

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

EFFECTS OF SOYBEAN PROTEIN ISOLATE (SPI) ON CELLULAR IMMUNE FUNCTIONS OF VOLUNTARILY EXERCISED RATS

森口 覚・三輪仁美・岸野泰雄(徳島大学医学部)

Satoru MORIGUCHI, Hitomi MIWA and Yasuo KISHINO

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

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effects of soybean protein isolate (SPI) on cellular immune functions of voluntarily exercised rats. Male Fischer rats, 4 weeks old, were fed diets composed of 5, 20 and 40% casein or SPI and subjected daily to voluntary exercise on a wheel mill. At the end of a 7 week-training period, peripheral blood lymphocytes (PBL), splenocytes and alveolar macrophages (AM) were isolated from exercised and sedentary control rats. In 5% protein groups the gain of body weight was apparently higher in casein group than that of SPI group. The difference of body weight gain between casein and SPI groups decreased with increasing protein levels in diets and was not shown in 40% protein group at all. In 5% casein group PBL proliferation with Con A was significantly suppressed by voluntary exercise, but not in 5% SPI group. In addition, rats fed 5% casein diet showed lower proportions of CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺ T cells in PBL, which was restored to the level of rats fed 20% casein diet by voluntary exercise. In 40% protein groups the proportion of CD4⁺CD8⁻ T cells in PBL of both casein and SPI groups was significantly increased by voluntary exercise. Although phagocytosis of AM increased in all casein groups by voluntary exercise, AM from SPI groups did show decreased phagocytosis in AM from 5% protein group rather than the increase of phagocytosis by voluntary exercise. The effects of SPI diets or voluntary exercise on IL-1 production from AM and NK activity of splenocytes were not shown in this experiment. In conclusion, the above results suggest that cellular immune functions in rats fed 5% protein diet are well-maintained in the SPI group compared with that of casein group in case of taking voluntary exercise. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 83-88, 1993.

運動トレーニングにより末梢血白血球の数的増加並びに機能的亢進¹⁾を認めることから、健康の維持・増進を計るうえで運動の重要性が唱えられている。しかし、宿主免疫系に及ぼす影響を運動と栄養との両面から検討した研究は現在までほとんどみられない。我々は自発的運動の宿主細胞性免疫能へ及ぼす影響を食餌たん

白レベルとの関連でカゼインを用いて検討し、20及び40%たん白食が5及び60%たん白食に比し肺胞マクロファージ(AM)の貪食能並びにインターロイキン-1(IL-1)産生を運動に伴い有意に亢進させることを見出している²⁾。本研究では食餌たん白の質並びに量的差異が運動トレーニング時における宿主細胞性免疫能

に対して如何なる影響を及ぼすかについて、分離大豆たん白質(SPI)食投与と対照としてのカゼイン食投与について比較検討したので報告する。

材 料 と 方 法

動物

特異病原体に感染していない4週齢の雄性 F344 ラット(日本 SLC)60匹を5,20及び40%のカゼインあるいは SPI 食(Table 1)にて7週間飼育するとともに、さらに各群を2群に分け、一方のラットには水車式ケージ内で飼育することにより自発的運動を行わせた。体重、摂食量及び走行距離は毎日測定された。

脾細胞の調製

ラットはネブプタール麻酔下で右腎動脈を切断、脱血後、無菌的に脾臓を摘出した。脾臓は重量を測定後、5%牛胎仔血清(FBS)を含む RPMI 1640 培地中で氷冷保存された。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臓を通すことにより脾細胞を単離した。さらに、0.2%酢酸により100倍希釈後、細胞数を血球計算盤上にて算定した。

末梢血リンパ球(PBL)の調製

ヘパリン処理した血液を Percoll (比重1.0875)溶液上に重層後、2,500 rpm で25分間遠心することにより PBL を採取した。0.2%酢酸にて20倍希釈後、細胞数を血球計算盤上にて算定した。

脾細胞及び PBL のマイトジェンに対する反応

脾細胞及び PBL をウェル当り 1×10^5 の濃度で96

Table 1. Compositions of experimental diets

Protein in diet, %	5	20	40
% in diet			
Casein or SPI	5	20	40
Sucrose	10	10	10
α -Cornstarch	72	57	37
Cod liver oil	1.6	1.6	1.6
Soybean oil	6.4	6.4	6.4
Mineral mixture	4	4	4
Vitamin mixture	1	1	1
Energy	4.2 kcal/g		

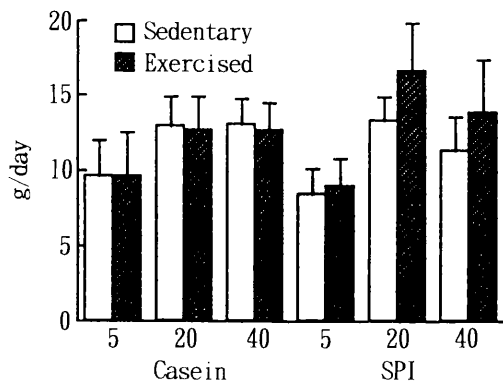


Fig. 1. Food intake of sedentary and exercised rats fed casein (C) or SPI (S) diet for 7 weeks.

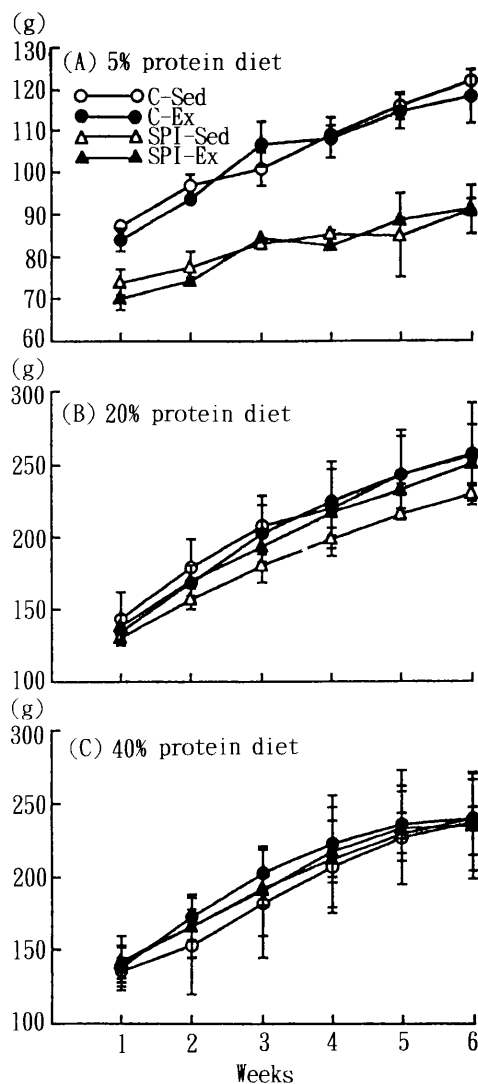


Fig. 2. Changes of body weight of sedentary (Sed) and exercised (Ex) rats fed casein (C) or SPI (S) diet for 7 weeks.

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 (Con A; 5 μ g/mL) と共に 37°C 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°C で培養した。放射性チミジンを取り込んだ脾細胞及び PBL を自動細胞ハーベスターによってファイバーフィルター上に採取した。室温で一晩放置後、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。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。

脾細胞からのインターロイキン-2 (IL-2) 産生

既報³⁾の如く、脾細胞を Con A (5 μ g/mL) と48時間培養後、上清を採取した。上清中のIL-2 活性は rIL-2 を用いた場合の CTLL-2 細胞の増殖と比較することにより測定された。

PBL 中の T 細胞サブセットの解析

既報⁴⁾の如く、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処理した後、FAC Scan により PBL 中の T 細胞サブセットの割合を測定した。

AM 貪食能並びに AM からの IL-1 産生

既報⁵⁾の如く、⁵¹Cr ラベルのオプソニン化羊赤血球に対する AM 貪食能を測定した。また、AM からの IL-1 産生も既報⁶⁾の如く、AM を lipopolysaccharide (LPS; 10 μ g/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

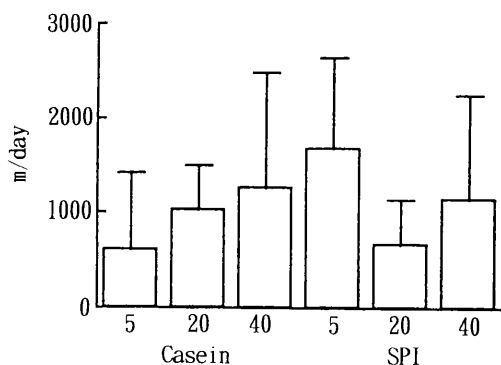


Fig. 3. Running distance of rats fed casein or SPI diet.

Table 2. Spleen weight and numbers of immune cells

		Splenocytes		PBL		AM	
		Spleen	Splenocytes	PBL	AM	AM	AM
		$g/100 g BW$	$\times 10^{-7} cells/0.1 g spleen$	$\times 10^{-6} cells/mL blood$	$\times 10^{-6} cells/100 g BW$	$\times 10^{-6} cells/rat$	
C5	Sed	0.29 $\pm$ 0.04	3.58 $\pm$ 0.51	1.57 $\pm$ 0.01 ^b	5.09 $\pm$ 1.17 ^b	6.30 $\pm$ 1.56	
	Ex	0.23 $\pm$ 0.02	2.13 $\pm$ 0.11 ^{a,b}	2.06 $\pm$ 0.93	6.12 $\pm$ 0.77 ^b	7.20 $\pm$ 0.57	
C20	Sed	0.25 $\pm$ 0.02	3.63 $\pm$ 0.76	3.10 $\pm$ 0.22	3.02 $\pm$ 0.16	7.80 $\pm$ 0.28	
	Ex	0.25 $\pm$ 0.00	3.37 $\pm$ 0.20	2.78 $\pm$ 0.05	3.22 $\pm$ 0.14	8.30 $\pm$ 0.71	
C40	Sed	0.26 $\pm$ 0.03	3.55 $\pm$ 0.03	1.81 $\pm$ 0.63 ^b	3.03 $\pm$ 0.03	7.20 $\pm$ 1.13	
	Ex	0.27 $\pm$ 0.02	4.09 $\pm$ 0.42	2.06 $\pm$ 0.03	2.60 $\pm$ 0.70	6.10 $\pm$ 0.99	
S5	Sed	0.24 $\pm$ 0.02	1.11 $\pm$ 0.26	1.39 $\pm$ 0.59	4.59 $\pm$ 0.58	4.10 $\pm$ 0.71 ^c	
	Ex	0.24 $\pm$ 0.04	2.36 $\pm$ 1.13 ^a	1.57 $\pm$ 0.22	3.49 $\pm$ 0.53	3.10 $\pm$ 0.42 ^c	
S20	Sed	0.23 $\pm$ 0.01	1.50 $\pm$ 0.02	2.42 $\pm$ 0.44	3.61 $\pm$ 0.11	8.30 $\pm$ 0.14	
	Ex	0.25 $\pm$ 0.02	2.63 $\pm$ 0.35	2.08 $\pm$ 0.13	2.44 $\pm$ 0.35	6.10 $\pm$ 0.99	
S40	Sed	0.26 $\pm$ 0.03	1.57 $\pm$ 0.26	3.17 $\pm$ 0.77	2.24 $\pm$ 0.52	5.20 $\pm$ 1.13	
	Ex	0.30 $\pm$ 0.11	2.68 $\pm$ 0.26 ^c	2.45 $\pm$ 0.42	2.58 $\pm$ 0.92	6.10 $\pm$ 1.27	

^aSignificantly different from sedentary group, $p < 0.05$.

^bSignificantly different from C20-Sed, $p < 0.05$.

^cSignificantly different from S20-Sed, $p < 0.05$.

した。

統計学的解析

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

結果と考察

摂食量、体重及び走行距離

カゼイン及び SPI 群とも 5%たん白食群の摂食量は他の20及び40%たん白食群に比し著明に低いことから、両群の 5%たん白食群のラットは protein-energy malnutrition の状態にあることが示唆された(Fig. 1)。また、自発的運動をすることにより SPI 群では20及び40%たん白食群において摂食量の増加する傾向を認めたが、カゼイン群では自発的運動による影響をほとんど認めなかった。カゼイン群に比し SPI 群の体重増加は5%たん白食群において著明に低下していた(Fig. 2 A)が、20、40%と食餌中のたん白レベルが増加するにつれ、カゼイン群と SPI 群との間の体重差はほとんどみられなくなった(Fig. 2B, 2C)。これは食餌たん白質の質的差異よりも量的差異の方が成長に大きく影響す

ることを示唆している。ラットの走行距離は個体差が大きく、各群とも1日当り約1,000 m であった(Fig. 3)。

脾重量並びに免疫担当細胞数

Table 2に示す如く、体重100 g 当りの脾重量は各群間に有意な差異を認めなかったが、脾細胞数はカゼイン群に比し SPI 群において著明な低下を認めた。自発的運動に伴い SPI 群では全ての群において脾細胞数の増加を認めた。さらに、自発的運動に伴い5%カゼイン食群において脾細胞数の著明な減少を認めた。PBL 数はカゼイン群では20%たん白食群に比し5及び40%たん白食群において有意な減少を認めたが、SPI 群では食餌中のたん白含量の増加とともに増加する傾向を認めた。しかし、自発的運動による影響は両群においてほとんどみられなかった。カゼイン及び SPI 群とも5%たん白食群において AM 数の有意な増加を認めたが、これは5%たん白食群における低体重と関連することがラット当りの AM 数の結果から示唆された。すなわち、AM 数をラット当りで比較した場合、カゼイン群では食餌たん白レベルや自発的運動による影響をほとんど認めなかった。しかし、SPI 群では20%たん

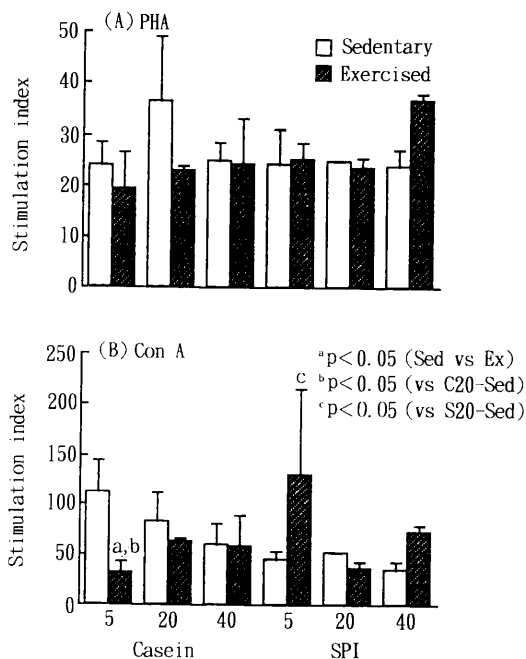


Fig. 4. Proliferation of peripheral blood lymphocytes (PBL) with PHA (A) or Con A (B) in sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

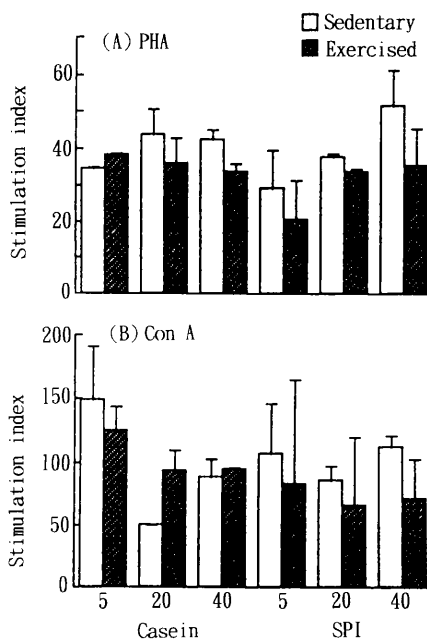


Fig. 5. Proliferation of splenocytes with PHA (A) or Con A (B) in sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

白食群に比し5及び40%たん白食群において AM 数の有意な低下を認めた。さらに、40%たん白食群では自発的運動に伴い AM 数は回復する傾向にあったが、5%たん白食群では自発的運動による影響を認めなかった。

PBL 及び脾細胞の幼若化能

PBL の PHA に対する幼若化能については各群間に有意な差異を認めなかったのに対し、Con A に対する反応は自発的運動によりカゼイン群の5%たん白食群において有意に減少することを認めた(Fig. 4)。これは低たん白食投与時には運動することにより PBL 幼若化能が低下することを示唆している。しかし、SPI 群の5%たん白食群では自発的運動により PBL 幼若化能の低下はみられず、むしろ PBL 幼若化能の亢進することを認めた。また、脾細胞の PHA 及び Con A に対する幼若化能については各群間に有意

な差異を認めなかった(Fig. 5)。

脾細胞の NK 活性

^{51}Cr ラベルした YAC-1 細胞を標的細胞とした脾細胞の NK 活性についても各群間に有意な差異はみられず、自発的運動による影響もみられなかった(Fig. 6)。

脾細胞からの IL-2 産生

脾細胞を Con A と48時間培養することにより培地中に産生された IL-2 の活性はカゼイン群に比し SPI

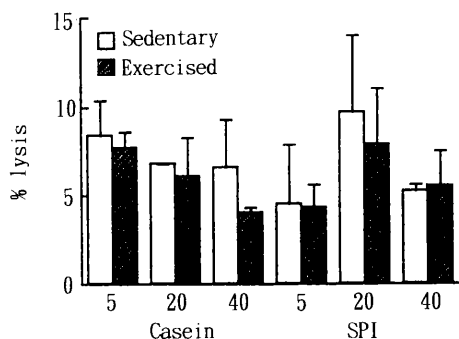


Fig. 6. Natural killer cell (NK) activity of splenocytes of sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

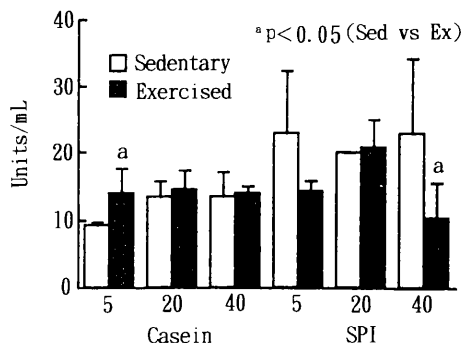


Fig. 7. Interleukin-2 (IL-2) production from splenocytes of sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

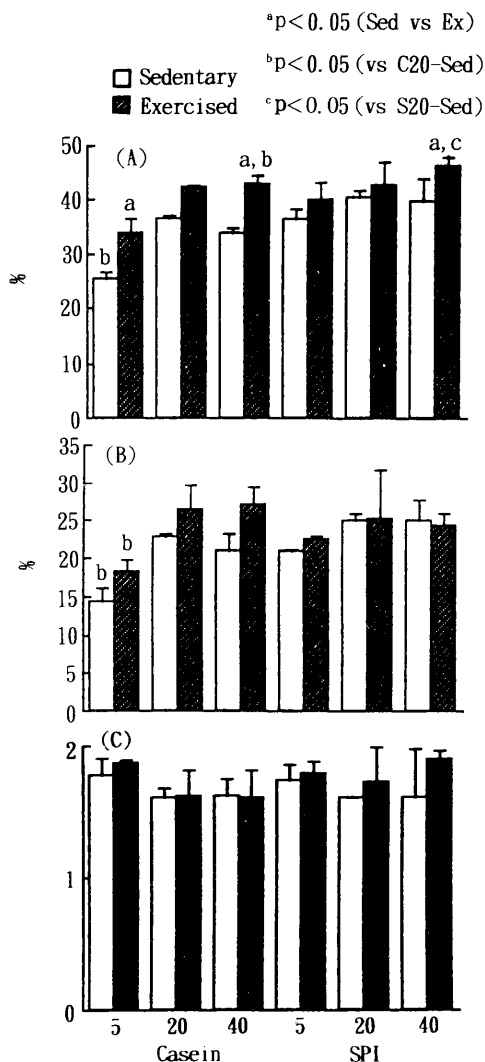


Fig. 8. Proportion of $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ (A) and $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ (B) T cells and the ratio of $\text{CD4}^+\text{CD8}^-/\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ T cells (C) in peripheral blood lymphocytes (PBL) of sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

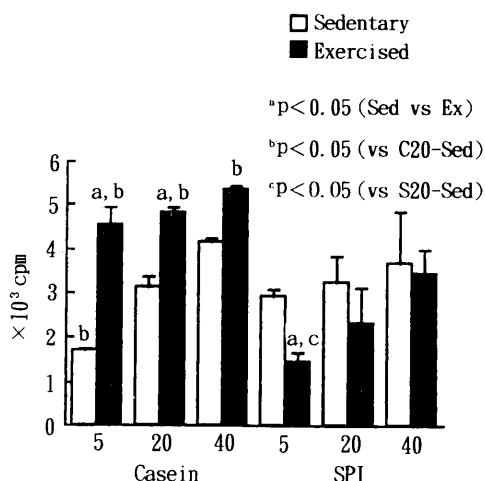


Fig. 9. Phagocytosis of ⁵¹Cr-opsonized sheep red blood cells (SRBC) by alveolar macrophages (AM) of sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

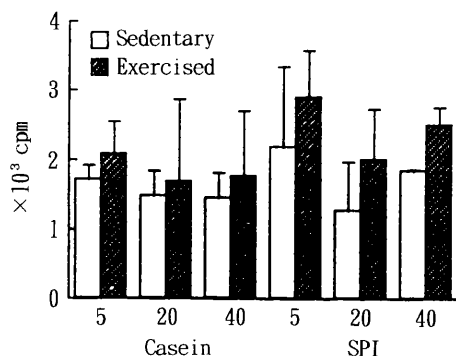


Fig. 10. Interleukin-1 (IL-1) production from alveolar macrophages (AM) of sedentary and exercised rats fed casein or SPI diet for 7 weeks.

群において高い傾向にあった。また、自発的運動に伴い5%カゼイン食群では IL-2 産生の有意な亢進を認めた(Fig. 7)。

PBL 中の T 細胞サブセットの割合

CD4⁺CD8⁻ T 細胞率はカゼイン群に比し、SPI 群において高い傾向にあった。運動することにより末梢血中のCD4⁺CD8⁻(ヘルパー) T 細胞率の増加することが知られている⁷⁾が、本研究においても各群とも自発的運動により CD4⁺CD8⁻ T 細胞率は若干増える傾向にあった(Fig. 8)。5%カゼイン食群では20%カゼイン食群に比し CD4⁺CD8⁻ T 細胞率は有意に低下してい

たが、SPI 群では5%たん白食投与群においても20%たん白食群とほぼ同等のT細胞サブセット率を保持していた。CD4⁺CD8⁺ T 細胞率においても同様の傾向がみられ、結果として CD4⁺CD8⁻/CD4⁺CD8⁺ T 細胞比については各群間に有意な差異を認めなかった。

AM 食能と AM からの IL-1 産生

カゼイン及び SPI 食餌とも食餌中のたん白含量が増えるにつれ AM 食能は高まる傾向を認めた。また、自発的運動により SPI 群よりカゼイン群において AM 食能は著明に亢進することを認めた(Fig. 9)。しかし、AM からの IL-1産生に関しては食餌たん白質の差異や自発的運動による影響をほとんど認めなかった (Fig. 10)。

文 献

- 1) Hedfors E, Holm G and Ohnell B (1976): Variations of blood lymphocytes during work studied by cell surface markers, DNA synthesis and cytotoxicity *Clin Exp Immunol*, **24**, 328-335.
- 2) Ueda N, Kayashita J, Moriguchi S and Kishino, Y. (1990): Effect of dietary protein levels on immune function of exercised rats. *Nutr Res*, **10**, 429-437.
- 3) Gillis S, Ferm MM, Ou W and Smith KA (1978): T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*, **120**, 2027-2037.
- 4) Moriguchi S, Kim JK and Kishino Y (1993): Alcohol, liver diseases and immunodeficiency, in "Alcohol and Immunomodulation", ed. by Watson RR, Pergamon Press, Great Britain, pp. 219-226.
- 5) Moriguchi S, Sone S and Kishino Y (1983): Changes of alveolar macrophages in protein-deficient rats. *J Nutr*, **113**, 40-46.
- 6) Moriguchi S, Werner L and Watson RR (1985): High dietary vitamin A (retinyl palmitate) and cellular immune functions in mice. *Immunology*, **56**, 169-177.
- 7) Shinkai S, Shore S, Shek PN and Shephard RJ (1992): Acute exercise and immune function. Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. *Int J Sports Med*, **13**, 452-461.