない場合よりも20～40%多くなることを報告している。なお、後述するように、これら26種類の細菌を注射したウシが分泌する牛乳から調製した脱脂乳やホエイたんぱく質濃縮物の低温下でのスプレー乾燥物を Stolle Milk Biological International 社（アメリカ合衆国）が製造し、それらを原料にした食品がわが国をはじめとして台湾、韓国、アメリカ合衆国、ニュージーランド、インドネシアなどで販売されている。

2) 牛乳抗体のヒトの感染症予防効果

世界では毎年約500万人のヒトが下痢症で死亡しており、一般にその主要な要因は夏期では

細菌であり、冬季ではウイルスである。また、わが国における下痢症の20～30%は細菌性のものであり、残りがウイルス性のものである¹⁾。病原性大腸菌は腸管病原性大腸菌、毒素原性大腸菌、細胞侵入性大腸菌、腸管出血性大腸菌に分けられるが、Mietens *et al.*³¹⁾ は、毒素原性大腸菌を注射した妊娠乳牛の分娩後6～8日目の乳汁から調製したホエイを限外濾過し、ラクトースやミネラルなどの低分子化合物を除去後、凍結乾燥したところ、その凍結乾燥物には40±5%の抗体（IgG1は全抗体の75%、IgG2は3%、IgAは17%、IgMは6%）が含まれており、それを生後10日から16ヶ月齢の60人の乳児に経口的に与えると腸管内の毒素原性大腸菌が排除されたと報告している。一方、ウイルスは抗生物質の標的となる細胞壁とリボゾー

表3 26種類のヒト腸内細菌を免疫した牛と免疫していない牛が分泌した牛乳中のそれら細菌に対する抗体力価

免疫した細菌	免疫群の抗体力価	非免疫群の抗体力価
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.456	0.421
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.411	0.354
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 1	0.349	0.282
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 3	0.531	0.339
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 5	0.409	0.317
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 8	0.687	0.364
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 12	0.561	0.242
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 14	0.351	0.263
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 18	0.545	0.161
<i>Streptococcus pyogenes</i> A Type 22	0.561	0.258
<i>Aerobacter aerogenes</i>	0.774	0.416
<i>Esherichia coli</i>	0.794	0.408
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.872	0.329
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.631	0.165
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.503	0.278
<i>Salmollea typhimurium</i>	0.636	0.375
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.619	0.352
<i>Streptococcus mitis</i>	0.494	0.244
<i>Proteus vulgaris</i>	0.777	0.385
<i>Shigella dysenteriae</i>	0.785	0.403
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	0.722	0.386
<i>Propionibacter acnes</i>	0.354	0.266
<i>Streptococcus sanguis</i>	0.633	0.324
<i>Streptococcus salivarius</i>	0.751	0.398
<i>Streptococcus mutans</i>	0.768	0.422
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.549	0.364

抗体価は、酵素免疫測定法により得られた吸光度を示している。Galay *et al.*, *American Clinical Nutrition*, 1990

ムを持たないために抗生物質での治療は困難であるとともに、ヒトロタウイルスには6種類の血清型があり流行する型は年によって異なるために予防することも難しい。また、ロタウイルスによる下痢症は免疫学的に未熟な1歳未満の乳児が発症するために、ワクチンを用いて高力価の中和抗体を乳児の体内に造らせることも困難である。Ebina *et al.*¹⁶⁾ は、ヒトロタウイルス Wa 株を注射したホルスタイン種牛の分娩直後から3週間の乳汁から調製した脱脂乳（総菌数は3万以下/ml、大腸菌群は陰性）を6人の乳児に毎朝20mlずつ飲ませ、1ヶ月後にロタウイルスを接種したところ、市販の脱脂乳を飲ませた乳児では7人中6人が下痢になったのに対してロタウイルスを注射したウシが分泌した牛乳から調製した脱脂乳を飲ませた乳児は6人中1人しか下痢をせず、かつ、下痢をしなかった5人の乳児のうち2人には高いロタウイルスに対する抗体活性が検出されたと報告している。これらのことから、ロタウイルスに対する牛乳抗体の経口投与はロタウイルス感染に対して高い予防効果があるとともに、自らの能動免疫系の発達を妨げることはないことが示唆される。Hilpert *et al.*¹⁶⁾ は、ヒトロタウイルスを注射したウシの乳汁抗体濃縮物を乳児の急性ロタウイルス性腎腸炎の治療に用いたところ、治療効果が見られるとともに用いたロタウイルスに対する中和抗体活性の43%が糞便中に検出され、それらの主要フラグメントはF(ab)₂やFabであったと報告している。同様に、Tzipori *et al.*³²⁾ は、寄生虫感染した免疫不全幼児にその寄生虫抗原を注射した乳牛の初乳を3週間与えたところ、投与5日以内に吐気と下痢は止まったことから特異抗体を含む牛初乳は免疫不全症の患者にとって治療効果を有していると報告している。一方、Tacket *et al.*³³⁾ は、数種の毒素原性大腸菌、大腸菌の毒素およびコレラ毒素などを注射した乳牛の初乳から調製した抗体の凍結乾燥

物を水に溶かし、10人の健康なボランティアの人に1日3回飲ませた後、毒素原性大腸菌を10⁹コロニー形成単位投与しても下痢を起した人は1人もいなかったが、牛乳抗体を飲ませていないボランティアでは10人中9人が下痢を起したと報告している。Davidson *et al.*³⁴⁾ は、ホルマリン処理したヒトロタウイルスの4種類の血清型を注射した乳牛の初乳を凍結乾燥し、その16%溶液として3~15ヶ月齢のロタウイルスに感染した乳児に飲ませたところ治療効果が確認されたと報告している。さらに、Levin³⁵⁾ は、毒素原性大腸菌に対する初乳抗体濃縮物は成人ボランティアにおいて、毒素原性大腸菌による下痢の発生を予防したと報告しており、Tacket *et al.*³³⁾ は、赤痢菌の細胞膜から分離したリポポリサッカライドを注射した乳牛の初乳を原料にして調製した抗体濃縮物10gを150mlの水に溶かして1日に3回、3日間にわたりボランティアの人に飲ませた後に赤痢菌を加えた脱脂乳を飲ませても赤痢症状は見られなかったが、抗体を飲ませないで赤痢菌を加えた脱脂乳だけを飲ませたボランティアでは40~60%の人が下痢、発熱、粘液血便などの赤痢症状を示したと報告している。すなわち、これらのことから、病原性微生物に対する牛乳特異抗体はヒトの感染症の予防や治療に有効であると結論できる。

3. 健康食品素材としての牛乳IgG

アメリカ合衆国のスターリ研究所（Stolle Research & Development 社、オハイオ州、現 Stolle Milk Biological International 社）は、弱毒化した病原性細菌を免疫した乳牛が分泌する乳汁の商業的生産に向けての研究に1950年代後半から着手し、1987年に表3に示したヒトにおいて感染症の原因となる26種類の病原性細菌を注射したウシの乳汁を原料にした健康食品

の製造法に関する特許を取得した。この特許に基づき、1992年からそれら26種類の病原性細菌を注射したウシの乳汁を原料にした食品が台湾で販売されたことを皮切りに、現在ではアメリカ合衆国、ニュージーランド、香港、韓国、マレーシア、日本などで販売されていることは既に述べたとおりである。

病原性細菌に対する牛乳抗体を多量に含む食品の主原料は日常私たちが食品として摂取している牛乳成分である。したがって、その食品が安全であることは十分に予測できるところである。事実、スターリ研究所は免疫牛の乳汁の安全性に関して詳細に検討を行い、安全性を確認している。すなわち、スターリ研究所はラット、ウサギ、ハムスターおよびヒヒなどの動物が免疫牛から得た乳汁を摂取したときの発育、体重、栄養状態および血液成分についてアメリカのアラバマ大学や南アラバマ大学と共同で分析を行い、それらの動物が免疫牛の乳汁を摂取しても何ら体に異常は生じないことを確認している。また、スターリ研究所は、オハイオ州立大学や英国のチャーテラス病院をはじめとして多くの病院の協力を得て1958年から約40年間に亘って9000人を超える人に免疫牛から得た乳汁の試飲試験を行い、その乳汁の摂取が健康に及ぼす障害はないことを確認している。さらに、スターリ研究所はアメリカ合衆国食品医薬品局(FDA)、同農務省(USDA)およびニュージーランド農務省(MAF)から、免疫牛の乳汁から調製した脱脂乳等の製造工程の安全性についても承認を得ている³⁶⁾。

オハイオ州での1993年～1995年の試験をはじめとしてわが国も含めて各国で病原性細菌を注射した牛乳の分泌した牛乳を原料にした食品の摂取に伴う体調の改善効果に関する聞き取り調査が行われてきた。それらの調査では、そのような食品の摂取により牛乳IgGの機能として従来から知られている感染症予防効果だけで

はなく、リウマチ性関節炎、血清コレステロール、悪性腫瘍、アレルギー性疾患、血圧、頭痛、嘔吐、食欲不振消化不良、便秘などの様々な症状の改善効果が見られたと報告されている³⁶⁾。しかし、現時点では、これらの症状の改善が牛乳中の特異抗体の作用に基づくものと断定できる科学的根拠は殆どないのが実状である。すなわち、これら改善された症状の中で特異抗体とのかかわりで改善効果が科学的に考察できるものは血清コレステロールと便秘の改善効果だけであるといっても過言ではないように思われる。1990年、Golay *et al.*³⁰⁾ および1994年、Sharpe *et al.*³⁷⁾ は、26種類の病原性細菌を免疫した牛乳の分泌した牛乳から調製した脱脂乳の摂取はそれら細菌を免疫していない牛乳の分泌した牛乳から調製した脱脂乳を摂取した場合と比べて、ヒトの血清コレステロール値を統計的に有意に低下させることを見出し、その要因として病原性細菌を免疫した牛乳の脱脂乳中のグラム陰性細菌に対する抗体が腸内菌叢を乳酸菌優位にすることに基くと考察している。一般に、腸内に多い乳酸菌細胞膜はコレステロール吸着能があり、胆汁酸や食物コレステロールを吸着することによりそれらを糞便として体外に排泄させる。結果として、腸管において乳酸菌は腸管からのコレステロールの吸収を抑制し、血清コレステロール値を低下させると言われている³⁸⁾。また、腸内が乳酸菌優位になると便秘の改善につながることも周知のところである。しかし、上述したリウマチ性関節炎、悪性腫瘍、アレルギー性疾患の改善などに26種類の病原性細菌に対する特異IgGがどのように関与しているかについては、現在、IgGに知られている抗原結合機能やエフェクター機能では説明できないところである。

4. 牛乳 IgG の新規免疫調節機能の探索

26 種類の病原性細菌に対する牛乳 IgG を豊富に含む食品を摂取したヒトにおいて、従来知られている IgG の免疫機能からでは説明できない疫学調査結果が報告されていることは既に述べたところである。筆者は、牛乳 IgG には抗原結合機能とエフェクター機能以外に能動免疫調節機能が存在すると仮定し、300 ml の牛乳に含まれる IgG を体重 60kg のヒトが毎日 1 回、1 ヶ月間続けて摂取した場合を想定し、60kg のヒトとの体重換算でマウスに 35 日間、非免疫牛の分泌する初乳から分離した IgG を経口投与した。その結果、牛乳 IgG 添加飼料で 1 ヶ月間飼育したマウス脾臓の IL-12⁺CD11b⁺ 細胞の割合および腹腔マクロファージのスーパーオキシサイド生産能は IgG 無添加飼料群と比べて

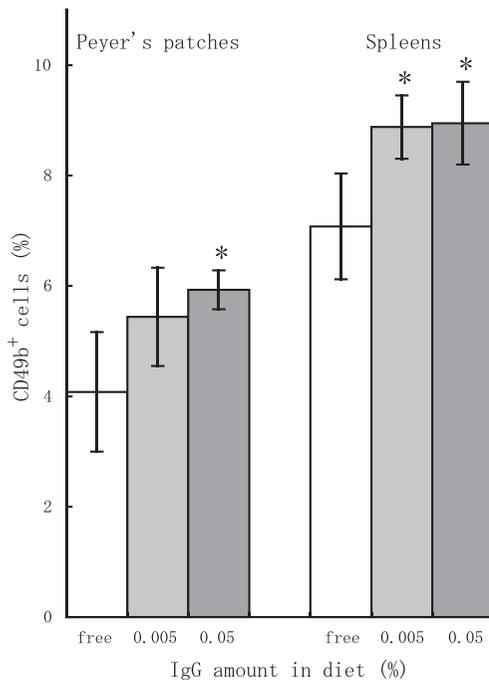


図3 牛乳 IgG 添加飼料で 35 日間飼育したマウスパイエル板と脾臓の CD49 陽性細胞 (NK 細胞) 割合
牛乳 IgG 無添加飼料の場合との統計的有意差: *P<0.05
Ohnuki et al., *International Immunopharmacology*, 2006

有意に高かった³⁹⁾。また、図3および図4に示すように、パイエル板と脾臓の NK 細胞の割合とヒト白血病株化細胞である K562 に対する脾臓細胞の傷害活性は牛乳 IgG 無添加飼料群よりも牛乳 IgG 添加飼料群において有意に高かった³⁹⁾。一方、パイエル板と脾臓中の IFN- γ ⁺CD4⁺ および IL-4⁺CD4⁺ 細胞割合、並びに図5に示すように飼料たんぱく質である卵白オボアルブミンに対する腸管 IgA レベルや血清 IgG レベルは牛乳 IgG 無添加飼料群と比べて牛乳 IgG 添加飼料群において有意に低かった³⁹⁾。さらに、脾臓の CD19^{low} 細胞割合は牛乳 IgG 無添加飼料群と比べて牛乳 IgG 添加飼料群で有意に高かった³⁹⁾。これらの結果は、牛乳 IgG の経口摂取は自然細胞性免疫系を促し、獲得液性免疫系を抑制することを示している。

そこで、牛乳 IgG の経口摂取が何故、獲得液性免疫系を抑制して自然細胞性免疫系を促

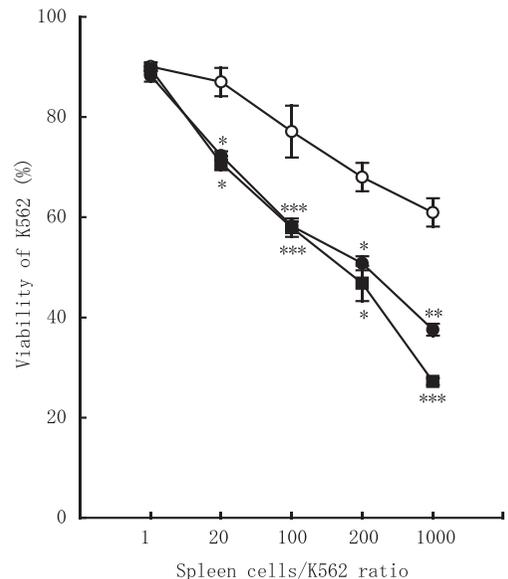


図4 牛乳 IgG 添加飼料で 35 日間飼育したマウス脾臓細胞によるヒト白血病腫株化細胞 K562 に対する傷害作用

飼料中の IgG 量: 無添加 (○),
0.005% 添加 (●),
0.05% 添加 (■)
牛乳 IgG 無添加飼料の場合との統計的有意差:
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Ohnuki et al., *International Immunopharmacology*, 2006

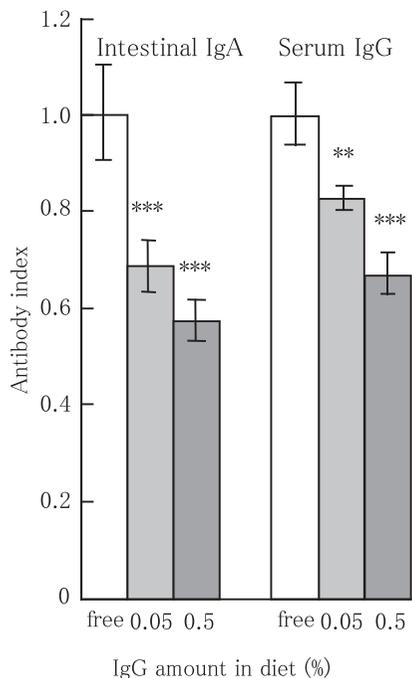


図5 牛乳 IgG 添加飼料で 35 日間飼育したマウスの飼料たんぱく質である卵白オボアルブミンに対する腸管 IgA および血清 IgG レベル

牛乳 IgG 無添加飼料の場合との統計的有意差：

P<0.01, *P<0.001

Ohnuki et al., *International Immunopharmacology*, 2006

すのかを解明する目的で、マウス脾臓細胞を牛乳 IgG1 および IgG2、並びにそれらのフラグメント存在下で 72 時間培養し、その上澄液中の IgG、IgM および IgA レベルを調べた。その結果、図 6 に示すように、牛乳 IgG1 および IgG2 は IgG、IgM および IgA 産生をすべて統計的に有意に促進し、中でも、IgG1 の IgA 産生促進活性が最も強く、50 μg/ml 添加時において無添加の場合の 1.21 倍、100 μg/ml 添加時において無添加の場合の 1.36 倍であった⁴⁰。また、IgG1 の Fc フラグメントは IgA 産生を有意に促進するが、Fab フラグメントや IgG2 の Fab および Fc フラグメントには IgA の有意な促進作用は見られなかった⁴⁰。さらに、IgG1、IgG2 およびそれらのフラグメント存在下で培養した脾臓細胞の IL-5 mRNA の発現は、IgG1 を添加して培養することによりおよそ 3 倍に増加し、IgG1 の Fc フラグメントの添加でもおよそ 2 倍に増加したが、IgG2 やその Fab および Fc フラグメントはそれら mRNA の発現に殆ど影響を

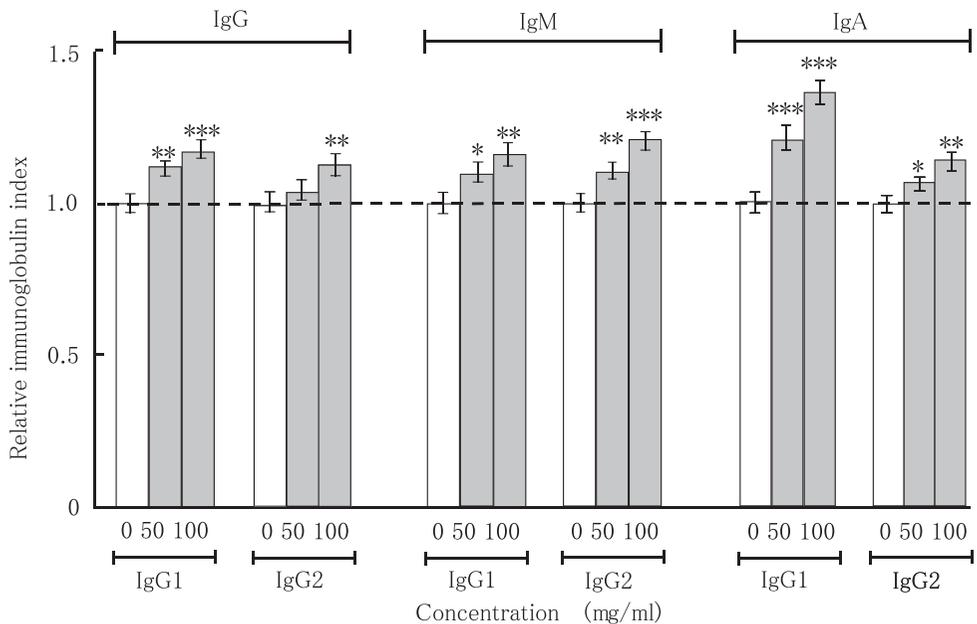


図6 牛乳 IgG1 および IgG2 存在下で培養したマウス脾臓細胞上澄液中の免疫グロブリンレベル

牛乳 IgG 無添加で培養の場合との統計的有意差：*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Mizutani et al., *Milchwissenschaft*, 2006

及ぼさなかった⁴⁰⁾。同様に、IL-6 mRNA 発現も牛乳 IgG1 の添加により無添加の場合のおよそ2倍に増加し、IgG1 の Fc フラグメントの添加によりおよそ2.5倍に増加したが、IgG2 やその Fab と Fc フラグメントの添加による影響は殆どなかった⁴⁰⁾。すなわち、これらの結果は、細胞培養系では牛乳 IgG、特に IgG1 は Fc 領域を介して IL-5 mRNA および IL-6 mRNA の発現を促すことにより IgA 産生を促進することが示され、牛乳 IgG をマウスに経口的に与えた場合の免疫グロブリン産生に及ぼす結果とは全く反対の結果であった。

一般に免疫担当細胞は、Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII と名づけられた IgG の Fc 領域受容体を有している。Fc γ RI は遊離型 IgG に対する親和性が強く、Fc γ RII および Fc γ RIII は IgG・抗原複合体に対する親和性が強いことが知られている⁴¹⁾。また、IgG が Fc γ RI を介して細胞に結合すると IL-6 生産が顕著に促され、Fc γ RIIb を介して結合すると IL-6 生産シグナルが封鎖されると言われている⁴²⁾。上述したマウス脾臓細胞による免疫グロブリン産生に及ぼす牛乳 IgG の影響を調べた実験系には牛乳 IgG が認識している抗原は含まれておらず、そのため遊離型の牛乳 IgG の影響を調べたことになる。一方、牛乳 IgG をマウスに経口投与した場合には牛乳 IgG は腸内細菌と抗原抗体複合体を形成した可能性がある。したがって、細胞培養系と経口投与試験では牛乳 IgG1 が結合した受容体の種類が異なっており、そのために経口投与の場合と細胞培養系の場合では牛乳 IgG の免疫グロブリン産生に及ぼす作用が異なることが考えられる。すなわち、脾臓細胞培養系では遊離型 IgG が主に Fc γ RI を介して免疫担当細胞、とくに抗原提示細胞に結合したのに対して、経口投与では腸内で形成された IgG・腸内細菌複合体、すなわち抗原抗体複合体が Fc γ RIIb を介して抗原提示細胞に結合したこと

により牛乳 IgG のマウスにおける免疫グロブリン産生に対する作用が全く逆になったことが示唆される。

そこで、牛乳 IgG を経口投与したマウスの M 細胞やパイエル板細胞に牛乳 IgG が結合するかということと、牛乳 IgG を経口投与していないマウス脾臓細胞やパイエル板細胞への牛乳 IgG の結合性を調べるとともに、それらの結合に及ぼす抗 Fc γ RI および Fc γ RII/III 抗体の影響を調べた。その結果、牛乳 IgG をマウスに経口投与すると、投与 30 分後のパイエル板 M 細胞表面に IgG が検出され、その IgG 結合 M 細胞の割合は投与 60 分後におよそ 16% と最も高くなり、それ以降は次第に減少した⁴³⁾。また、セルファンクションアナライザーである Guava PCA 装置により牛乳 IgG を経口投与したマウスにおいて、牛乳 IgG が細胞に結合したことを示す相対的蛍光強度が 101 ~ 102 であるパイエル板細胞数は IgG を経口投与しなかったマウスのパイエル板の場合よりも顕著に高かった。さらに、牛乳 IgG を経口投与したマウスの腸管から調製した牛乳 IgG 抗原複合体はパイエル板細胞に結合するとともに、その結合は抗マウス CD16/32 (Fc γ RII/III に対する抗体) により最も強く阻害された。

一方、牛乳 IgG を投与していないマウスの脾臓から調製した細胞懸濁液に牛乳 IgG を加えて培養した場合も脾臓細胞表面に牛乳 IgG が結合するとともに、その結合は抗マウス CD64 (Fc γ RI に対する抗体) により顕著に阻害された⁴³⁾。また、大腸菌と大腸菌に非特異的な牛乳 IgG および大腸菌と大腸菌に特異的な牛乳 IgG をそれぞれマウスパイエル板細胞と培養すると、前者の場合は抗原提示細胞の CD80 分子や CD83 分子の発現が促進され、後者の場合は抑制された⁴³⁾。

腸管には腸管関連リンパ組織 (GALT) と呼ばれるリンパ組織が存在する。GALT の中で

もパイエル板は腸管内の物質を M 細胞から活発に取り込むことができる。パイエル板には樹状細胞, T 細胞, B 細胞などの種々の免疫担当細胞が含まれ⁴⁴⁾, それら免疫担当細胞の大部分はその細胞表面に IgG の Fc 領域に対する受容体を有している⁴⁵⁾。Fc γ RII は Fc γ RIIIa と Fc γ RIIIb に分類され, Fc γ RIIIb は液性免疫応答, マクロファージや樹状細胞の貪食作用および T 細胞機能などを抑制するように働くための受容体であり, 逆に Fc γ RIIIa は促進するように働くための受容体である⁴⁵⁾。また, 免疫グロブリンの産生のためには樹状細胞などの抗原提示細胞に CD80 分子や CD83 分子が発現されることが必要であると言われている^{46, 47)}。すなわち, これらのことから, マウス脾臓細胞を牛乳 IgG と培養すると牛乳 IgG は抗原提示細胞に主に Fc γ RI を介して結合して免疫グロブリンの産生に必要な CD80 分子や CD83 分子の発現を促すことにより免疫グロブリンの産生を促進したのに対して, 牛乳 IgG の経口投与では腸管内で腸内細菌との間で形成された牛乳 IgG・腸内細菌複合体が M 細胞からパイエル板内に取り込まれてパイエル板内の抗原提示細胞に主に Fc γ RIIIb を介して結合して CD80 分子や CD83 分子の発現を抑制することにより免疫グロブリンの産生を抑制したものと考えられる。

Heyman⁴⁸⁾ は, 予め作製しておいたマラリア寄生虫抗原に対する IgM クラスの抗体とマラリア寄生虫抗原を混合して注射すると, マラリア寄生虫抗原だけを注射した場合よりも特異抗体の産生量は 50 ~ 100 倍増加することを見出し, その要因は病原性微生物である抗原と IgM・複合体が B リンパ球表面の抗原レセプターと補体レセプターの双方に結合することに基づくと考えしている。同時に Heyman⁴⁶⁾ は, IgM・抗原複合体を注射した場合は逆に, IgG・抗原複合体を注射すると抗体の産生量は著しく減少することを明らかにしている。

Heyman の報告では IgG・抗原複体の投与は注射によるものであり, 上述した筆者らの場合は経口投与によるものである。しかし, いずれの場合も IgG・抗原複合体であれば, 免疫グロブリン産生は抑制されることを示すものである。したがって, 病原菌に特異的な牛乳 IgG を多量に含む食品を摂取することにより, アレルギー症状や関節炎が改善されたという疫学的調査結果があることを上述したが, 牛乳 IgG とその抗原複合体が腸内に存在することにより免疫グロブリン産生が抑制されアレルギー症状の改善につながった可能性があり, 牛乳 IgG・抗原複合体の免疫グロブリン産生に及ぼす影響について現在, 更に検討を進めているところである。

おわりに

乳汁は哺乳類新生子の生後一定期間における唯一の食物である。近年, 食品成分の機能として, 生命維持に不可欠な栄養素の供給 (一次機能), 五感を介しての満足感の供給 (二次機能) および健康を維持するための体調調節成分の供給 (三次機能) という三つの機能が定着し, とりわけ体調調節機能を有する成分を強化した機能性食品は高齢化・少子化社会の医療費軽減のための方策の一つとしてわが国においては非常に関心の持たれているところである。

乳汁は食品成分の有する 3 つの機能がすべて豊富に備わった自然界唯一の食物であるが, 乳汁の持つ三次機能, とくに感染防御機能をはじめとした生体防御機能は乳汁成分の合目的性との関連で古くから注目されてきた。中でも牛乳 IgG の機能性食品素材としての利用は, 乳汁の本質とも関連した重要な課題であり, 本小論で紹介したように, 牛乳抗体の機能性食品素材としての利用性に関して様々な角度から多くの研究がなされてきた。

筆者は、体重 60kg のヒトが 300ml の牛乳を飲用したときに摂取する IgG 量に相当する量を想定して、体重換算でマウスに 5 週間牛乳 IgG を与えたところ (0.005% 牛乳 IgG を含む飼料で飼育)、そのマウスの獲得液性免疫因子である免疫グロブリン産生が顕著に低下し、幾つかの自然細胞性免疫因子が顕著に増強することを見出すとともに、液性免疫応答が低下する原因は、牛乳 IgG・抗原複合体が Fc γ IIb レセプターを介して腸管パイエル板中の抗原提示細胞に結合し、CD80 分子や CD83 分子の発現を抑制することによると結論した。このことは、病原性細菌を免疫した乳牛の分泌した牛乳を原料にした食品を摂取したヒトにおいてアレルギー体質が改善されたと言う疫学的調査結果を説明する

可能性を示している。今後、食用微生物、例えばパン酵母を妊娠牛に免疫しておき、そのウシが分娩後に分泌した牛乳から IgG を調製してパン酵母とともに経口摂取すると液性免疫応答が抑制されることが確認されたならば、牛乳 IgG を積極的に花粉症の予防などの獲得液性免疫抑制食品素材として利用することが考えられる。

今後、牛乳 IgG の有する生体防御機能に関する科学的根拠が一層解明されることにより牛乳 IgG がヒトの健康維持のための機能性食品素材として利用されることは、牛乳たんぱく質の食品としての有効利用を目的として微力ながら 30 年来取り組んできた筆者の最も期待するところである。

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 文 献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) 大谷 元, ミルクサイエンス, **47**, 63 (1998)
- 2) M. Ruegg, U. Moor and B. Blanc: *J. Dairy Res.*, **44**, 509 (1977)
- 3) J. N. DeWit, G. Klatrbeek and E. Hontelez Back: *Neth. Milk Dairy J.*, **37**, 37 (1983)
- 4) P. Lindstrom, M. Paulsson, T. Nylander, U. Elofssce and H. Lindmark-Mansson: *Milchwissenschaft*, **49**, 67 (1994)
- 5) E. Li-Chan, A. Kummer, J. N. Losso, D. D. Kitts and S. Nakai: *Food Res Inter.*, **28**, 9 (1995)
- 6) T. Kobayashi, T. Ohmori, M. Yanai, G. Kawanishi, Y. Yoshikai and K. Nomoto: *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2265 (1991)
- 7) S. Murosaki, Y. Yoshiki, C. Kubo, A. Ishida, G. Matsuzaki, T. Sato, K. Endo and K. Nomoto: *J. Nutr.*, **860** (1991)
- 8) M. Facon, B. J. Skura and S. Nakai: *Food Agric. Immunol.*, **5**, 85 (1993)
- 9) W. Stepham, H. Dichtelmuler and R. Lissner: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **28**, 9 (1990)
- 10) H. Ohnuki and H. Otani: *Anim. Sci. J.*, **283** (2005)
- 11) W. L. DeLano, M. H. Ultsch, A. M. de Vos and J. A Wells: *Science*, **287**, 1279 (2000)
- 12) R. L. Shields, A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox and L. G. Presta: *J. Biol. Chem.*, **276**, 6591 (2001)
- 13) J. E. Butler: *Vet. Immunol. Immunopath.*, **4**, 43 (1983)
- 14) O. Rham and H. Isliker: *Archs Allergy Appl. Immun.*, **55**, 61 (1977)
- 15) J. H. Brock, F. R. Arzabe and A. Pineiro: *Immunology*, **32**, 207 (1976)
- 16) T. Ebina, A. Sato, K. Umezumi, N. Ishida, S. Ohyama, A. Oizumi, A. Aikawa, S. Katagiri, N. Katsushima, A. Imai, S. Kitaoka, H. Suzuki and T. Konno: *Med. Microbiol. Immunol.*, **74**, 177 (1985)
- 17) H. Meisel: *Alimenta* **1**, 3 (1987)
- 18) H. Brussow, H. Hnpert, I. Walther, J. Sidoti, C. Mietens and P. Bachmann: *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 982 (1987)

- 19) H. Hilpert, H. Brussw, C. Mietens, J. Sidoti, L. Lerner and H. Werchau: *J. Infect. Dis.* **156**, 158 (1987)
- 20) H. Ohnuki and H. Otani: *Milchwissenschaft*, **61**, 259 (2006)
- 21) E. Li-Chan, A. Kummer, J. N. Losso and S. Nakai: *Food Agric. Immunol.*, **6**, 443 (1994)
- 22) 仁木 達, 祐川金次郎: 栄養と食糧, **17**, 441 (1965)
- 23) 仁木 達, 祐川金次郎: 栄養と食糧, **17**, 434 (1965)
- 24) 仁木 達, 祐川金次郎, 繁田聡美: 栄養と食糧, **18**, 85 (1965)
- 25) 仁木 達, 祐川金次郎, 繁田晴美: 栄養と食糧, **18**, 90 (1965)
- 26) 祐川金次郎, 繁田晴美, 飯田広夫, 松田教夫, 大和田 寛, 長島 隆: 栄養と食糧, **20**, 9 (1967)
- 27) L. J. Saif, D. R. Redma, K. L. Smith and K. W. Theil: *Infection and Immunity*, **41**, 1118 (1983)
- 28) L. J. Saif, K. L. Smith, B. J. Landmeier, E. Bohl, K. W. Theil and D. A. Todhunter: *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 49 (1983)
- 29) M. Boesman-Finkelstein, N. E. Walton and R. A. Finkelstein: *Infection and Immunity*, **57**, 1227 (1989)
- 30) A. Galay, J. -M. Ferrara, J. -P. Felber and H. Schneider: *Am. Clin. Nutr.* **52**, 1014 (1990)
- 31) C. Mietens, H. Keinhorst, H. Hilpert, H. Gerber, H. Amster and J. Pahud: *Eur. J. Pediatr.* **132**, 239 (1979)
- 32) S. Tzipor, D. Roberton and C. Chapman: *Brit. Med. J.*, **71**, 293, 1276 (1986)
- 33) C. O. Tacket, G. Losonsky, H. Link, Y. Hoang, P. Guesry, H. Hilpert and M. M. Levine: *New England J. Med.*, **12**, 1240 (1988)
- 34) G. P. Davidson, P. B. D. Whyte, E. Darriels, K. Franklin, H. Nunan, P. I. McCloud, A. G. Moore and D. J. Moora: *Lancet*, **2**, 709 (1989)
- 35) M. M. Levine: *J. Pediatr.* **118**, 29 (1991)
- 36) 大谷 元, 大貫秀隆, 畑 勲: 機能的食品と薬理栄養 (日本機能的食品医学学会認定誌), **2**, 241 (2005)
- 37) A. J. Sharpe, G. D. Gamble and D. N. Sharpe: *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 924 (1994)
- 38) Usman and A. Hosono: *J. Dairy Sci.*, **82**, 243 (1999)
- 39) H. Ohnuki, A. Mizutani and H. Otani: *Int. Immunopharm.*, **6**, 1315 (2006)
- 40) A. Mizutani, H. Ohnuki, T. Kawahara and H. Otani: *Milchwissenschaft*, in press (2006)
- 41) M. Daëron: *Ann. Rev. Immunol.* **15**, 203 (1997)
- 42) J. Krutman, R. Kirnbauer, A. Köck, T. Schwarz, E. Schöpf, L. T. May, P. B. Sehgal and T. A. Luger: *J. Immunol.* **145**, 1337 (1990)
- 43) 大貫秀隆, 大谷 元: 日本畜産学会第106回大会講演要旨, 優秀発表賞応募講演 (ポスター) の項 p. 10 (2006)
- 44) M. F. Kagnoff and S. Campbell: *J. Exper. Med.* **139**, 398 (1974)
- 45) B. K. Flesch and J. Neppert: *J. Clin. Lab. Anal.* **14**, 141 (2000)
- 46) P. Vargas, C. Cortes, L. Vargas, M. Roseblatt, M. R. Bono: *Immunobiology*, **211** (2006)
- 47) K. M. Dhodapkar, J. L. Kaufman, M. Ehlers, D. K. Banerjee, E. Bonvini, S. Koening, R. M. Steinman, J. V. Ravetch, M. V. Dhodapkar: *PNAS*, **102**, 2910 (2000)
- 48) B. Heyman: *Immunology Today* **11**, 310 (1990)