

## チーズの抗腫瘍効果の検討Ⅱ

防衛医科大学校細菌学

助教授 鶴 純 明

### 実験調査項目

チーズおよびその成分蛋白による抗腫瘍効果

### 実験結果

別添の実験調査報告書のとおり

### 実験結果および考察

別添の別刷り（オンコロジア vol 21: 70-77, 1988）のとおり

### 実験調査報告書

悪性腫瘍の治療や予防における環境因子の一つとして食事の果たす役割が注目されるようになってきた。その一つとして長寿地域で習慣的に飲食されている牛乳や乳製品に関して、その摂取による発癌頻度が減少したり、腫瘍増殖が抑えられるという報告もみられる。我々も（昭和62年度委託研究）種々のチーズが種々のマウスと腫瘍の組み合わせで、30~70%の抗腫瘍効果のあることを観察している。これらの抗腫瘍効果の機序を検討するために、今回はチーズおよびその含有蛋白であるラクトフェリン、カゼインについての抗腫瘍効果を検討した。

チーズはその摂取期間に応じて、抗腫瘍効果を示し、チーズ摂取により血清鉄値の上昇が認められ、さらにこの血清を移入することにより、腫瘍増殖抑制効果が認められた。また鉄結合ラクトフェリンを静脈内または腹腔内に投与した場合、抗腫瘍効果は認められなかったが、経口投与した場合には抗腫瘍効果が認められた。さらにカゼイン蛋白とチーズの併用では腫瘍増殖抑制率が1週目で41%から68%に、2週目では54%から68%にチーズの抗腫瘍効果を増強した。チーズおよびラクトフェリン、カゼインの抗腫瘍効果と血清の鉄結合能と相関することから、チーズの抗腫瘍効果はトランスフェリンを介したエフェクターリンパ球の活性化機構による可能性が考えられる。

# チーズおよびその成分蛋白による Meth A 線維肉腫に対する抗腫瘍効果の検討

四ノ宮成祥\* 谷口真理子\* 島崎 英幸\*  
谷川 啓司\* 竹村 俊哉\* 次田 正\*  
鈴木 達夫\*\* 鶴 純明\*

**要旨** プロセスチーズおよびその含有成分の誘導体である鉄結合ラクトフェリン (Lf-Fe), カゼインリン蛋白 (Ca-CPP) の Meth A 腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討を行なった。チーズはその摂取期間に応じて、抗腫瘍効果を示した。チーズ摂取により血清鉄値の上昇が認められ、この血清を移入することにより、腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、Lf-Fe を静脈または腹腔内に投与した場合、抗腫瘍効果は認められなかったが、経口投与した場合には、増殖抑制効果が認められた。さらに、Ca-CPP 摂取時の腫瘍増殖抑制率は、1週目で 41.0% から 68.2% に、2週目では 54.3% から 67.6% に、チーズの抗腫瘍効果を増強した。チーズおよびラクトフェリン、カゼインの抗腫瘍活性は血清の鉄結合能と相関を示すことから、トランスフェリンを介したエフェクターリンパ球の活性化機構の可能性が示唆された。

## はじめに

癌発生頻度の地域差は、発癌の要因として、食事などの環境因子の重要性を示唆している。したがって、悪性腫瘍の治療や予防における食事の果たす役割についても、注目されるようになってきている。その一つとして、長寿地域で習慣的に飲食されている牛乳や乳製品に関して、その摂取により発癌頻度が減少したり<sup>1,2)</sup>、腫瘍増殖が抑えられる<sup>3,4)</sup>という報告がみられる。我々の実験においても、種々のチーズに関して、種々のマウスと腫瘍の組み合わせで、30~70% 程度の抗腫瘍効果のあることを観察している<sup>5)</sup>。これらの乳製品による腫瘍抑制効果は、その機序に関して、種々の面から検討されており、大腸内での carcinogen に関与する代謝物質が減少しているとする説<sup>6,7)</sup>や、ヨーグルトでは乳酸菌の cell wall に含まれる糖蛋白が immunomodulator として抗腫瘍活性に働いているという説<sup>8,9)</sup>などが挙げられている。今回我々は、チーズおよびその含有蛋白

であるラクトフェリン、カゼインについて抗腫瘍効果を検討し、ヨーグルトなどで知られている抗腫瘍効果とは異なる機序によることが示唆されたので報告する。

## 実験材料および方法

1. 動物: 近交系 BALB/c マウス雌性は、日本チャールスリバーから供給を受け、準無菌下で飼育し、8~10 週齢で使用した。実験は1群 10 匹で行ない、同一実験を3回繰り返した。
2. 食餌: 実験食としては、プロセスチーズ、粉末ヨーグルト (ナチュレ<sup>®</sup>) を雪印乳業より購入し、通常飼育食 (MF 飼料) と等量混合して用いた。食餌は自由摂取とし、摂取量は自動飲水量給餌量測定装置 (アクトレーサー<sup>®</sup>: 日東エアテック) にて測定した。1日食餌摂取量は、各群ともほぼ 3.5 g/匹であった。体重は各群とも実験期間中で有意差を認めなかった。
3. 腫瘍細胞: BALB/c 由来の Meth A 線維肉腫細胞<sup>10~12)</sup>は、同系マウスで腹水型として継代維持されたものを使用した。実験に際しては、Meth A 腫瘍細胞はハンクス液で浮遊させ、1×

\* 防衛医科大学校 細菌学講座

\*\* (社)北里研究所病院 バイオメディカル

$10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個/ml になるように調整して、0.1 ml ずつをマウス右腹側の皮下に接種した。

4. 腫瘍径の測定：それぞれの実験群について、腫瘍の大きさは、腫瘍接種後 7, 14, または 21 日目に、ノギスにより長径と短径を計測し、その長径×短径 ( $\text{mm}^2$ ) により求めた。また、抗腫瘍効果の指標として、抑制率 (Inhibition Ratio: IR) を次式により求めた。

$$\text{IR}(\%) = \frac{\text{普通食群の腫瘍の大きさ} - \text{実験食群の腫瘍の大きさ}}{\text{普通食群の腫瘍の大きさ}} \times 100$$

5. 血清鉄の測定：個々のマウスから血清を採取し、バンフェナントロリン直接法 (Fe B-Test キット<sup>®</sup>, 和光純薬) により測定した。

6. 各食餌を 2 週間摂取したマウスより採取した血清をプールし、腫瘍接種マウスの腹腔内へ腫瘍接種当日から 4 日間連続で、0.5 ml ずつ投与した。

7. Lf-Fe 投与方法：鉄結合ラクトフェリン (iron-saturated lactoferrin: Lf-Fe, 0.25  $\mu\text{g}$  Fe/mg protein) は、雪印乳業より供給を受けたものを使用した。投与方法は、経口投与 (飲用水に混じた場合と飼料に混じた場合)、腹腔内投与、静脈内投与の 3 種の投与方法を用いた。投与期間は、腫瘍接種 1 週間前から接種後 2 週間までとした。飲用水に混じた場合、濃度は Lf-Fe の飽和濃度に近い 700 mg/100 ml で自由に摂取させた。摂取量はアクトレーサーを用いて測定した。1 匹あたり平均 19.3 mg/日の Lf-Fe を摂取していた。飼料に混じた場合、粉末 MF 飼料と Lf-Fe を重量比で 3:1 (この混合比は予備実験によりマウスの体重や栄養状態に変化のないことを確認し決めた) に混合して自由に摂取させた。アクトレーサーによる測定では、1 匹あたり平均 1.0 g/日の Lf-Fe を摂取していた。腹腔内および静脈内に投与した場合、濃度は 1 mg/0.5 ml で連日投与した。この濃度は、腹腔内、静脈内に投与できる最大許容量であった。また、各群とも実験期間中を通じて、体重の著明な増加、減少は認められなかった。

8. Ca-CPP の投与方法：Ca-Casein Phosphopeptide (Ca-CPP) は精製 CPP に  $\text{Ca}^{++}$  を結合させたもので、明治製菓より供給を受けたものを使用した。実験食は、1) 普通食 (MF 飼料) + Ca-CPP (重量比 1:1)、2) プロセスチーズ、3) プロセスチーズ + Ca-CPP (重量比 1:1)、4) Ca-CPP の 4 群に分け、対照食としては普通食のみを与えた。各群は、腫瘍接種前 7 日間と接種後 14 日間の計 21 日間摂取させ、観察を行なった。1 日摂取量はいずれの群も平均約 3.7 g/匹であった。体重は 1) ~ 3) 群は実験期間中有意差を認めなかったが、4) のみは減少傾向が認められた。

9. 検定：統計学的検定は、Student's t-test に行かない、P が 0.05 以下のものを有意とみなした。

## 成績

### 1. チーズの Meth A 腫瘍に対する抗腫瘍効果

$1 \times 10^4, 1 \times 10^5, 1 \times 10^6, 1 \times 10^7$  個の Meth A 腫瘍細胞皮下接種後の腫瘍増殖に対するチーズ摂取効果について検討を行なった。 $1 \times 10^4$  個の腫瘍細胞接種の場合、対照群では生着が認められたのに対し、チーズおよびヨーグルト摂取群では全例に腫瘍の生着が認められなかった。 $1 \times 10^5, 1 \times 10^6$  個の場合には、対照群、投与群とも全例に生着が認められたが、対照群に比して有意な増殖抑制効果が認められた。 $1 \times 10^7$  個の大量接種では、チーズを腫瘍接種の前後に与えた群にのみ増殖抑制効果が認められた。また、腫瘍接種前の 7 日間の摂取でも、 $1 \times 10^5, 1 \times 10^6$  個には効果のあることがわかった (表 1)。

### 2. チーズ摂取マウスの血清鉄値と血清移入による抗腫瘍効果

表 2 に示すように、チーズ摂取群では著明な血清鉄値の上昇が認められた。血清を移入し各濃度の腫瘍接種に対する効果を見た。チーズ摂取群から採取した血清を移入した群では、 $1 \times 10^4, 1 \times 10^5$  個接種に対しては抑制効果が認められたが、 $1 \times 10^6, 1 \times 10^7$  個接種では有意な抑制効果を認

表 1 Effect of dairy products on Meth A tumor growth

| Exp. | Diet    | Feeding period   | Measurement | Tumor size (mm <sup>2</sup> ) (Mean IR (%)) |                     |                     |                   |
|------|---------|------------------|-------------|---|---------------------|---------------------|-------------------|
|      |         |                  |             | 1×10 <sup>4</sup>                           | 1×10 <sup>5</sup>   | 1×10 <sup>6</sup>   | 1×10 <sup>7</sup> |
| 1    | Cheese  | Day -7 to Day 0  | Day 7       | 0(100)***                                   | 13.0±1.9(76.4)***   | 63.1±13.4(22.6)*    | 110.0±15.4( 9.5)  |
|      | Yoghurt |                  |             | 0(100)***                                   | 25.4±2.0(54.0)***   | 70.0±7.0(14.1)*     | 115.2±15.7( 5.3)  |
|      | Control |                  |             | 5.8±1.5                                     | 55.2±1.4            | 81.5±7.8            | 121.6±11.0        |
| 2    | Cheese  | Day 0 to Day 21  | Day 21      | 0(100)***                                   | 177.1±26.0(38.1)**  | 351.3±27.5(16.7)*   | 450.4±51.2( 6.9)  |
|      | Yoghurt |                  |             | 0(100)***                                   | 200.8±14.5(29.8)**  | 283.4±66.9(32.8)**  | 490.0±25.8(-1.3)  |
|      | Control |                  |             | 200.5±28.0                                  | 285.9±50.1          | 421.6±73.2          | 483.5±32.6        |
| 3    | Cheese  | Day -7 to Day 21 | Day 21      | 0(100)***                                   | 120.2±12.3(59.2)*** | 160.0±15.1(65.9)*** | 385.1±48.2(22.1)* |
|      | Yoghurt |                  |             | 0(100)***                                   | 125.4±20.0(57.2)*** | 189.7±44.8(59.6)*** | 480.3±51.5( 2.9)  |
|      | Control |                  |             | 195.1±17.0                                  | 294.5±25.0          | 469.4±50.0          | 494.4±25.4        |

1×10<sup>4</sup>, 1×10<sup>5</sup>, 1×10<sup>6</sup>, 1×10<sup>7</sup> tumor cells were inoculated subcutaneously in the flank of BALB/c mice.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

IR (%)=(Tumor size of control mice-Tumor size of dairy products fed mice)/Tumor size of control mice ×100

表 2 Effect of serum transfer on tumor growth

| Transferred sera            | Serum iron (μg/dl) | Tumor size (mm <sup>2</sup> ) (Mean IR (%)) |                   |                   |                   |
|-----------------------------|--------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
|                             |                    | 1×10 <sup>4</sup>                           | 1×10 <sup>5</sup> | 1×10 <sup>6</sup> | 1×10 <sup>7</sup> |
| Serum from cheese fed mice  | 424.5±23.0         | 0 (100)*                                    | 4.0±1.2(67.2)*    | 70.4±22.0( 7.3)   | 119.2±12.1( 8.3)  |
| Serum from yoghurt fed mice | 101.4± 8.6         | 5.1±5.0( 5.6)                               | 12.2±1.7(0)       | 80.0±15.1(-5.4)   | 135.4±10.0(-4.2)  |
| Serum from normal mice      | 127.1±14.2         | 5.2±2.0( 3.7)                               | 11.7±1.2( 4.1)    | 82.5± 5.1(-8.7)   | 125.5±12.5( 3.5)  |
| Not transferred             | —                  | 5.4±3.8                                     | 12.2±1.5          | 75.9±10.0         | 130.0±20.8        |

Various numbers of Meth A tumor cells were inoculated subcutaneously. 0.5 ml of sera were transferred intraperitoneally for 4 days repetitively from the day of tumor inoculation. Tumor size was measured 7 days after tumor injection.

\*p<0.001

めなかった。これに対して、ヨーグルト摂取群から採取した血清を移入した群では、全く抗腫瘍効果は認められなかった。

### 3. Lf-Fe の抗腫瘍効果

Lf-Fe を飼料に混じた場合、図 1 に示すように、1×10<sup>6</sup> 個の Meth A 腫瘍を接種した場合、7 日目の腫瘍の大きさは対照群で 72 mm<sup>2</sup>、Lf-Fe 投与群では 64 mm<sup>2</sup> で有意差は認められなかったが、14 日目では対照群の 137 mm<sup>2</sup> に対して Lf-Fe 投与群では 96 mm<sup>2</sup> と有意差が認められた。また、この抑制効果は 21 日後でも認められた。

飲用水に混じた場合、7 日目の腫瘍の大きさは

対照群で 76 mm<sup>2</sup> であったが、Lf-Fe 投与群でもほぼ同様の大きさを示した。また、14 日後、21 日後でも対照群と Lf-Fe 投与群との間に腫瘍の大きさに有意差は認められなかった。

また、腹腔内および静脈内投与の場合には、7 日目では対照群、Lf-Fe 投与群ともに腫瘍の大きさは 50 mm<sup>2</sup> 前後で、有意差は認められなかった。また、14 日後、21 日後についても同様に有意差は認められなかった。

### 4. Lf-Fe 投与による各種濃度の Meth A 腫瘍に対する増殖抑制効果

表 3 に示すように、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup> 個の Meth A 腫瘍接種後、Lf-Fe を飼料に混じた群で

は、いずれも有意な増殖抑制率が認められたが、飲用水に混じた群、腹腔内、静脈内に投与した群

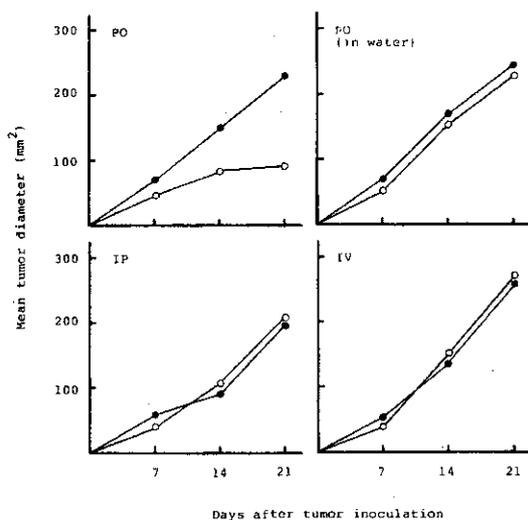


図1 Effect of iron-saturated lactoferrin (Lf-Fe) on Meth A tumor growth when administered orally (po, po in water), intraperitoneally (ip) and intravenously (iv). Mice were injected with  $1 \times 10^6$  tumor cells and tumor size was measured 7, 14 and 21 days after. Control (●); Lf-Fe administered (○).

では、抗腫瘍効果は認められなかった。また、Lf-Fe 投与 14 日後の血清鉄は、飼料に混じた場合にのみ有意な上昇が認められた。

### 5. Ca-CPP 摂取による抗腫瘍効果

Ca-CPP のみを単独で摂取させた場合、摂取後 7 日目より徐々に死亡し、14 日以内には全例死亡した。これは、Ca-CPP 単独摂取では、良好な栄養状態を保てないためであろうと考えられた。

そこで、普通食と Ca-CPP 混合摂取による抗腫瘍効果の検討を行なった。表 4 に示すように、対照である普通食群の腫瘍の大きさは、腫瘍接種後 7 日目で  $1 \times 10^5$  個接種の場合  $52.4 \text{ mm}^2$ 、 $1 \times 10^6$  個で  $64.0 \text{ mm}^2$ 、 $1 \times 10^7$  個で  $102.4 \text{ mm}^2$  であった。これに対し、普通食+Ca-CPP (混合食) 群では、各濃度とも対照に比して有意差は認められなかった。

次に、チーズと Ca-CPP 混合摂取による抗腫瘍効果の検討を行なった。チーズ単独摂取群では、表 4 に示すように、腫瘍の大きさは  $1 \times 10^5$  個が  $15.1 \text{ mm}^2$ 、 $1 \times 10^6$  個が  $37.8 \text{ mm}^2$ 、 $1 \times 10^7$  個が  $81.5 \text{ mm}^2$  で、抑制率もそれぞれ 71.2%、41.0%、20.4% と有意な抗腫瘍効果が認められ

表 3 Effect of LF-Fe administration on tumor growth

| Exp. | Administration   | Serum iron ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) | Tumor size ( $\text{mm}^2$ ) (Mean IR (%)) |                        |                        |
|------|------------------|--|--|------------------------|------------------------|
|      |                  |  | $1 \times 10^5$                            | $1 \times 10^6$        | $1 \times 10^7$        |
| 1    | Control          | 120 $\pm$ 10                           | 97.4 $\pm$ 13.0                            | 137.6 $\pm$ 12.8       | 285.4 $\pm$ 21.3       |
|      | LF-Fe (po)       | 272 $\pm$ 35                           | 65.4 $\pm$ 12.0(32.9)*                     | 96.0 $\pm$ 11.7(30.7)* | 251.2 $\pm$ 15.0(12.0) |
| 2    | Control          | 125 $\pm$ 14                           | 100.2 $\pm$ 6.0                            | 157.5 $\pm$ 13.3       | 281.3 $\pm$ 17.3       |
|      | LF-Fe (in water) | 130 $\pm$ 10                           | 98.5 $\pm$ 5.0(1.7)                        | 156.6 $\pm$ 22.3(0.6)  | 280.0 $\pm$ 14.4(0.5)  |
| 3    | Control          | 122 $\pm$ 11                           | 74.0 $\pm$ 1.1                             | 95.0 $\pm$ 23.1        | 250.0 $\pm$ 25.0       |
|      | LF-Fe (ip)       | 120 $\pm$ 15                           | 70.0 $\pm$ 7.0(5.4)                        | 102.0 $\pm$ 17.5(-7.4) | 248.3 $\pm$ 23.2(0.7)  |
| 4    | Control          | 127 $\pm$ 15                           | 95.1 $\pm$ 15.0                            | 153.4 $\pm$ 46.8       | 290.0 $\pm$ 25.3       |
|      | LF-Fe (iv)       | 125 $\pm$ 10                           | 93.3 $\pm$ 13.5(1.9)                       | 158.2 $\pm$ 67.2(-3.4) | 285.4 $\pm$ 24.8(1.5)  |

Varying numbers of Meth A tumor cells were injected subcutaneously in the flank of BALB/c mice and tumor size was measured 14 days after tumor inoculation.

\* $p < 0.005$

表 4 Antitumor activity of cheese and cheese plus Ca-CPP

| Diet             | Tumor size (mm <sup>2</sup> ) (Mcan IR (%)) |                   |                   |
|------------------|---|-------------------|-------------------|
|                  | 1×10 <sup>5</sup>                           | 1×10 <sup>6</sup> | 1×10 <sup>7</sup> |
| Control          | 52.4±7.5                                    | 64.0±9.8          | 102.4±10.0        |
| Control + Ca-CPP | 50.3±6.6(4.0)                               | 61.3±7.5(4.2)     | 100.9±14.1(1.4)   |
| Cheese           | 15.1±2.0(71.2)***                           | 37.8±5.5(41.0)**  | 81.5±7.5(20.4)*   |
| Cheese + Ca-CPP  | 8.5±2.5(83.8)***                            | 20.0±6.0(68.8)*** | 54.2±8.2(47.1)**  |

Meth A tumor cells were injected subcutaneously in flank of BALB/c mice and tumor size was measured 7 days after tumor inoculation.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

た。また、この効果は1×10<sup>7</sup>個腫瘍接種後2週目でも持続していた(図2)。チーズ+Ca-CPP(混合食)群では、腫瘍の大きさはチーズ単独摂取群よりさらに抑制されており、抑制率もそれぞれ83.8%、68.8%、47.1%と著明な抗腫瘍効果が認められた(表4)。さらに、1×10<sup>7</sup>個腫瘍接種後のチーズ単独摂取群とチーズ+Ca-CPP群の2群の間で比較すると、単独摂取群に対して、混合摂取群では、腫瘍接種後1週目で47.8%、2週目で29.1%と有意な抑制率増強効果が認められた(図2)。

考 察

我々は、腫瘍免疫の解析にしばしば用いられるMeth A腫瘍-BALB/cマウスの同系の組み合わせを用いて、チーズおよびその含有蛋白成分の誘導体の腫瘍抑制効果の検討を行なった。表1に示すように、チーズ摂取により21日後の計測で腫瘍増殖抑制効果が認められている。7日間の前摂取の後腫瘍を移植した系においても、腫瘍数の少ないものでは、明らかな増殖の抑制作用が認められている。また、前摂取と腫瘍移植後の摂取の両方を行なった場合には、さらに大きな抑制効果が認められた。これらのことから、チーズは腫瘍の増殖に対して、抑制的効果があると共に、予防的な効果も有するものと考えられた。これらに加え

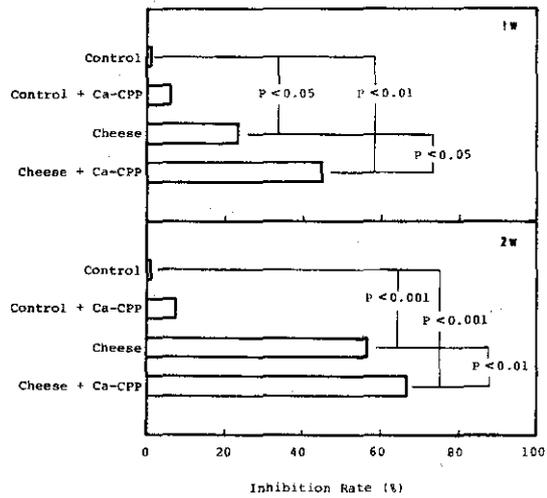


図2 Augmentation of antitumor effects in cheese fed mice by orally administration of Ca-CPP. Inhibition rate was measured on one and two weeks, and calculated by the following formula:

$$IR(\%) = \frac{\text{Tumor size in control group} - \text{Tumor size in exp. group}}{\text{Tumor size in control group}} \times 100$$

て、表には示していないが、Meth Aを移植された同系のマウスには、生存期間にも有意な延命効果が観察された。

そこで、チーズによる腫瘍増殖抑制効果がどのような機序によるものかについて、検討を加えた。ヨーグルトにはほとんど含まれていないが、チー

ズには多量のラクトフェリン (Lf) が含有されており、鉄イオンはこの Lf と結合した形で見出される。Lf は小腸における鉄イオンの吸収に大きな役割を果たしており、無機鉄イオン単独に比べてはるかに多くの鉄イオンを吸収させるのに役立っている可能性が考えられる。そこで、血清中の鉄イオン-トランスフェリン複合体 (Tf-Fe) の指標となる血清鉄<sup>13)</sup>を測定したところ、表 2 に示すように、チーズ摂取マウスで有意な増加が認められた。

Tf は細胞の増生に必須のファクター<sup>14)</sup>で、鉄イオンを血漿中から細胞内へと運ぶ際の担体の役割を果たしている<sup>15)</sup>。Tf は PHA によるリンパ球芽球化反応を増強し<sup>16)</sup>、また、PHA により刺激を受けたリンパ球は、細胞表面に Tf に対するレセプター (Tf-R) を表出する<sup>17)</sup>。鉄イオンの免疫担当細胞での役割に関しては、いくつかの報告があり、活性化リンパ球の増殖促進や、killer T 細胞による細胞障害作用への関与が考えられている<sup>18)</sup>。これらのことは、脂質の過酸化による活性酸素の生成に鉄イオンが必要であることや、細胞内もしくは細胞膜での鉄イオン動員は細胞障害活性を亢進させること<sup>18)</sup>、Natural Killer (NK) 細胞による細胞障害が、Tf-Fe の添加により亢進する<sup>19)</sup>ことから裏づけられている。

鉄イオン動員の窓口となるのは、細胞膜にある Tf-R であるが、これは OKT 9 モノクローナル抗体で認識される部位であることが明らかとなり<sup>20)</sup>、活性化リンパ球の指標として用いられている。また、Tf-R は DNA 合成に先立って増加することが知られており<sup>21)</sup>、S、G<sub>2</sub>+M 期に OKT 9<sup>+</sup> 細胞が増えることも報告されている<sup>22)</sup>。Tf-R は Tf-Fe とのみ特異的に結合することが知られており<sup>23)</sup>、腸管から吸収された鉄が、血中の Tf と結合し、その Tf-Fe が NK 細胞と腫瘍細胞との架橋を形成することによって、NK 細胞の抗腫瘍効果を増強するものと考えられる<sup>24,25)</sup>。このように、チーズによって吸収の亢進した鉄イオンは、血中では Tf-Fe の形で存在するものと考えられ、これにより免疫担当細胞が活

性化されることが示唆される。

そこで次に、鉄結合ラクトフェリン (Lf-Fe) を投与して、移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討した。表 3 に示すように、腹腔内、静脈内投与の場合には、有意な抗腫瘍効果は認められなかった。このことは、血中に入った Lf-Fe が直接的に、Tf-Fe が示すようなメカニズムによって抗腫瘍効果を示すことはないことが示唆された。血中では、Lf に結合している鉄の結合状態は非常に強固であるため、通常鉄は Lf の蛋白分子から遊離し難く<sup>26)</sup>、従って、Tf と結合する形で存在する鉄の量も増加しない。これに対して、Lf-Fe を飼料中に混じて投与した群では、有意な血清鉄の増加や、抗腫瘍効果が認められた。Lf の蛋白分子の分子量が、8 万ダルトン程度であることを考慮に入れば、Lf-Fe がそのまま吸収されるとは考え難く、代謝の過程において、トリプシンなどの酵素で分解を受け<sup>27)</sup>、消化管内で変化した Lf-Fe の鉄が、何らかの作用で腸管より吸収され、血中の Tf-Fe の濃度を上昇させるものと思われる。Lf-Fe の腸管からの鉄の吸収を助ける作用は、その摂取量に左右されるので、Lf-Fe を飲用水に混じた場合に抗腫瘍効果が認められなかったのは、飲用水に混じて摂取させた数 10 mg 程度の投与量では、抗腫瘍効果をあげるのに十分だけの鉄を吸収させることができないためと考えられる。すなわち、Lf-Fe はそれ自体には抗腫瘍効果はないが、腸管からの鉄の吸収を増強して、Tf-Fe の血中濃度を上昇させることによって、抗腫瘍効果を示すと考えられる。これは、チーズの抗腫瘍効果が、チーズ中に多く存在する Lf によることを示唆するものである。

さらに我々は、鉄を可溶化し腸管での吸収を高めるといわれる Casein Phosphopeptide (CPP)<sup>28)</sup> を用いて、移植腫瘍に対するチーズの抗腫瘍効果を、CPP がどの程度増強するか否かを検討した。表 4 および図 2 からわかるように、普通食+Ca-CPP (混合食) 群と普通食群の間で腫瘍の抑制率に差は認められず、Ca-CPP 自体に抗腫瘍効果はない。これに対して、チーズ単独摂取群と

チーズ+Ca-CPP (混合食) 群での抗腫瘍効果を比較すると、チーズ+Ca-CPP 群において、より強い抗腫瘍効果が認められたことから、Ca-CPP にチーズの抗腫瘍効果を増強させる作用のあることが示唆された。すなわち、Ca-CPP の腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果の増強は、普通食に含まれる無機鉄の吸収ではなく、チーズに含まれる鉄結合蛋白の吸収に有効に働いて、チーズの抗腫瘍効果の主体である Tf をより増加させて、NK 細胞の作用を活性化しているものと考えられる。

以上、今回の一連の実験について、抗腫瘍効果の検討を加えたが、チーズによる腫瘍増殖抑制効果についての大きな役割を担っているものは、おそらく、成分中の Lf にあるものと考えられる。ヨーグルトに関しては、血清移入の結果などから、チーズとは別の機序が考えられ、多糖体などによる immunomodulation<sup>8,9)</sup>が推定される。

#### 文 献

- 1) Hirayama, T.: An epidemiological study on the effect of diet, especially of milk, on the incidence of stomach cancer. Abstr. IX International Cancer Congress: 713, 1966.
- 2) IARC Intestinal Microecology Group: Dietary fibre, transit time, fecal bacteria, steroids, and colon cancer in two Scandinavian populations. *Lancet*, 2: 207-211, 1977.
- 3) Jacquet, J., Huynh, C. H. and Saint, S.: Nutrition and experimental cancer. *Dairy Sci. Abstr.*, 31: 204, 1969.
- 4) Reddy, G. V., Friend, B. A., Shahani, K. M. and Farmer, R. E.: Antitumor activity of yoghurt components. *J. Food Protection*, 46: 8-11, 1983.
- 5) Shinomiya, N., Taniguchi, M. and Tsuru, S.: Inhibition of tumor growth by dairy products. Abstr. XIV International Cancer Congress, 3: 814, 1986.
- 6) Goldin, B. R., Gorbach, S. L.: Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer*, 40: 2421-2426, 1977.
- 7) Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M. and Gorbach, S. L.: Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 64: 255-261, 1980.
- 8) Bogdanov, I. G., Dalev, P. G., Gurevich, A. I., Kolosov, M. N., Malkova, V. P., Plemyanikova, L. A. and Sorokina, I. B.: Antitumor glycopeptide from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Lett.*, 57: 259-261, 1975.
- 9) Shiomi, M., Sakai, K., Murofushi, M. and Aibara, K.: Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, 35: 75-80, 1982.
- 10) Tsuru, S., Oguchi, Y., Morita, I., Fujii, T., Matsunaga, K., Yoshikumi, C., Hotta, T. and Nomoto, K.: Involution of the thymus in tumor-bearing mice and its restoration by PSK. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 11: 43-46, 1983.
- 11) Tsuru, S., Nomoto, K., Taniguchi, M., Kitani, H., Watanabe, M. and Zinnaka, Y.: Depression of macrophage functions and T cell-mediated immunity to *Listeria* infection in tumor-bearing mice and its prevention by PSK. *Cancer Immunol. Immunother.*, 18: 160-163, 1984.
- 12) Tsuru, S., Nomoto, K., Taniguchi, M., Fujisawa, H. and Zinnaka, Y.: Depression of protective mechanism during the early phase of a viral infection in tumor-bearing mice and prevention by PSK. *Cancer Immunol. Immunother.*, 22: 114-118, 1986.
- 13) Short, L. F., Murray, G. F., Uptagrafft, W. R., Weissbach, S. G. and Polk, H. C.: Transferrin level driven from total iron-binding capacity: Is it a reliable relationship? *Am. J. Surgery*, 148: 621-623, 1984.
- 14) Barnes, D. and Sato, G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Analytical Biochem.*, 102: 255-270, 1980.
- 15) Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Cook, J. D. and Finch, C. A.: Iron Metabolism in Man. Blackwell Scientific Publications, St. Louis, 1979.
- 16) Tormey, D. C. and Mueller, G. L.: Biological effects of transferrin on human lymphocytes in vitro. *Exp. Cell Res.*, 74: 220-226, 1972.
- 17) Galbraith, R. M., Werner, P., Armand, P. and Galbraith, G. M. P.: Transferrin binding to peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin involves a specific receptor. *J. Clin. Invest.*, 66: 1135-1143, 1980.
- 18) 高後 裕, 漆崎一郎: トランスフェリン・レセプターの構造と機能. *Med. Immunol.*, 10: 161-171, 1985.
- 19) Kohgo, Y., Ikeda, A., Sasagawa, Y.: Augmentation of natural killer cell activity by human diferric transferrin. In: Natural killer activity and its regulation (Hoshino, T. ed.). *Excerpta Medica (International Congress Series No. 641)*: 239-244, 1983.
- 20) Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R. and Greaves, M.: Structural features of the cell sur-

- face receptor for transferrin that is recognized by monoclonal antibody OKT 9. *J. Biol. Chem.*, 257 : 8516—8522, 1982.
- 21) Hamilton, T. A. : Regulation of transferrin receptor expression in Concanavalin A stimulated and gross virus transformed rat lymphoblasts. *J. Cell. Physiol.*, 113 : 40—46, 1982.
  - 22) 漆崎洋一 : ヒト培養細胞株の transferrin receptor に関する研究. *札幌医誌*, 52 : 269—283, 1983.
  - 23) 漆崎一郎, 漆崎洋一, 高後 裕, 細胞増殖と Transferrin receptor. *Oncologia*, 5 : 109—120, 1983.
  - 24) Baines, M. G., Laffleur, F. L. and Holbein, B. E. : Involvement of transferrin and transferrin receptors in human natural killer effectors : target interaction. *Immunol. Lett.*, 7 : 51—55, 1983.
  - 25) Alarcon, B. and Fresno, M. : Specific effect of antitransferrin antibodies on natural killer cells directed against tumor cells. Evidence for the transferrin receptor being one of the target structures recognized by NK cell. *J. Immunol.*, 134 : 1286—1291, 1985.
  - 26) Birgenes, H. S. : The biological significance of lactoferrin in haematology. *Scand. J. Haematol.*, 33 : 225—230, 1984.
  - 27) 鈴木 隆, 野中真弓, 清沢 功, 小笠勝啓 : 人乳および牛乳ラクトフェリンのペプシンによる加水分解. *栄養と食糧*, 31 : 395—403, 1978.
  - 28) 柴田利章, 大塚隆一, 日高秀昌, 牧野義彰, 友安 茂, 鶴岡延薫 : カゼインホスホペプチドの鉄可溶化及び吸収促進作用に関する研究. *日本血液学会雑誌*, 48 : 603, 1985.

#### Summary

[*Oncologia*, 21—6 : 70~77, 1988]

**Suppressive effect on Meth A tumor cells by cheese and their derivative proteins**

Nariyoshi Shinomiya, Mariko Taniguchi, Hideyuki Shimazaki, Keishi Tanigawa, Toshiya Takemura, Masashi Tsugita\*, Tatsuo Suzuki\*\*, and Sumiaki Tsuru\*

\**Department of Microbiology, National Defense Medical College*

\*\**Department of Biomedical, Kitasato Institute Hospital*

Anti-tumor effect of dairy products including processed cheese and derivative proteins, such as iron-bound lactoferrin (Lf-Fe) and Ca-Casein Phosphopeptide (Ca-CPP), was investigated by use of Meth A fibrosarcoma cell-BALB/c mice combination system. Cheese showed a suppressive effect on tumor growth in proportion to the feeding periods. Serum iron level in mice fed cheese increased compared to mice fed yoghurt or control chow. And transfer of this serum showed the protective effect against inoculated tumor cells. Lf-Fe which was contained in cheeses abundantly stimulated the intestinal absorption of iron and increased serum iron level only in oral administration. Suppression of tumor cell growth was observed only when the serum iron level was raised. Moreover, Ca-CPP which makes ferric iron soluble and increases iron absorption in the intestinal tract also enhanced antitumor activity in cheese fed mice.

These results indicated that cheese enhanced the iron absorption to raise serum iron level. It was suggested that suppressive effect against tumor growth was mediated by effector cells recognizing transferrin receptor via iron-saturated transferrin which reacts with target tumor cells.

**Key words :** Dairy products, Tumoricidal activity, Transferrin, Serum iron

(受付 : 1988. 4. 11)