

大豆たん白質の細胞性免疫能に及ぼす影響，とくに 脾，胸腺の変化を中心に

THE EFFECTS OF SOYBEAN PROTEIN ON CELL-MEDIATED IMMUNITY IN RATS

森口 覚・戸羽正道・岸野泰雄（徳島大学医学部栄養学科）

Satoru MORIGUCHI, Masamichi TOBA and Yasuo KISHINO

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

ABSTRACT

This experiment was carried out to elucidate the influence of dietary protein upon proliferation of thymocytes or splenocytes of rats following *in vitro* incubation with mitogens (PHA, Con A and LPS). Rats fed diets containing 20% casein or soybean protein showed a well growth and their body weights were about 180 g at the end of the experiments. On the other hand, rats fed 5% protein diets showed less gains of body weight than those of 20% protein groups. The gains of body weight were almost nothing in 5% soybean protein group throughout this experiment. Furthermore, histological studies found the less cellularity and/or atrophy in thymus and spleen of rats fed diets containing 5% casein and soybean proteins. Those histological changes were restored following the supplement of 0.3% methionine to 5% soybean protein diet. The responses of splenocytes and thymocytes against mitogens did differ in the cultures with Con A. In thymocytes the response to Con A was higher in 5% soybean group or methionine supplemented group compared with that of 5% casein group. In splenocytes the response to Con A was higher in casein group than other groups. Interleukin-1 production from alveolar macrophages (AM) showed a high value in 5% soybean protein group, but that of other groups was almost similar. These observations suggest that cell-mediated immunity in rats is comparatively maintained, even when fed on 5% level of soybean protein with supplement of methionine. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn* 6, 38-44. 1985.

先に著者らは分離大豆たん白質 (SPI) を 3 週間与えたラットではカゼイン投与ラットに比べ、5%たん白食群で成長遅延，脾および胸腺重量の低下をみるが，肺胞マクロファージ (AM) の羊赤血球に対する貪食能には差を認めず，macrophage activating factor (MAF) を含むリンホカインに対する反応性も保持されていることを示した¹⁾。

今回この SPI 食でさらにラットを長期間（4 週および 8 週）飼育した際の脾および胸腺細胞のマイトジェ

ンに対する反応性について検討した。さらに SPI の第一制限アミノ酸であるメチオニンの補足効果についても検討を加えたので報告する。

材料と方法

動物

特異病原体に感染していない 4 週齢のフィッシャー系雄ラット（静岡実験動物）を用い，6 群（20 および 5% SPI 食群，20 および 5% SPI に 0.3% メチオニ

Table 1. Composition of experimental diets

	5% protein	20% protein
Casein or SPI*	5	20
Starch	72	57
Sucrose	10	10
Cod liver oil	2	2
Soybean oil	6	6
Vitamin mixture	1	1
Salt mixture	4	4
Choline	0.4	0.4
Energy	4.2 kcal/g	

*With or without 0.3% Met.

ンを添加した群, 対照としての 20 および 5% カゼイン食群) に分け, それぞれの食餌で 4 ないし 8 週間飼育した (Table 1)。飼料ならびに水は自由摂取とし, 摂取量および体重は毎日測定された。

脾および胸腺細胞の調製

ラットはネブプタール麻酔下で右腎動脈を切断して脱血後, 無菌的に脾および胸腺を摘出, 重量を測定し, 5% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地中で氷冷保存した。脾および胸腺細胞は RPMI 1640 培地を含むシャーレ内で滅菌したステンレススチールのスクリーンに脾および胸腺を通すことで単離され, 0.2% 酢酸で希釈後, 細胞数を血球計算盤上で算定した。

脾および胸腺の組織学的検索

脾および胸腺の一部は 10% ホルマリンで 24 時間固定後, パラフィン包埋され, 6~8 μ の切片を作製,

ヘマトキシリン-エオジン染色を施し, 顕微鏡下でそれら組織の変化について検索を行った。

脾および胸腺細胞のマイトジェンに対する反応

脾および胸腺細胞はウェル当り 5×10^5 の濃度で 96 ウェルの microtiter plates に加えられ, T 細胞マイトジェンとしてのフィトヘマグルチニン (PHA; 0.25 μ g), コンカナバリン A (Con A; 10 μ g), B 細胞マイトジェンとしての細菌リポポリサッカライド (LPS; 25 μ g) とともに培養された。48 時間後, 1.0 μ Ci の [3 H]-thymidine を各ウェルに加え, さらに 24 時間, 37°C で培養を続けた。放射性チミジンを取り込んだ脾および胸腺細胞は自動細胞ハーベスターによってフィルター上に採取され, 室温で一晩放置後, シンチレーターと混和したものを, 液体シンチレーションカウンターによりその放射活性を測定した。結果はマイトジェンの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 と比較した stimulation index (S. I.) として示した。

肺胞マクロファージ (AM) からのインターロイキン 1 (IL-1) の産生

前回の実験¹⁾の如く, 気管支肺胞洗條によって採取された AM (5×10^5 cells) を LPS (10~25 μ g/ml) と 24 時間培養することにより IL-1 を含む上清を得た。IL-1 活性はマウスの胸腺細胞 (5×10^6 cells/ml) と適当に希釈した AM からの上清とを 48 時間培養後, [3 H]-thymidine (1 μ Ci/50 μ l) を加え, さらに 24 時間, 37°C で培養を続け, 細胞内に取り込まれた放射性チミジンの cpm としてあらわされた。

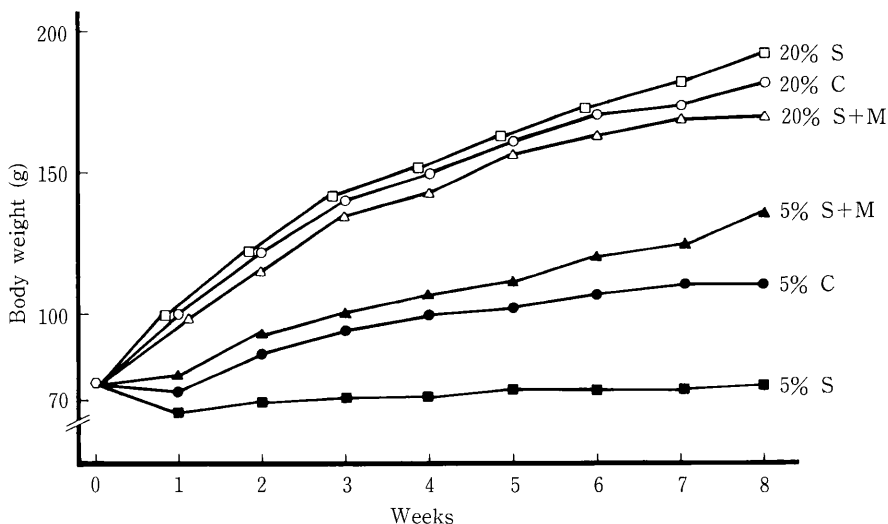


Fig. 1. Body weight changes of rats. S, soybean; C, casein; S+M, Soybean+0.3% methionine.

結果および考察

体重および摂食量

今回行った20%たん白食を用いた実験では、大豆たん白食群(20% S)とカゼイン食群(20% C)の間に有意な体重差をみとめず、実験終了時には両群とも180 g前後の体重を示した (Fig. 1)。しかし、5%たん白食群では質による差をみとめ、実験開始1週後から大豆たん白食群(5% S)でカゼイン食群(5% C)に比し、成長遅延がみられ、実験終了時において、初期体重とくらべほとんど体重の増加をみとめなかった。大豆たん白質の第1制限アミノ酸であるメチオニンを補足した場合、20%たん白食群では顕著な影響を認めないが、5%たん白食群で大豆たん白食群(5% S)に比べ、メチオニン添加群(5% S+M)で体重の増加を示し、7, 8週目にはカゼイン食群(5% C)よりも有意に重い傾向を示した。摂食量においても、体重増加と一致した結果をみとめ、20%たん白食群では、大豆たん白食群で(20% S)で全実験期間を通じて、他のカゼイン群(20% C)及びメチオニン添加群(20% S+M)と比べ、わずかに高い摂食量を維持していることをみとめた (Fig. 2)。また、5%たん白食群では大豆たん白食群(5% S)で実験期間中摂食量は有意に低く、protein-energy malnutritionの様相を呈した。さらに他のカゼイン(5% C)およびメチオニン添加群(5% S+M)では、摂食量は20%たん白食の各々の群(20% Cと20% S+M)とほとんど差をみとめないことから、protein-deficiencyの状態にあることを思わしめた。

脾および胸腺の重量と細胞数

脾および胸腺重量は8週目の脾臓を除き、20%たん白食群では食餌たん白の質による差をみとめず、カゼイン、大豆たん白および大豆たん白+メチオニン添加群とも体重100 g 当りの胸腺および脾重量はほとんど差をみとめなかった (Fig. 3)。しかし、8週目の脾重量のみは、20% C群で20% SおよびS+M 群より重い傾向にあった。また、5%たん白食群では、4週目において、20%たん白食群に比し、胸腺重量の低下を全群でみとめるが、脾においてはその傾向がみられなかった。8週目では、5%大豆たん白食群で20%大豆たん白食群に比し、胸腺重量の低下をみとめるが、脾ではその傾向をみない。胸腺および脾細胞数は食餌たん白の量および質にほとんど影響されず、唯一、8週目の5%カゼイン食群(5% C)で胸腺細胞数の減少をみとめたことを除けば、4および8週目で全群、ほぼ等しい細胞数を維持していた (Fig. 4)。

胸腺および脾の組織学的検索

胸腺および脾ともに、20%たん白食群ではそれら組織において顕著な差異をみとめないが、(Fig. 5-1) 5%たん白食群では、ビタミン B₆欠乏動物におけると同様に^{2,3)}胸腺において皮質 (cortex) の萎縮あるいは細胞充実性の低下を示し (Fig. 5-2), 脾では赤色髄 (red pulp) が粗になっており、白色髄 (white pulp) も接近していることから、脾の萎縮が示唆された (Fig. 5-3, 4 および Table 2)。これら萎縮の程度はメチオニン添加により軽減される傾向をみた。

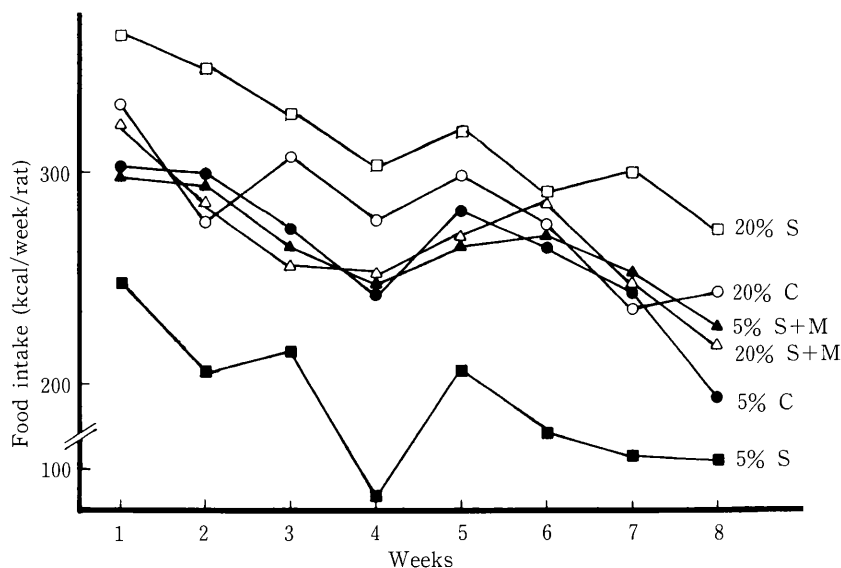


Fig. 2. Food intake

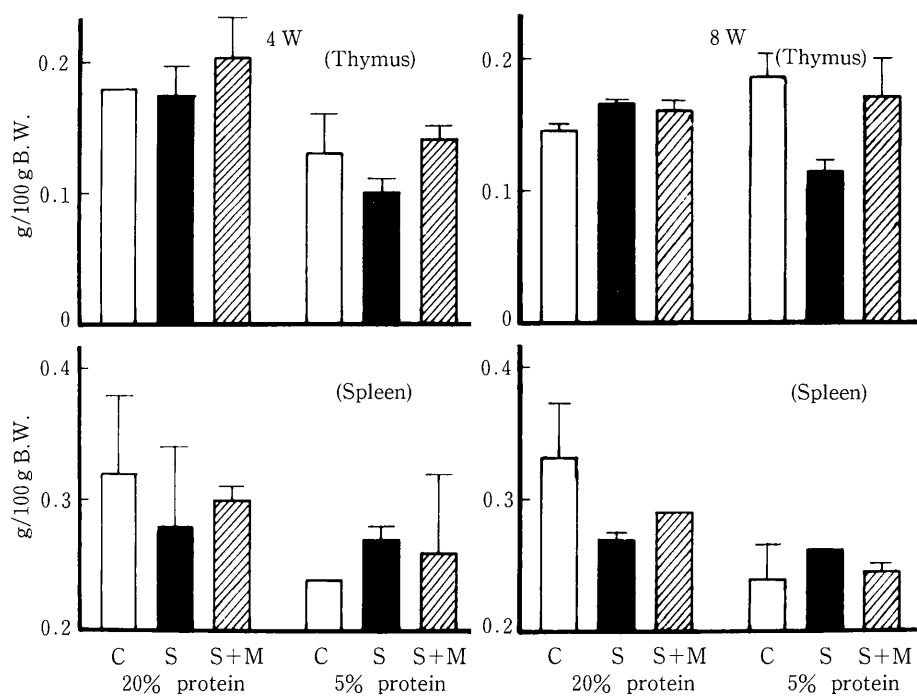


Fig. 3. Weight of thymus and spleen (4 and 8 week experiments)

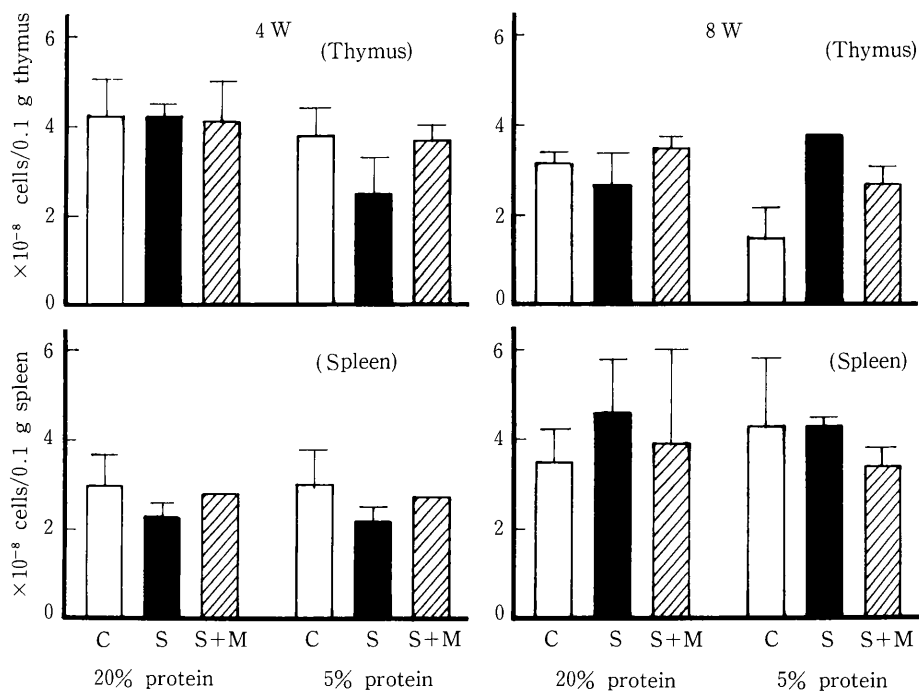


Fig. 4. Cell number of thymus and spleen (4 and 8 week experiments)

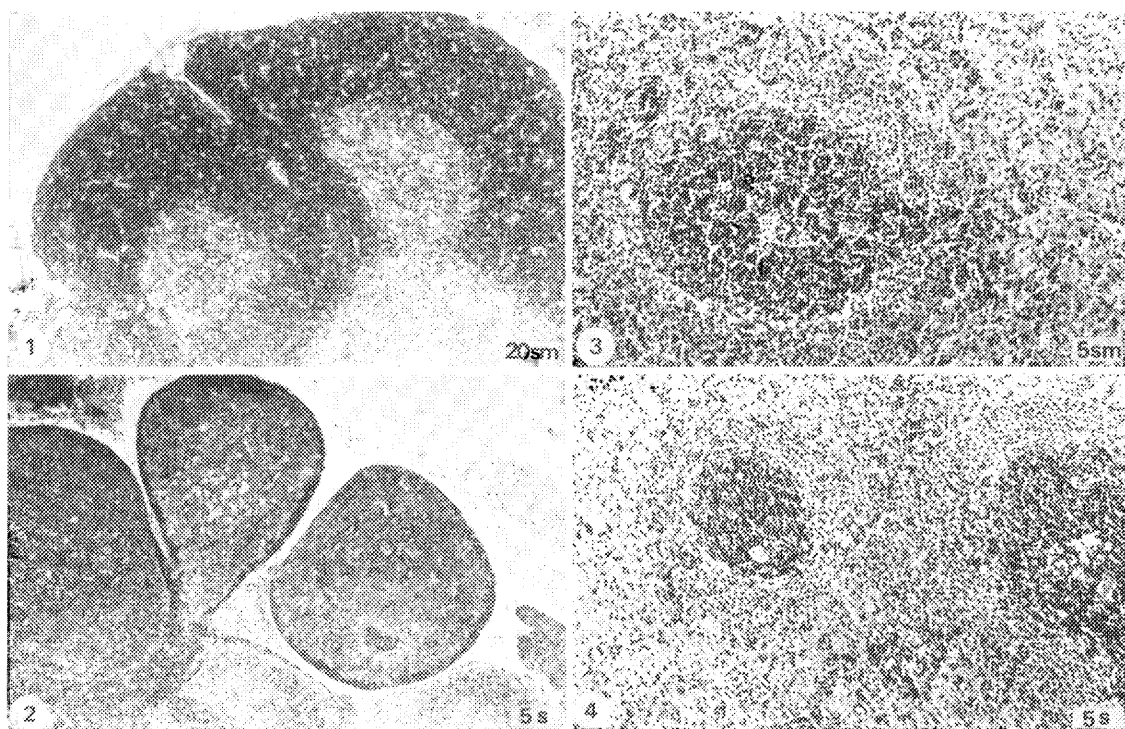


Fig. 5. 1: Thymus of rat fed 20% S+M for 8 weeks. ×40. 2: Thymus of rat fed 5% S for 8 weeks. ×40.
3: Spleen of rat fed 5% S+M for 8 weeks. ×100. 4: Spleen of rat fed 5% S for 8 weeks. ×100.

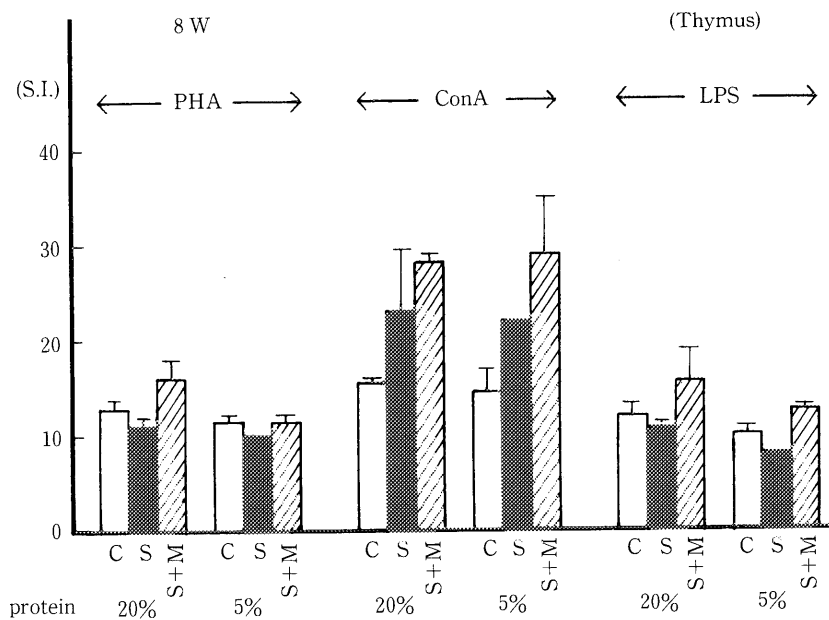


Fig. 6. The effect of PHA, Con A and LPS on mitogenesis of thymus cells (8 week experiment).

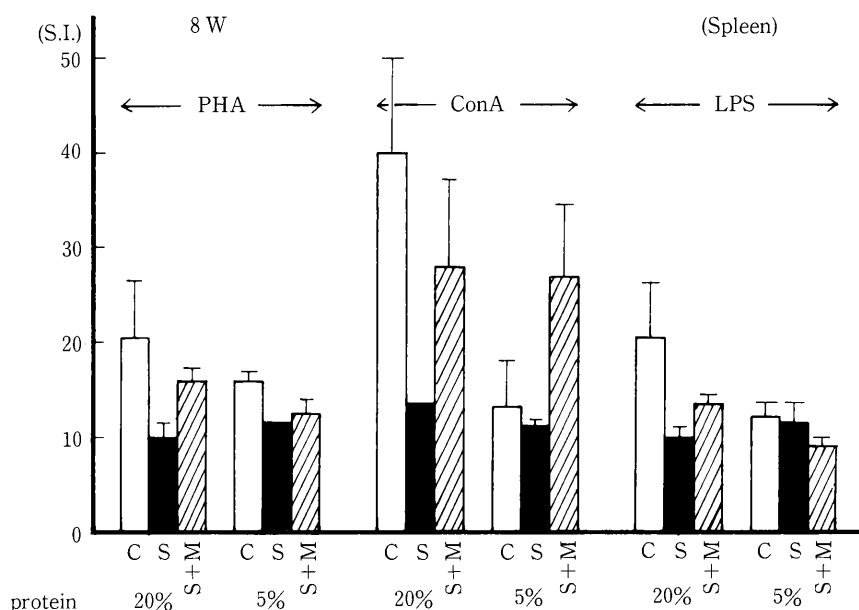


Fig. 7. The effect of PHA, Con A and LPS on mitogenesis of spleen cells (8 week experiment).

Table 2. Histological findings of thymus and spleen.

Groups	Week	Thymus		Spleen	
		Medulla	Cortex	White pulp	Red pulp
C	20% 4	+++	+++	+++	+++
	8	+++	++	+++	++
	5% 4	++	+	++	++
	8	++	+	++	+
S	20% 4	+++	+++	+++	+++
	8	+++	++	+++	++
	5% 4	+++	++	++	++
	8	+++	±~+	+	+
S+M	20% 4	+++	+++	+++	+++
	8	+++	++	+++	++
	5% 4	+++	++	+++	++
	8	+++	++	++	++

脾および胸腺細胞のマイトジェンに対する反応

実験開始8週目におけるラット脾および胸腺細胞のマイトジェンに対する反応性について検索した。胸腺細胞ではPHAおよびLPSに対する反応は、protein-energy malnutritionにおける報告と同じく^{4,5)}、食餌たん白の量および質による差異をみないが、Con Aに対しては20%および5%たん白食群ともに、カゼイン食

群に比し大豆たん白食群(S)およびメチオニン添加群(S+M)で約1.5~2倍の高い反応性を示した(Fig. 6)。脾細胞では、比較的、大豆たん白食群(20%および5% S)で、PHA、Con AおよびLPSなどに対する反応性はカゼイン食群に比し低下していたが、メチオニンを添加することにより、その低下は回復しうることが特にCon Aに対する反応において示唆された(Fig. 7)。このことは5%大豆たん白食の長期摂取はラットをprotein-energy malnutritionの状態にいたらしめ、その結果、他の報告にみるごとく^{6,7)}、胸腺、脾の萎縮およびマイトジェンに対する反応性の低下をもたらすように思われる。また、メチオニン添加による免疫反応の回復は、メチオニンが欠乏あるいは過剰に与えられても宿主の抗体産生等にはほとんど影響しないという報告からみて、直接のメチオニンの作用によるのではなく、むしろ摂食量の増加にともなう、摂取エネルギーの十分な供給がその原因であるように思われる。

肺マクロファージ(AM)におけるインターロイキン1(IL-1)の産生能

AM (5×10^5 cells)をLPSにより24時間刺激することで得た培養上清をIL-1活性の測定に用いた。IL-1活性はたん白質の量に関係なく、むしろ質において差をみとめ、大豆たん白食群(5% S)において高い値を示した(Fig. 8)。前報¹⁾においても、5% S群ではAMのMAFに対する反応性が高かったことから、大豆たん

白食群では低たん白食投与においても AM 機能はよく保持されていることが示唆された。

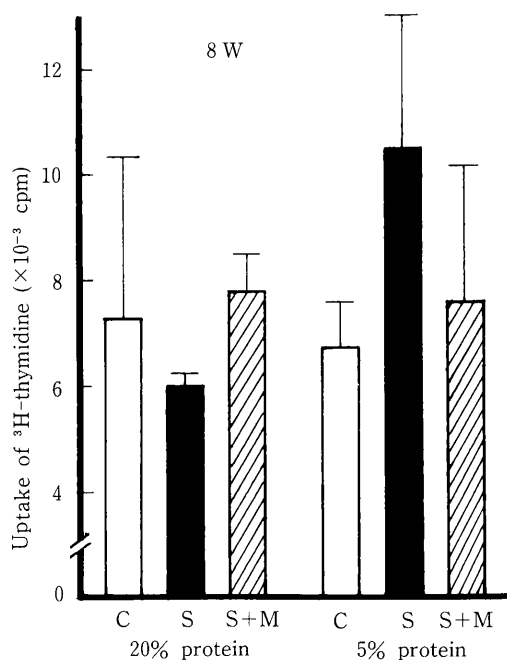


Fig. 8. Production of interleukin-1 from alveolar macrophages stimulated by LPS (8 week experiment).

文 献

1) 岸野泰雄, 森口 寛(1984): 大豆たん白質の細胞性免疫能に及ぼす影響. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **5**, 67-70.

2) Hawkins, W.W. and Evans, M.K. (1952): White blood cells and lymphoid tissue in vitamin B₆ insufficiency *Am. J. Physiol.*, **170**, 160-167.

3) Rosen, F., Mihich, E. and Nichol, C.A. (1964): Selective metabolic and chemotherapeutic effects of vitamin B₆ antimetabolites. *Vitam. Horm.*, **22**, 609-641.

4) Holm, G. and Palmblad, J. (1976): Acute energy deprivation in man: effect on cell-mediated immunological reactions. *Clin. Exp. Immunol.*, **25**, 207-211.

5) Moore, D.L., Heyworth, B. and Brown, J. (1974): PHA-induced lymphocyte transformations in leukocyte cultures from malarious, malnourished and control Gambian children. *Clin. Exp. Immunol.*, **17**, 647-656.

6) Kulapongs, P., Suskind, R.M., Vithayasai, V. and Olson, R.E. (1977): *In vitro* cell-mediated immune response in Thai children with protein-calorie malnutrition, in "Malnutrition and the Immune Response", ed. by Suskind, R.M., Ravan Press, New York, pp. 99-104.

7) Smythe, P.M., Brereton-Stiles, G.G. Grace, H. J., Mafoyan, A., Schonland, M., Coovadia, H. M., Loening, W.E.K., Parent, M.A. and Vos, G. H. (1971): Thymolymphatic deficiency and depression of cell-mediated immunity in protein-calorie malnutrition. *Lancet* **2**, 939-943.