

牛乳・乳製品摂取が身体活動・加齢に伴う 免疫機能の変化に及ぼす影響

独立行政法人 国立健康・栄養研究所 健康増進研究部 樋口 満

要 約

高齢者は感染症に罹りやすく、感染した場合はそれが原因で死に至ることがしばしばある。それは、加齢に伴い免疫機能が低下するためではないかと考えられている。一方、運動は、高齢者の免疫機能保持のために重要であると推察されるが、運動が高齢者の免疫機能に及ぼす影響については、未だ十分に検討されていない。特に、運動が免疫機能に及ぼす影響に関するヒューマン・スタディは、国の内外でもほとんどなされていない。昨年我々は、4～5年にわたり継続して水泳トレーニングを行ってきた高齢女性の安静時NK細胞傷害活性は、運動習慣のない高齢女性に比べて有意に高いことを示した。先行研究によれば、高強度と低強度の運動では免疫機能が低下するが、中等度の運動では免疫機能が亢進する (Nieman DC, 1994) ことが明らかにされている。一過性の中等度運動を行った場合であっても、運動直後にNK細胞数が増加し、NK細胞傷害活性も増加するが、細胞あたりで補正すると、NK細胞傷害活性は変化しないかむしろ低下する (Pedersen BK, 1998)。運動を生体への一種のストレスと考えた時、日常的に運動トレーニングを行っている者は、一過性の運動による機能抑制状態を免れ易いのではないかと予測される。そこで、「一過性の中等度運動を行った時、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて、運動直後の細胞あたりのNK細胞傷害活性の低下が低く抑えられるのではないか」という仮説をたて、次の試験を行った。日常的に中程度の運動を行っている高齢女性 (高齢運動群) (n=9, 年齢: 62±3歳, 最大酸素摂取量 (VO₂max): 31±3 ml/kg/分)、日常的に運動を行っていない同年齢女性 (高齢コントロール群) (n=13, 62±4歳, 28±3 ml/kg/分)、日常的に運動を行っていない若年齢女性 (若齢群) (n=10, 26±3歳, 38±4ml/kg/分) の3群について、一過性運動 (トレッドミル歩行で60%VO₂maxを30分間) の運動前、運動直後、運動2時間後のNK細胞傷害活性の比較を行った。その結果、一過性の運動を行った直後の、NK細胞数とNK細胞傷害活性は、高齢運動群、高齢コントロール群、若齢群3群ともに増加するが、NK細胞あたりのNK細胞傷害活性は、若齢群と高齢コントロール群では、運動直後に低下する。高齢運動群はむしろNK細胞あたりのNK細胞傷害活性が増加し、一過性の運動負荷というストレスに対する免疫反応の低下状態を免れた。これにより、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて運動直後の免疫状態の低下を免れやすいことが示唆された。

(キーワード) 免疫機能・高齢者・運動・トレーニング

1. はじめに

高齢者は感染症に罹りやすく、感染した場合はそれが原因で死に至ることがしばしばある。それは、加齢に伴い免疫機能が低下するためではないかと考えられている。一方、運動は、高齢者の免疫機能保持のために重要であると推察されるが、運動や栄養が高齢者の免疫機能に及ぼす影響については、未だ十分に検討されていない。特に、これらが免疫機能に及ぼす影響に関するヒューマン・スタディは、国の内外でもほとんどなされていない。そこで、本研究は、高齢者における運動習慣の有無や、栄養摂取の状況が、その免疫機能に及ぼす影響を検討することを目的とした。本研究報告は、3年間に渡る貴協会の研究助成によるものであり、関連した3つの研究から構成したものである。

(研究1) 加齢とともに変化する免疫機能は、抗体や補体などの体液性免疫よりも、リンパ球、マクロファージなどを中心とする細胞性免疫の変化が著しいことが知られている。中でも、リンパ球幼若化能の低下 (13)、成熟T細胞 (CD3+) の数の減少 (8)、T細胞のうちヘルパーT細胞 (CD4+) の割合の増加もしくは維持、またT細胞のうちキラーT細胞 (CD8+) の割合の減少、ヘルパーT細胞のうちTh1の割合の減少、Th2の割合の増加、さらにメモリー細胞 (CD45RO) の増加、ナイーブ細胞 (CD45RA) の減少 (8) など、T細胞に関連する免疫機能の変化は、加齢にともない顕著である。このような加齢にともなうT細胞の変化は、さらにIL-2産生の低下 (2)、IL-3, IL-4産生の増加 (2)、IL-6産生の増加 (2) をもたらすことが報告されている。そこで、栄養摂取の状況が良く、日常的に運動を行っている高齢者のT細胞に関連した免疫反応を、日常的に運動を行っていない若齢者の免疫反応と比較した。その結果、①栄養摂取の状況が良く、日常的に運動を行っている高齢者であっても、リンパ球幼若化能は、若齢者より低く、リンパ球幼若化能は栄養状態や運動習慣よりもむしろ加齢に伴う影響を受けやすいことが示唆された。

そこで、次に、運動によって最も変化しやすいナチュラル・キラー (NK) 細胞と、高齢者の栄養状態や運動習慣がその免疫機能に及ぼす影響を検討した。

(研究2) 日常的に運動を行っている高齢女性、運動を行っていない同年齢の女性、また運動を行っていない若い女性を対象に、その栄養と免疫機能を横断的に比較検討した。社会経済状態がほぼ同じと考えられる高齢女性 (62±3歳 vs. 65±4歳; 運動群vs.非運動群) を対象に1年間以上の水泳トレーニング (1回の練習; 90分, 1500m, 75-80%HRmax) を週平均1.2回行った運動群、行わなかった非運動群に分け、さらに若者群を加えて次の項目を測定した。持久性の指標である最大酸素摂取量 (VO2max)、筋力の指標である脚伸展力、栄養状態、T細胞機能としてPHA刺激によるリンパ球の幼若化機能、CD3陽性T細胞数、CD4/CD8比、NK細胞傷害活性などである。なお、被験者の栄養状態については、3日間の食事を秤量法により調査し、さらに血中の栄養状態も同時に測定した。その結果、①4～5年にわたり継続して水泳トレーニングを行ってきた高齢女性のNK細胞傷害活性は、運動習慣のない高齢女性に比べて有意に高かった。②NK細胞傷害活性と呼吸循環器系機能の指標であるVO2maxとが有意な正の相関を示した。

以上のことから、高齢者の運動習慣とNK細胞傷害活性とが関連することが示唆された。高齢者の運動習慣とNK細胞傷害活性とをさらに検討するため、安静時のNK細胞傷害活性だけでなく、運動時のNK細胞傷害活性について検討を加えた。

(研究3) 先行研究によれば、高強度と低強度の運動では免疫機能が低下するが、中等度の運動では免疫機能が亢進する (Nieman DC. 1994)。これは、一過性高強度運動直後のNK細胞傷害活性が一時的に低下することが関連するのではないかと推測されている (Pedersen BK. 1998)。そこで、一過性の中等度運動を行った時、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて運動直後のNK細胞傷害活性の低下状態を免れやすいのではないかと予測した。これを検証するため、日常的に中程度の運動を行っている高齢女性、日常的に運動を行っていない同年齢女性、日常的に運動を行っていない若年齢女性の3群について、一過性運動(トレッドミル歩行で60%VO₂maxを30分間)の運動前、運動直後、運動2時間後のNK細胞傷害活性の比較を行った。

よって、本研究は「一過性の中等度運動を行った時、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて運動直後のNK細胞傷害活性の低下状態を免れやすい」という仮説を検証することを目的とする。

2 方法

2-1. 対象

研究の対象は、日常的に運動習慣を持つ高齢女性(高齢トレーニング群)9名(58~68歳、平均±標準誤差:62±3歳)、運動習慣のない高齢女性(高齢コントロール群)13名(58~68歳、62±4歳)、運動習慣のない若年齢女性(若年齢コントロール群)10名(22~30歳、26±3歳)である。各群の身体組成は(Table 1)に示した。高齢トレーニング群は、地域のウォーキングクラブに所属し、毎日3~5kmのウォーキングトレーニングを行い、さらに約6~7km/hの速度で10km程度のウォーキングを週1回行っている。被検者は、さらに次の5つの基準を満たすことを条件とした。(1)慢性疾患の病歴がなく、現在心臓病や癌に罹患している兆候のないもの。(2)免疫機能に影響を及ぼす可能性のある薬を服用していないこと。(3)過去1年以内に健康診断を受け、医師により研究参加の承認を受けていること。(4)慢性的痛み、睡眠障害、重篤なアレルギー疾患、心身症ではないこと。(5)非喫煙者であること。以上の5基準である。実験にあたり、被検者全員に実験の主旨を説明し、参加の同意を得た。なお、本研究は、独立法人国立健康・栄養研究所の倫理委員会の審査を受け、承認されたものである。

持久性体力の指標となる最大酸素摂取量は、漸増負荷トレッドミル歩行により測定した。

2-2. 研究デザイン

60%VO₂max負荷のトレッドミル歩行を30分間行い、運動負荷前後、2時間後の3回採血を行う。採取した血液より、次の免疫反応を測定する。(1)NK細胞活性(2)マイトジェン刺激リンパ球幼若化反応

2-3. 採血、末梢血単核細胞 (BMNC) の精製

採血は、肘正中皮静脈より採取し、赤血球、白血球数、リンパ球数、モノサイト数、および好中球数の測定を外部検査会社 (株式会社SRL) に委託した。BMNCの分離は、比重勾配遠心法を用いた。LeucoSep tubes (Greiner, Frickenhausen, Germany)を用い、Lymphoprep (Nyegaard, Oslo, Norway) 20mlにヘパリン5U/ml (NOVO, Copenhagen, Denmark)を含む全血を加え、2800rpm, 20°C, 20minで遠心分離した。分離させたBMNCはRPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) で3回洗浄した。

2-4. NK細胞傷害活性 (NK細胞活性)

BMNCのNK細胞傷害活性は、ターゲット細胞としてK-562を用い、⁵¹Crによって細胞傷害活性を決定した。エフェクター細胞としてBMNC (5×10^6 cells/ml) を、ターゲット細胞としてK-562細胞 (10×10^4 cells/ml) をそれぞれ100mlずつround-bottomのマイクロプレートで培養した。培養は、5% CO₂, 95% O₂, 100% humidity 37°Cで4時間行った。エフェクター細胞とターゲット細胞との比率は50:1であった。培養後、上清をLumaPlate (TopCount, Packard, CT, USA) に移し、乾燥させた後、シンチレーションカウンター (TopCount, Packard, CT, USA) で⁵¹Crを測定した。測定値は、さらに%lysisを計算し、⁵¹Crが放出された比率を次の式により求めた。

$$\%lysis = \frac{(\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release})}{(\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release})} \times 100\%$$

最大値には、10% Triton X-100を用いた。

2-5. マイトジェン刺激リンパ球幼若化反応

BMNCを10%仔牛血清 (FCS; Fatal Calf Serum) を加えたRPMI1640培地で96穴round bottomマイクロプレートを用いた。マイクロプレート1穴に 3.3×10^5 cells/mlの濃度の細胞浮遊液を180ml、マイトジェンとしてフィトヘマグルチニン (PHA) を20ml加え、37°C, 5% CO₂, 95% O₂, 100% humidityで72時間培養した。72時間後、thymidine (³H) (5 mCi/ml) を加えて24時間ハーベストした。ハーベスト後、ハーベスターで細胞をフィルターに採取し、フィルターを乾燥させた後、シンチレーションカウンター (TopCount, Packard, CT, USA) で測定した。

2-6. 細胞表面抗原の測定

細胞表面抗原は、採血直後に調整したBMNCをフローサイトメトリーで測定した。BMNCを3% FCSを加えたPBSで2回洗浄し、 10×10^5 cellsを3% FCSを加えたPBS 0.1mlに浮遊させ、あらかじめ抗体を加えた試験管で4°C, 30分間培養した。抗体の量は抗体の種類に応じて、マニュアルの推奨どおりの量を用いた。培養後、ラベルされた細胞を3% FCSを加えたPBSで3回洗浄し、ただちにフローサイトメトリー (Beckton Dickinson, USA) で測定した。測定と分析は、Cell Quest (Beckton Dickinson, USA) を用いた。標識用の抗体は、PE (phycoerythrin) conjugate CD4, CD56 antibody, FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugate CD8, CD16, PerCp conjugate CD3であった。ネガティブコントロールとして、標識されていない細胞を用いた。フローサイトメトリーに取り込む細胞数は

10000個とした。リンパ球とモノサイトを区別するために全細胞表示をあらかじめ行い、ゲートを決定した。

2-7. 統計処理

統計処理には、STATView statistical software (Abacus Concepts Inc., Tokyo, Japan) を用いた。全ての項目について二元配置の分散分析を行った。相関はピアソンの相関係数を用いて評価した。危険率は5%以下とした。

3 結果

3-1. 運動能力

Table 1で示したように、高齢トレーニング群と高齢コントロール群は、年齢、身長、体重、Body Mass Index (BMI) に差は認められない。しかし持久性の指標である最大酸素摂取量は、高齢トレーニング群の方が高齢コントロール群に比べて約1割程度有意に ($p<0.05$) 高かった (Table 1)。従って、高齢トレーニング群は高齢コントロール群よりも有酸素性運動能力に優れた集団であると考えられた。

<安静時>

3-2. 安静時の血球数

白血球数は、若齢群が最も多く (5260 ± 210 cells/ml)、高齢コントロール群 (4430 ± 230 cells/ml) が最も低い。両群には有意な差 ($p<0.05$) が認められたが、若齢群と高齢運動群 (5010 ± 410 cells/ml)、高齢運動群と高齢コントロール群には有意な差は認められなかった。好中球数は、高齢運動群のほうが高齢コントロール群に比べて多いものの両群に有意な差は認められない (Table 2)。しかし、若齢群と比較すると高齢運動群と高齢コントロール群はともに好中球数が有意に少なく ($p<0.01$)、加齢に伴う要因が示唆された。それに対し、リンパ球数は高齢運動群が最も多く (2050 ± 130 cells/ml)、若齢群 (1560 ± 80 cells/ml) に比べても有意に高い ($p<0.01$) 値を示した。高齢コントロール群は最もリ

Table.1 Subject Characteristics

	Elderly women		Young women	
	Walkers (n=9)	Controls (n=14)	Controls (n=10)	
Age (yr)	62±1	62±1	26±1	##,\$\$
Height (m)	156±2	153±2	160±2	\$\$
Weight (kg)	52±2	50±2	50±2	
BMI (kg/m ²)	21.6±0.7	21.4±0.6	19.5±0.6	##,\$\$
VO ₂ max (ml/[kg min])	32.0±1.0	27.9±0.8	37.8±1.3	##,\$\$

Values are given as mean±SEM.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$; significant differences between elderly swimmers and elderly controls.

$p<0.05$, ## $p<0.01$; significant differences between elderly swimmers and young controls.

\$ $p<0.05$, \$\$ $p<0.01$; significant differences between elderly controls and young controls.

Table.2 Cell Numbers in each group

	Elderly women		Young women	
	Walkers (n=9)	Control (n=14)	Control (n=10)	
Total leukocytes (cells/ml)	5010±410	4430±230	5260±210	\$
Neutrophils (cells/ml)	3080±430	2800±220	3400±210	,\$\$
Monocytes (cells/ml)	290±35	150±28	110±30	**
Lymphocytes (cells/ml)	2050±130	1370±100	1560±80	**
Percentage of CD3+ (%)	62.6±5.3	59.1±3.3	62.0±3.5	
Concentrations of CD3+ (cells/ml)	1260±110	800±70	960±70	**
Percentage of CD3+/CD4+ (%)	20.2±2.3	17.2±1.6	10.9±2.0	,\$
Concentrations of CD3+/CD4+ (cells/ml)	410±40	240±30	170±30	,\$\$
Percentage of CD3+/CD8+ (%)	8.6±1.7	6.6±1.0	6.2±1.0	
Concentrations of CD3+/CD8+ (cells/ml)	180±40	90±20	100±20	*
Percentage of CD3-/CD16+/CD56+ (%)	5.7±1.3	5.5±1.2	3.6±0.8	
Concentrations of CD3-/CD16+/CD56+ (cells/ml)	120±30	80±20	60±10	

Values are given as mean±SEM

**; p<0.01: Significant differences between elderly walkers and elderly controls

; p<0.01: Significant differences between elderly walkers and young controls

,\$,\$\$: p<0.05, p<0.01: Significant differences between elderly controls and young controls

ンパ球が少なく (1370±100cells/ml)、高齢運動群との間に有意な差が認められるが (p<0.01)、若齢群との間には有意な差は認められなかった。このことから安静時のリンパ球数は、加齢に伴う免疫系反応の変化よりも、運動による免疫系反応の変化が影響している可能性が推測される。

細胞表面抗原の測定から、リンパ球中のT細胞とNK細胞の割合と数を求めた (Table 5)。T細胞は、CD3抗原の発現がみられるものとした (CD3+)。リンパ球中のCD3+の割合は3群ともほとんど差がなく、T細胞はリンパ球のほぼ60%くらいの割合を示す。よって、3群にみられるCD3+細胞数の差は、リンパ球数の差が反映したものであることがわかる。CD3+細胞のうちさらにCD4+とCD8+T細胞の割合と数を検討した。CD4+T細胞は、リンパ球中の割合、数ともに高齢運動群が最も高い。高齢運動群と高齢コントロール群を比較すると高齢運動群の方が割合、数ともに高いが両群に有意な差は認められない。むしろ若齢群が、両群に比べてCD4+T細胞数の割合、数ともに有意に低い。一方、CD8+T細胞は、リンパ球中の割合が3群ともほぼ等しい。CD8+細胞数は、高齢運動群と若齢群の比較では、高齢運動群の方が細胞数が多いが有意な差は認められない。しかし、高齢運動群と高齢コントロール群を比較すると、高齢運動群のCD8+T細胞数は高齢コントロール群のほぼ2倍であり、有意に多い (p<0.05)。これらの結果は、CD4+T細胞は加齢に伴い増加するが、CD8+は、加齢以外の要因による影響のほうが大きいと考えられる。一般に、CD8+細胞は一過性の運動によって増加することが観察されているので、安静時においても日常的に運動をおこなっている高齢運動群の方がCD8+T細胞が多いと考えられる。

CD4/CD8比は、高齢コントロール群が最も高く、若齢群が最も低い。これは、CD4+T細胞数に起因しているためと考えられ、さらに、CD4+T細胞の増加は加齢によるものと考えられる。

本研究において、ナチュラル・キラー（NK）細胞は、CD3抗原の発現がみられず（CD3-）、かつCD16とCD56抗原の発現がみられる（CD3-/CD16+/CD56+）細胞と規定した。NK細胞のリンパ球中における割合は、高齢2群ではほぼ同じである。若齢群は、高齢両群に比して低い傾向であったが、統計的には有意な差は認められなかった。

3-3. 安静時のNK細胞活性

（研究2）の結果では、4～5年にわたり継続して水泳トレーニングを行ってきた高齢女性のNK細胞傷害活性は、運動習慣のない高齢女性に比べて有意に高かった。しかし、（研究3）の高齢運動群と高齢コントロール群の安静時NK細胞傷害活性は、ほぼ等しく、有意な差も認められない（Table3）。また、（研究2）の結果では、NK細胞傷害活性と呼吸循環器系機能の指標であるVO₂maxとが有意な正の相関を示した。しかし、（研究3）の高齢運動群と高齢コントロール群の安静時NK細胞傷害活性とVO₂maxには、有意な相関は認められなかった。その理由として、（研究3）の高齢運動群のVO₂maxが、高齢コントロール群に比べて有意な差が認められるものの、（研究2）の高齢運動群よりかなり低いためではないかと考えられる。（研究2）の高齢運動群のVO₂maxが36±1 ml/kg/分であったのに対し、研究3の高齢運動群のVO₂maxは32±1 ml/kg/分であって、これは、研究2の高齢コントロール群のVO₂max31±1 ml/kg/分とほぼ同じレベルである。また、研究3の高齢コントロール群のVO₂maxは28±1 ml/kg/分であることから、研究3の高齢運動群は、NK細胞傷害活性に影響を与えるほどの運動量もしくはパフォーマンスを持っていない集団であったかもしれない。そのため、（研究3）の高齢運動群と高齢コントロール群を合わせても、そのNK細胞傷害活性とVO₂maxに有意な相関は見られなかった。

（研究2）では、NK細胞数あたりのNK細胞傷害活性の測定を行っていないが、（研究3）では、3群のNK細胞数あたりのNK細胞傷害活性を求めた（Table 3）。その結果、3群の中でNK細胞数あたりのNK細胞傷害活性が最も高いのは若齢群であった。高齢コントロール群も、高齢運動群に比べて高いが、これら3群に有意な差はみられなかった。従って、（研究3）において、安静時のNK細胞傷害活性とNK細胞数あたりのNK細胞傷害活性は、高齢運動群、高齢コントロール群、若齢群ともにほぼ等しく、加齢や運動の影響は認められなかった。

Table.3 NK cell activity in rest

	Elderly women		Young women
	Walkers (n=8)	Control (n=9)	Control (n=10)
NK cell activity (%lysis)	16.4±6.2	14.6±3.2	19.8±3.9
NK cell activity per cells (%lysis/cells)	18.6±8.6 (n=4)	29.1±5.6	33.2±7.0

Values are given as mean±SEM

There were no significant differences between the groups.

<一過性中等度運動負荷に対する免疫反応>

3-4. 血球数

運動前・直後・2時間後の白血球数、リンパ球数、好中球数の変化を3群について示した (Table 4)。運動前に比べて、運動直後は3群とも約1.4倍上昇し、その後低下して、運動2時間後に運動前の約1.2倍程度にもどる。経時的变化の程度を検討するために、それぞれ時間ごとの平均値の差の検定をおこなった。高齢運動群や若齢群にくらべて、高齢コントロール群の運動直後の白血球数とリンパ球数の増加は顕著であった。しかし、3群とも同じ傾向を示し、運動直後の各血液分画の上昇は、白血球数の増加に起因する。

運動前・直後・2時間後のCD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3-/CD16+/CD56+それぞれの末梢血単核細胞 (PBMC) 中の割合と数を求めた。CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+などT細胞の割合は、運動直後必ずしも上昇する傾向はみとめられない。しかし、CD3-/CD16+/CD56+で示されるNK細胞は、その割合、数ともに運動直後、有意に増加した。

3-5. PHA刺激リンパ球幼若化反応

リンパ球数やT細胞数の上昇に対する細胞あたりの増殖機能を検討するためにPHA刺激リンパ球幼若化機能との関連を調べた。Fig 1は、運動前・直後・2時間後の時系列におけるリンパ球幼若化反応を3つの群について示した図である。運動前のリンパ球幼若化反応は、若齢群が最も高く、高齢群は、運動群もコントロール群も若齢群より低い。運動負荷直後に、それぞれの群のリンパ球幼若化反応は一時的に低下するが、その2時間後にはもとのレベルに回復する。それぞれの群の時系列での変化に有意な変動は見られなかった。二元配置の分散分析の結果、若齢群と高齢コントロール群の間に有意な差が認められ、高齢コントロール群は、若齢群に比べてリンパ球幼若化反応の変動が顕著であった。

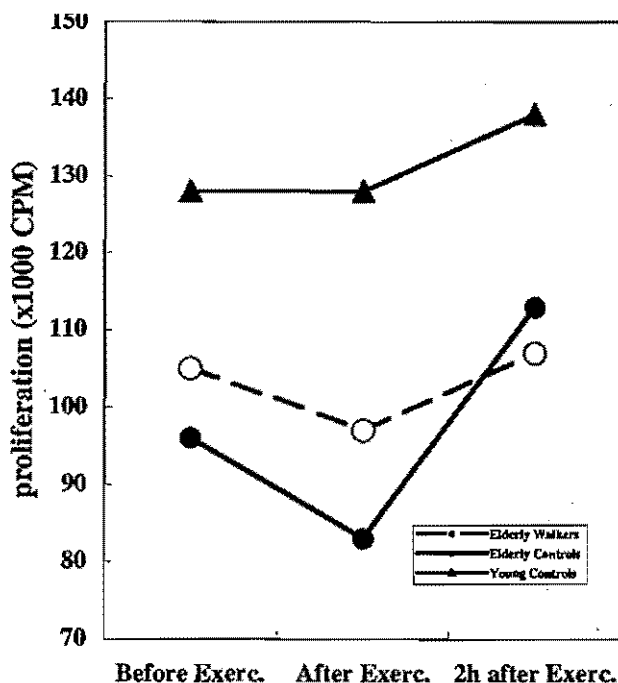


Fig.1 Proliferative Response to Exercise

Table.4 Changes of Cells' Numbers before and after exercise in each groups.

	Elderly Walkers n=6			Elderly Controls n=9			Young Controls n=8		
	Pre	Post	Post 2h	Pre	Post	Post 2h	Pre	Post	Post 2h
Total leukocytes (cells/ml)	4870±370	6820±770	5620±530	5160±380	7090±400	5840±280	5080±220	6390±410	6130±420
Lymphocytes (cells/ml)	1450±150	2020±250	1440±90	1260±100	2040±160	1470±110	1390±130	1890±190	1580±140
Neutrophils (cells/ml)	3240±260	4550±480	3950±430	3670±300	4720±260	4060±190	3430±130	4090±230	4200±360

Values are given as mean±SEM

*, **; p<0.05, p<0.01: Significant differences between Pre and Post

, ; p<0.05, p<0.01: Significant differences between Post and Post 2h

\$, \$\$; p<0.05, p<0.01: Significant differences between Pre and Post 2h

Total leukocytes	1	*	1.4	1.2	1	**	1.4	1.1	1	**	1.3	1.2	\$
Lymphocytes	1		1.4	1	1	**	1.6	1.2	1	*	1.4	1.1	
Neutrophils	1	*	1.4	1.2	1	**	1.3	1.1	1		1.2	1.2	\$

Values are given as cell numbers /Pre ratio

Table.5 Changes of Cells' Numbers before and after exercise in each groups.

	Elderly Walkers n=6			Elderly Controls n=9			Young Controls n=8		
	Pre	Post	Post 2h	Pre	Post	Post 2h	Pre	Post	Post 2h
	CD3+ (%)	59±7	54±8	62±7	53±5	54±5	58±5	50±5	60±5
CD3+ (Cells/ml)	810±180	1100±540	700±140	630±90	1090±200	800±110	720±50	* 1200±170	640±140
CD3+/CD4+ (%)	16±3	20±3	20±3	15±2	* 22±2	22±2	\$ 13±2	14±2	14±2
CD3+/CD4+ (Cells/ml)	250±70	360±110	240±60	170±30	** 350±40	520±150	\$ 190±30	250±40	340±130
CD3+/CD8+ (%)	13±4	13±3	11±3	7±1	9±1	10±2	8±1	9±1	7±1
CD3+/CD8+ (Cells/ml)	220±50	260±80	170±50	140±30	190±30	140±30	120±20	160±30	110±20
CD3-/CD16+/CD56+ (%)	6±1	8±2	5±1	6±1	** 14±3	5±1	4±0.4	* 6±1	3±0.5
CD3-/CD16+/CD56+ (Cells/ml)	100±20	210±90	80±30	70±20	** 330±70	50±10	60±3	** 130±20	60±10

CD3+ Cells	1	1.4	0.9	1	1.7	1.1	1	1.7	0.9
CD3+/CD4+ Cells	1	1.4	1	1	2.1	1.2	1	1.3	1.6
CD3+/CD8+ Cells	1	1.2	0.8	1	1.4	1.1	1	1.3	0.9
CD3-/CD16+/CD56+ Cells	1	2.1	0.8	1	4.7	0.7	1	2.2	1

Values are given as mean±SEM.

*, **; p<0.05, p<0.01; Significant differences between Pre and Post

; p<0.05, p<0.01; Significant differences between Post and Post 2h

\$. \$\$; p<0.05, p<0.01; Significant differences between Pre and Post 2h

Values are given as cell numbers /Pre ratio

CD4+T細胞のPBMC中の割合と細胞数をTable 5に示した。高齢コントロール群は、高齢運動群よりも、運動前から運動直後にかけてCD4+T細胞数が有意に増加する。リンパ球幼若化反応の経時的変化を、CD4+T細胞数あたりで補正し、運動前の値を基準に運動直後、運動2時間後の変動を比較した(Fig.2)。運動直後、CD4+T細胞数あたりのリンパ球幼若化反応は、若齢群と高齢運動群よりも、高齢コントロール群のほうが有意に低かった。従って、若齢群や高齢運動群は、高齢コントロール群よりも、一過性の運動負荷によって生じるCD4+T細胞の増殖反応の低下を免れていると考えられる。

3-6. NK細胞傷害活性

3-4で示したように、リンパ球の中でもNK細胞は運動負荷による数の変化が最も著しい。特に、高齢コントロール群は、若齢群や高齢運動群よりも運動直後にNK細胞数が有意に増加した (Table 5)。同様に、NK細胞傷害活性も、3群とも運動直後に増加する傾向を示したが、高齢コントロール群は、若齢群や高齢運動群より運動直後にNK細胞傷害活性が有意に増加した (Fig 3)。この増加がNK細胞数の増加によるものかどうかを検討するため、NK細胞あたりのNK細胞傷害活性をもとめた (Fig 4)。NK細胞あたりのNK細胞傷害活性は、若齢群が運動直後一時的に低下するが、運動2時間後にはほぼ運動前の値にもどり、その変動に有意な差は認められなかった。高齢コントロール群は、運動直後のNK細胞あたりのNK細胞傷害活性は若齢群よりも有意に低下した。一方、高齢運動群は、運動直後にNK細胞あたりのNK細胞傷害活性はむしろ増加した。しかし、その変動に有意な差は認められなかった。従って、高齢運動群は、日常的に運動を行っていない高齢コントロール群よりも、一過性の運動負荷による細胞あたりのNK細胞傷害活性の低下を免れやすいことが示唆された。

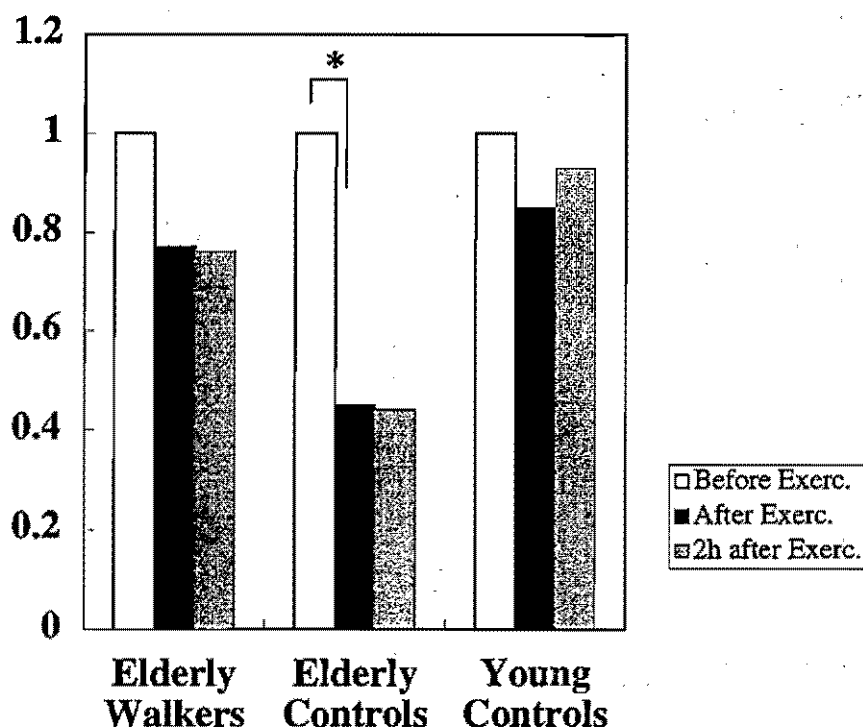


Fig.2 Rate of Proliferation per CD4+ T cells
Each rate is given as the ratio of the Pre value.

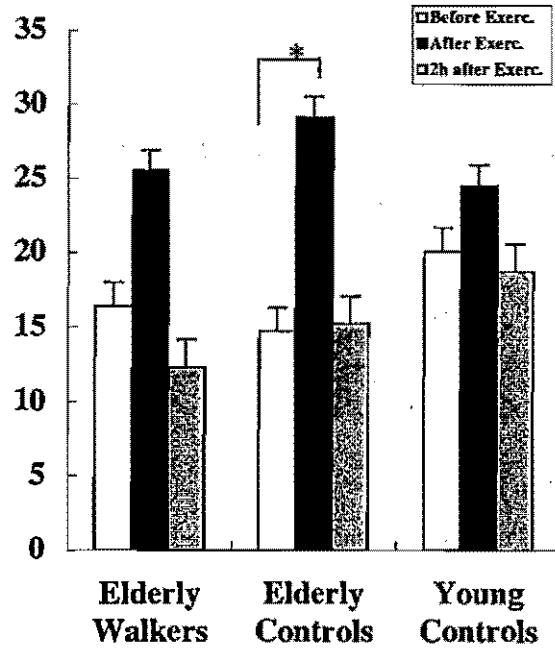


Fig.3 NK cell activity (%lysis)

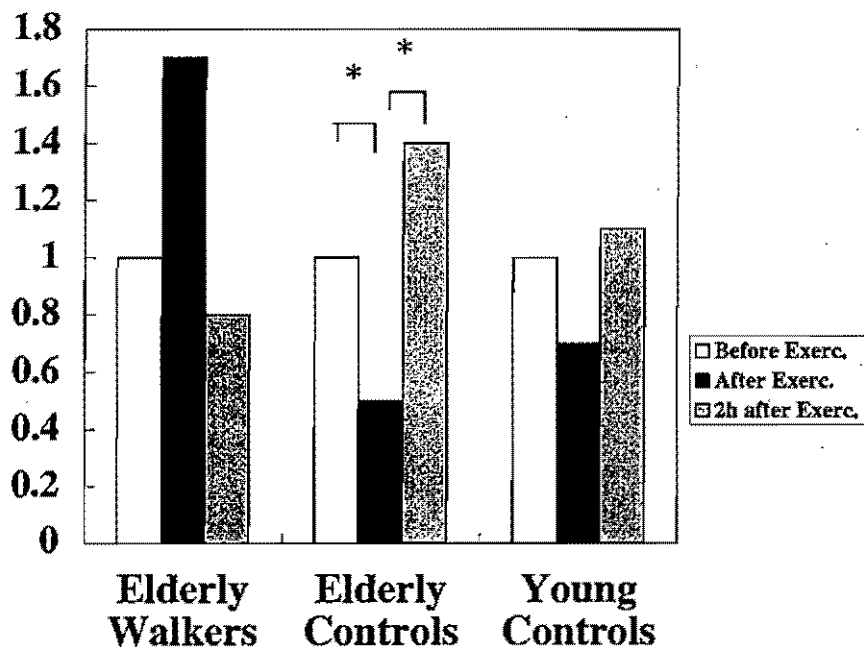


Fig.4 Rate of NK Cell Activity per Cell Basis

4. 考 察

本研究は、「一過性の高強度運動を行った時、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて運動直後のNK細胞傷害活性の低下状態を免れやすい」という仮説をたて、それを検討することを目的とした。

VO₂max60%の一過性の運動を行った直後、NK細胞傷害活性は、高齢運動群、高齢コントロール群、若齢群ともに増加が観察される。しかし、NK細胞数も同様の増加がみられることから、この増加は、主にNK細胞数の増加が原因と考えられる。そこで、NK細胞あたりのNK細胞傷害活性を検討したところ、若齢群と高齢コントロール群は、運動直後にNK細胞あたりのNK細胞傷害活性はむしろ低下するが、高齢運動群は有意な増加ではないが、むしろNK細胞あたりのNK細胞傷害活性は増加し、一過性の運動負荷というストレスに対する免疫反応の低下状態を免れていた。

先行研究によれば、高強度と低強度の運動では免疫機能が低下するが、中等度の運動では免疫機能が亢進する (Nieman DC. 1994)。これは、一過性高強度運動直後のNK細胞傷害活性が一時的に低下することが関連するのではないかと推測されている (Pedersen BK. 1998) ことから、一過性の運動負荷後のNK細胞傷害活性の変化について、Woods J.A.らが高齢者と若齢者を対象に報告している。これによれば、一過性の運動は高齢者と若齢者ともにNK細胞傷害活性の増加をもたらすが、これは、NK細胞数増加によるものであって、細胞あたりのNK細胞傷害活性は、高齢者と若齢者ともに低下することを示唆している。本研究においても、日常的に運動をおこなっていない高齢コントロール群と若齢群では、同様の結果を得ている。しかし、日常的に運動を行っている高齢運動群においては、このような免疫反応の低下がみられなかった。また、PHA刺激リンパ球幼若化反応においても、細胞あたりで見ると、高齢コントロール群が運動直後に有意な低下を示すのに対し、高齢運動群はほとんど変化しなかった。Suzuki.K.らによれば、短期間（1週間）であっても繰り返し運動負荷を行うと、運動後の好中球数の増加がなくなり、いわゆる運動に対する生体の「慣れ」の現象が生じることが報告されている。このような運動負荷による「慣れ」は、長期的に運動を続ければ、安静時であってもこれらの免疫反応が、トレーニングを行っていない対照群にくらべて高くなることが考えられる。また、それは運動そのものを一つの生体に対するストレスと考えた場合、ストレスに対する適応とも解釈できる。

本研究において、高齢運動群とした被検者は、VO₂maxでみるかぎり極めて高い運動能力を持っている被検者であったとは考えられない。そのため、(研究2)の高齢運動群のようにNK細胞傷害活性とVO₂maxとの有意な相関は認められなかった。しかし、本研究の被検者が、毎日3-5kmのウォーキングトレーニングを行い、さらに約6-7km/hの速度で10km程度のウォーキングを週1回行っている。よって、VO₂maxや安静時NK細胞傷害活性の増加がみられないとしても、このようなトレーニングが、一過性の運動に対する免疫機能の低下状態を免れるのに有効であったと考えられる。

5. 結 論

本研究は、日常的に中程度の運動を行っている高齢女性、日常的に運動を行っていない同年齢女性、日常的に運動を行っていない若年齢女性の3群について、一過性運動（トレッドミル歩行で60% VO2maxを30分間）の運動前、運動直後、運動2時間後のNK細胞傷害活性の比較を行い、『一過性の高強度運動を行った時、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて運動直後のNK細胞傷害活性の低下状態を免れやすい』という仮説を検討した。その結果、日常的に運動を行っている高齢者は、行っていない対照群に比べて運動直後の免疫状態の低下を免れやすいことが示唆された。

参考文献

- (1) Crist DM, Mackinnon LT, Thompson RF, Atterbom HA, and Egan PA. Physical exercise increases natural cellular-mediated tumor cytotoxicity in elderly women. *Gerontol* 1989; 35: 66-71
- (2) Ershler WB. Interleukin-6 and ageing: Blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine and Cytokine Res* 1993; 12: 225-230
- (3) Fiatarone MA, Morley JE, Bloom ET, Benton D., Solomon GF, and Makinodan T. The effect of exercise on natural killer cell activity in young and old subjects. *J Gerontol Med Sci* 1989; 44: M37-45
- (4) Flynn MG, Fahlman M., Braun WA, Lambert C.P, Bouillon LE, Brolinson PG, and Armstrong CW. Effects of resistance training on selected indexes of immune function in elderly women. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1905-1913
- (5) Friedwald WT, Levy RI, and Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18, 499-502
- (6) Higuchi M, Iwaoka K, Ishii K, Matsuo S, Kobayashi S, Tamai T, Takai H, and Nakai T. Plasma lipid and lipoprotein profiles in pre- and post-menopausal middle-aged runners. *Clini Physiol* 1990; 10: 69-76
- (7) Hirokawa K. Understanding the mechanism of the age-related decline in immune function. *Nutr Rev* 1992; 50: 361-366
- (8) Kishimoto S, Tomino S, Inomata K, Kotegawa S, Saito T, Kuroki M, Mitsuya H, and Hisamatsu S. Age-related changes in the subsets and functions of human T lymphocytes. *J Immunol* 1978; 121: 1773-1780

- (9) Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas-Wright H, Miles MP, and Ahluwalia N. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well nourished women. *Mch Age Dev* 1999; 112: 43-57
- (10) Krishnaraj R. Immunoescence of human NK cells: effects on tumor target recognition, lethal hit and interferon sensitivity. *Immunol Lett* 1992; 34: 79-84
- (11) Mazzeo RS, Rajkumar C, Rolland J, Blaher B, Jennings G, and Esler M. Immune response to a single bout of exercise in young and elderly subjects. *Mech Aging Dev* 1998; 100: 121-132
- (12) Mazzeo RS. Exercise, Immunity, and Aging. In: *Exercise and Immune function*, edited by Hoffman-Goetz L. Boca Ranton, FL: CRC, 1996 p199-214
- (13) Murasko DM, Weiner P, and Kaye D. Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 440-448
- (14) Nieman DC, and Pedersen BK. Exercise and Immune function. Recent developments. *Sports Med* 1999; 27: 73-80
- (15) Nieman DC, Buckley KS, Henson DA, Warren BJ, Suttles J, Ahle JC, Simandle S, Fagoaga OR, and Nehlsen-Cannarella SL. Immune function in marathon runners versus sedentary controls. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 986-992
- (16) Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G., Warren BJ, Dotson RC, Butterworth DE, and Nehlsen-Cannarella SL. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Spots Exerc* 1993; 25: 823-831
- (17) O'Leary A. Stress, emotion, and human immune function. *Psychological Bull* 1990; 108: 363-382
- (18) Ogita K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, and Nomura T. Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84:269-75
- (19) Pedersen BK, and Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Pysiol Rev* 2000; 80: 1055-1081
- (20) Pedersen BK, and Nielsen HB. Acute exercise and the immune system. In: Pedersen BK. *Exercise Immunology*. Heidelberg, Germny: Springer-Verlag, 1997: 5-38
- (21) Pedersen BK, Tvede N, Christensen LD, Klarlund K, Kragbak S, and Halkjr-Kristensen J. Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int J Sports Med* 1989; 10: 129-131
- (22) Remarque E., and Pawelec P. T cell immunosenescence and its clinical relevance in man. *Rev. Clin. Gerontol.* 1998; 8: 5-14
- (23) Saltin B, and Astrand P. Maximal oxygen uptake in athletes. *J Appl Physiol* 1967; 23: 353-358
- (24) Scanga CB, Verde TJ, Paolone AM, Andersen RE, and Wadden TA. Effects of weight loss and exercise training on natural killer cell activity in obese women. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:

1666-1671

- (25) Sinkai S, Kohno H, Kimura K, Komura T, Asai H, Inai R, Oka K, Kuroiwa Y, and Shephard RJ. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 1516-1526
- (26) Solana R, and Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 2000; 18: 1613-1620
- (27) SRL Co. LTD. SRL Handbook. Tokyo: SRL Co.LTD.,1996: 119 (in Japanese)
- (28) Vitale M, Zamai L, Neri LM, Galanzi A, Facchini A, Rana R, Cataldi A, and Papa S. The impairment of natural killer function in the healthy aged is due to a postbinding deficient mechanism. *Cell Immunol* 1992; 145: 1-10
- (29) Woods JA, Ceddia MA, Wolters BW, Evans JK, Lu Q, and McAuley E. Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly. *Mech Aging Dev* 1999; 109: 1-19
- (30) Woods JA, Evans JK, Wolters BW, Ceddia MA, and McAulley E. Effect of maximal exercise on natural killer cell function and responsiveness to interferon-a in the young and old. *J Gerontol Biol Sci* 1998; 53, B430-43