

大豆たん白質の経口摂取による免疫応答と免疫寛容の誘導

IMMUNOLOGICAL RESPONSE AND TOLERANCE TO DIETARY SOYBEAN PROTEIN

松田 幹・石井哲也・青木直人・中村 良 (名古屋大学農学部)

Tsukasa MATSUDA, Tetsuya ISHII, Naohito AOKI and Ryo NAKAMURA

School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-01

ABSTRACT

Immune response of mice to soybean protein and its modification by pre-feeding with soybean protein were investigated to get information on immunogenic properties of soybean protein. Mice fed with a non-purified diet were divided into two groups based on serum antibody level to soybean protein, i. e., responder and non-responder mice. The primary antibody response to soybean protein injected i. p. tended to be low for the non-responders and high for the responder mice, though there were some exceptions in each group. Serum antibody response to soybean protein injected i. p. was markedly lower than the response to injected egg white protein. Mice fed with purified diets containing milk protein or egg white protein showed antibody response to these fed proteins, whereas mice fed with soybean protein-containing diet showed no response to the soybean protein antigen. These results suggest that soybean protein is less immunogenic and more tolerogenic than egg white and milk proteins. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 109-114, 1994.

大豆は食物アレルギーにおける主要な原因の一つと考えられており、原因たん白質に関するいくつかの報告があるが¹⁾、大豆アレルギーの発症機構について未だ充分には解明されていない。我々はこれまでの研究により、市販の固形非精製飼料で飼育したマウスの中に、大豆たん白質に対する血清特異抗体が検出される個体が存在することを明らかにしてきた²⁾。この抗体は非精製飼料中に含まれる大豆たん白質に対して産生されたものと考えられたが、その詳細は明らかではない。本研究では、大豆たん白質の経口摂取による抗原特異的な免疫応答と寛容の誘導についてマウスを用いて調べた。さらに、卵白たん白質と牛乳たん白質についても同様に研究し大豆たん白質の免疫学的特性と比較検討した。

実験方法

実験開始時において6～8週齢のクローズドコロニー (ddY)、および近交系 (BALB/c, B10. A) 雌マウスを用いた。非精製飼料として日本クレア社製固形飼料 (CE2) を用い、精製飼料は AIN 推奨の組成で、たん白質含量は25%とした。たん白質源として大豆たん白質濃縮物 (SPI)、牛乳カゼイン (CN) および乾燥卵白 (EW) を用いた。腹腔内投与抗原および血清抗体測定用抗原として大豆たん白質には、脱脂大豆粉末 (Sigma) から63 mM トリス-塩酸緩衝液、pH 7.8で抽出し³⁾、透析、凍結乾燥したものを用いた。

SPI または EW をアジュバント [Freund の adjuvant (FA), Alum] あるいは生理食塩水と混合し、

2週間毎に4回、マウス (ddY) に腹腔内投与 (50 μ g/マウス) した。経時的に眼窩静脈叢より採血し、個体毎に血液を遠心分離し得られた血清を-20℃で保存した。

SPI, CN あるいは EW を含む精製飼料でマウス (BALB/c, B10. A) を2週間自由摂食飼育し、その後で採血し上記の方法で血清を得た。

血清中の特異抗体の検出には、酵素免疫測定法 (ELISA)⁴⁾ を用いて前報に従って測定した⁵⁾。

結果と考察

大豆たん白質を含む非精製飼料で飼育した ddY 系統のマウスの血液中に含まれる大豆たん白質に対する特異抗体 (IgG) を ELISA で調べた。13個体中5個体では、その血清中の抗-大豆たん白質抗体は検出限界以下であった。一方、残りの8個体では、個体差はあるものの有意な特異抗体応答が確認された (Fig. 1)。

そこで、前者 (5個体) を無応答群 (Group A)、後者 (8個体) を応答群 (Group B) とし、大豆たん白質を FA とともに腹腔内に投与した後の特異抗体応答に

ついて調べた。Fig. 2に示したように、腹腔内免疫後の特異抗体応答には著しい個体差が見られた。Group A の5個体のうち3個体では、抗原投与後の一次応答が明らかに抑制されていた。一方、Group B では8個体中6個体で特異抗体応答が観察され、そのなかの2個体では一次応答にもかかわらず高い抗体価が検出された。しかし、Group B の2個体は、2度の抗原の腹腔内投与によっても抗体応答は全く誘導されなかった。このように、大豆たん白質の経口摂取により、一部の個体では免疫応答が誘導され、また、一部の個体では寛容が誘導されていることが明らかとなった。さらに、抗原の経口摂取時の血清特異抗体の有無は、その後の腹腔内投与と抗原に対する免疫応答と寛容の誘導には必ずしも反映されないことが示唆された。

次に、大豆たん白質を含む非精製飼料で飼育した ddY 系統のマウスに、大豆たん白質を FA あるいは Alum と混合し、また、大豆たん白質単独 (PBS 溶液) で腹腔内に2週間間隔で4回投与した。投与期間中、経時的に採血し大豆たん白質に対する特異抗体価の変動を調べた。同様の実験を卵白たん白質に対しても行

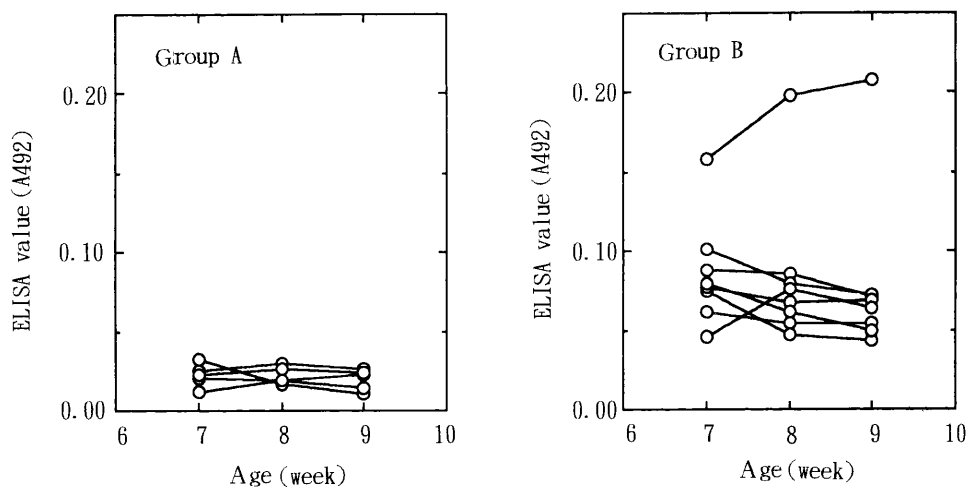


Fig. 1. Serum anti-soybean protein antibody (IgG) of ddY mice fed with commercially available non-purified diet containing soybean protein. Blood was collected from each mouse at age 7-, 8- and 9-weeks old, and serum anti-soybean protein antibody was analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each symbol represents individual mouse.

い、比較対照とした。大豆および卵白たん白質に対する抗体価の変動と、それに対するアジュバントの効果を Fig. 3に示した。

大豆たん白質をFAとともに投与したマウスでは、僅かに抗体価の上昇は見られたものの、その値は卵白に対する応答に比べて著しく低いものであった。しかし、Alumとともに投与したマウスでは、1回目の投与後に既に高い抗体応答が観察され、その後も卵白たん白質に対する応答に匹敵するほどの高い抗体価が維持された。一方、たん白質抗原を単独で腹腔内に投与したマウスでは、大豆たん白質と卵白たん白質の間に際だった差異が認められた。大豆たん白質を4回投与しても、期間を通して特異抗体の応答は全く観察されなかったが、卵白たん白質では、2回目の投与後に抗体価の上昇が見られ、さらに、3回目の投与によって更に急激に上昇し、アジュバントとともに投与した場合に匹敵するほどの高い抗体価に達した。

これらの結果から、大豆たん白質を含む非精製飼料の摂取により、大豆たん白質特異的に免疫寛容が成立

していることが示唆された。さらに、このような大豆たん白質の経口摂取による体内注入抗原に対する免疫応答の抑制作用は、抗原単独で注入された場合には極めて有効に働くが、抗原とともに投与されたアジュバントの種類によってはそのような抑制が解除されると考えられ、免疫系による抗原認識と応答の制御機構の複雑さが改めて示された。

大豆たん白質を含む非精製飼料で飼育した近交系マウスに、大豆たん白質を25%含む精製飼料を2週間自由摂取させ、その前後での大豆たん白質に対する抗体価の変動を調べた。また、用いた非精製飼料には大豆たん白質以外に牛乳たん白質が含まれているが、卵白たん白質は含まれていないことから、牛乳カゼインおよび卵白たん白質をたん白質源とする精製飼料を摂取させた群を設けて、同様に調べ比較対照とした。また、これまでの研究において、複数の経口投与抗原に対して高頻度に高い抗体応答を示した B10.A 系統のマウスと低い抗体応答あるいは無応答の頻度が高かった BALB/c 系統のマウスを用いた。

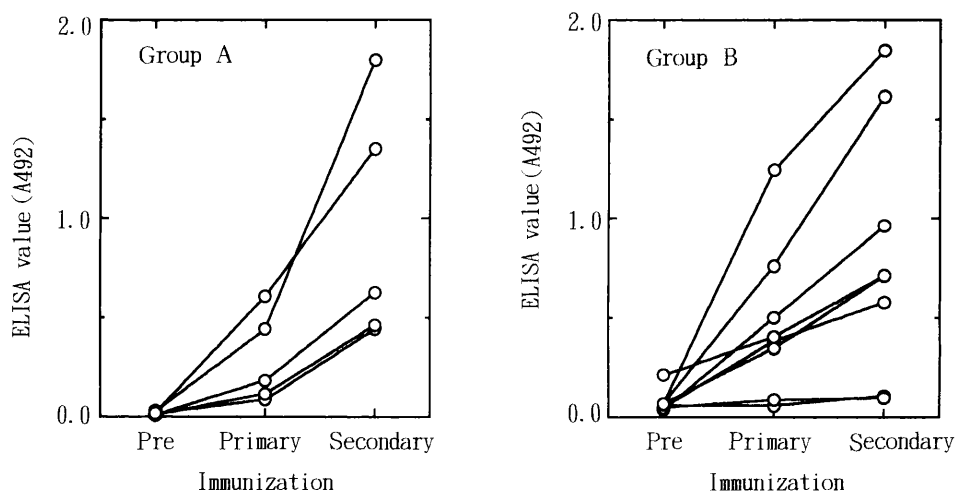


Fig. 2. Serum antibody response of ddY mice immunized with soybean protein and Freund's adjuvant. The mice fed with the non-purified diet were divided into two groups based on the level of serum antibody to soybean protein; mice with (Group B) and without (Group A) the specific antibody in their serum. Blood was collected before immunization (Pre), after the primary injection with Freund's complete adjuvant (Primary) and after the secondary injection with the incomplete adjuvant (Secondary).

Fig. 4に示したように、大豆たん白質の経口投与による抗体価の上昇はいずれの系統においても観察されず、一部の個体では、精製飼料摂取前に僅かに検出されていた血清特異抗体がむしろ減少した。一方、カゼ

インの経口摂取により、B10. A 系統のマウスでは、4 個体中 3 個体が強い抗体応答を示したが、BALB/c 系統のマウスでは、一部の個体で僅かな抗体価の上昇が見られたのみであった。さらに、卵白の経口摂取では、

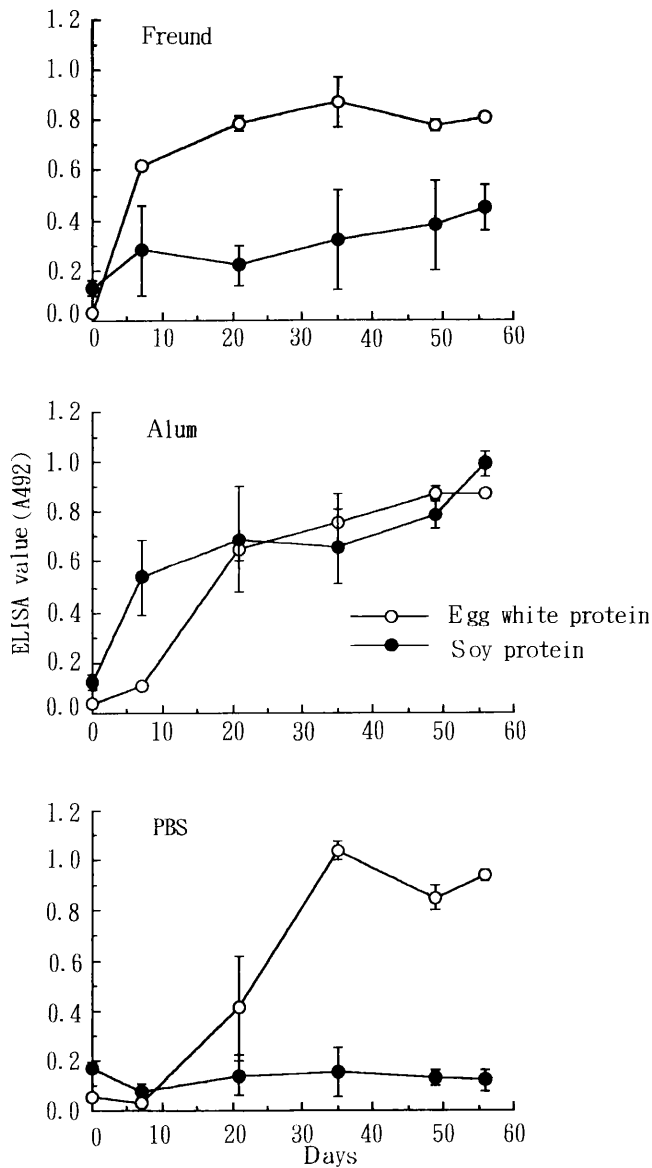


Fig. 3. Serum antibody response of ddY mice to soybean protein and egg white protein intraperitoneally injected with Freund's adjuvant, aluminium hydroxide gel (Alum) or phosphate buffered saline (PBS). Each point represents mean ELISA value of 2 mice.

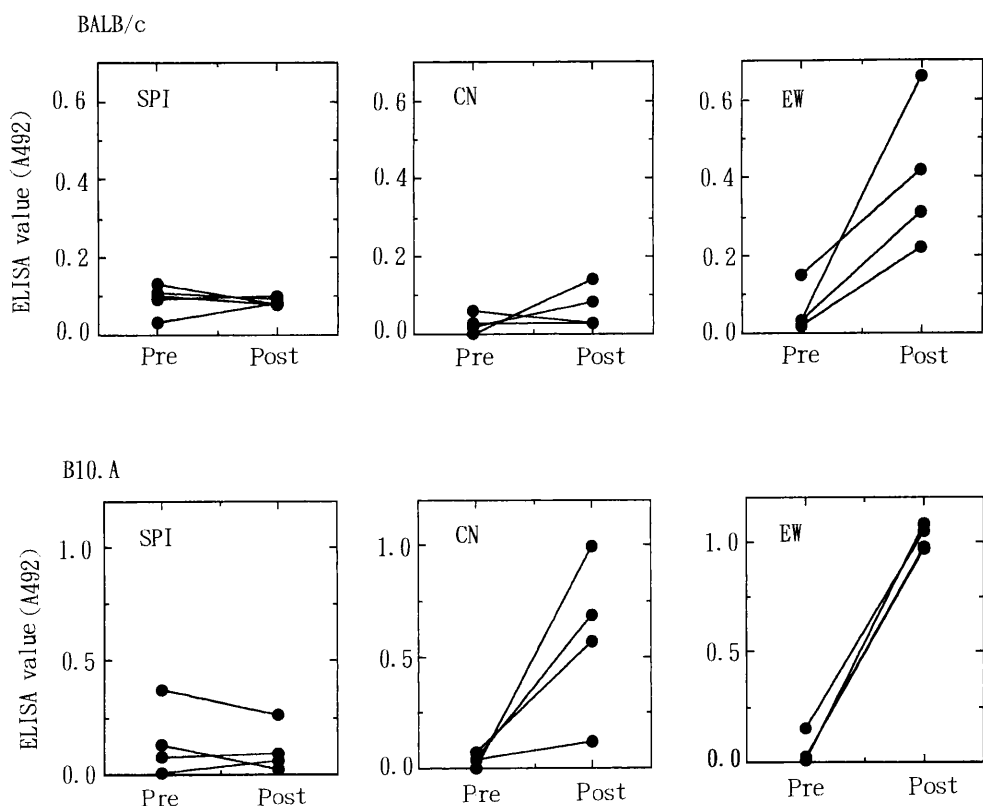


Fig. 4. Serum antibody (IgG) response of BALB/c and B10.A mice to soybean protein (SP), milk casein (CN) or egg white protein (EW) administered orally as diet. The mice were fed with the purified diet containing each protein for 2 weeks, and blood was collected before the feeding (Pre) and one week after the feeding (Post). Each point represents individual mouse.

いずれの系統も、全ての個体で強い抗体応答が見られた。

このように、大豆たん白質に関しては、非精製飼料の摂取により免疫寛容が成立しており、その後の大量の大豆たん白質の摂取によっても免疫応答は誘導されないことが明らかとなった。一方、カゼインでは、B10.A 系統のマウスでは経口摂取による抗体応答の誘導がみられたことから、非精製飼料中に含まれているにもかかわらず、その経口摂取による免疫寛容は必ずしも誘導されていないと考えられた。以上の結果から、大豆たん白質は、牛乳あるいは卵白たん白質に比べて経口免疫原性が低いあるいは経口寛容原性が高い可能性が示唆された。

文 献

- 1) Matsuda T and Nakamura R (1993): Molecular structure and immunological properties of food allergens. *Trends Food Sci & Technol*, **4**, 289-293.
- 2) 松田 幹, 石井哲也, 山本佳津恵, 中村 良 (1993): 大豆たん白質と油脂の酸化物の関与によるアレルギー活性の検討. 大豆たん白質研究会誌, **14**, 21-27.
- 3) Thanh VH and Sibasaki K (1976): Major proteins in soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **29**, 336-340.
- 4) Engval E and Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- 5) Matsuda T, Nakamura R, Nakashima I,

Hasegawa Y and Shimokata K (1985):
Human IgE antibody to the carbohydrate-
containing third domain of chicken

ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun*,
129, 505-510.