

大豆たん白質の低アレルギー化の検討：モデル実験系による解析

Development of Hypoallergenic Soybean Protein : Analyses Using Model Animals

小川 正・山西倫太郎・辻 英明・板東紀子(徳島大学医学部)

Tadashi OGAWA, Rintaro YAMANISHI, Hideaki TSUJI and Noriko BANDO

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

ABSTRACT

The allergenicity of two soy proteins was investigated using model animals. The serum from Balb/c mice immunized with Kunitz-type soybean trypsin inhibitor (KSTI), the most potent experimental allergen for Balb/c mice among soy proteins, exhibited the allergen specific reagenic activity either in the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test or in the micro-assay with RBL-2H3, a rat basophilic leukemic cell line. The serum from mice immunized with *Gly m* Bd 30K, a major allergen for patients with atopic dermatitis evoked by soybean intake, was also exhibited the allergen specific reagenic activity with the concentration dependent manner in the micro-assay. The mice immunized with *Gly m* Bd 30K accompanied by alum adjuvant were applied to the allergen feeding test after long interval from last immunization. The serum of mice fed with the allergen exhibited highly allergen specific reagenic activity in the micro-assay. The allergen-sensitized mice could be subjects in substitute for soybean allergic patients. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 62-66, 1995.

大豆は、栄養学的見地から良質たん白質源として高く評価されているが、日本人の三大アレルギー食品の一つでもあり、その恩恵を享受できない者も少なくない。我々は、この点を重視し、大豆のアレルギー性を担う分子の解明、さらには、その低アレルギー化を課題として研究を進め、IgEの関与するI型アレルギーを誘発する主要アレルギーたん白質として*Gly m* Bd 30Kを同定し、ダニアレルギー*Der p* Iとの相同性などについてすでに報告してきた¹⁾。ところで、ヒトを対象とする実験には、様々な制約を伴う。アレルギー研究の分野でも、動物を用いたモデル実験系が用いられてきており、大豆アレルギー研究に際しても、モデル実験系の利用は有効と考えられる。そこで、本研究では、皮下免疫法を用いた実験的感作によって大豆たん白質に

特異的なIgEを産生するマウスを作製し、まずアレルギー活性や血清レアギン活性を判定可能な培養細胞測定系を策定し、実際に二種類の大豆アレルギーたん白質についてその免疫血清のレアギン活性を検討した。さらにその測定系を用いて、感作済みのマウスにアレルギーを摂食させることによって生じる血清のアレルギー特異的レアギン活性の変化について検討した。

実験方法

実験材料及び試薬類

マウスの感作に用いる大豆たん白質としては、*Gly m* Bd 30KならびにKunitz型トリプシンインヒビター(KSTI)を用いた。*Gly m* Bd 30Kは、Kalinskyら

の方法²⁾を用いて、大豆種子より調製した。

大豆たん白質感作マウスの作製

水酸化アルミニウムアジュバントとともに、*Gly m Bd 30K*もしくはKSTIをBALB/cマウスの皮下に二週間間隔で4～5回投与し、感作を行った。投与一週間後に、尾静脈より少量採血し、ラットを用いたPassive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)反応により、アレルギー感作の確認を行うと同時に、イムノプロット法によりIgE産生の確認を行った。

PCA反応

PCA反応は、ラットの背中表皮を用いてOvaryらの方法³⁾を用いて行った。

培養細胞刺激実験によるアレルギー感作の確認

抗原感作されたマウスの血清と抗原を用いて、ラット好塩基球系白血病細胞RBL-2H3細胞⁴⁾を刺激し、分泌される β -N-アセチルヘキササミニダーゼ活性を測定した⁵⁾。実験プロトコルをFig. 1に示した。

SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE)及びイムノプロット

SDS-PAGEは、Laemmliらの方法⁶⁾に準じて行った。イムノプロットの手順は、前報⁷⁾に従って行い、検出には、アマシャム社のECL発光キットを用いた。

*Gly m Bd 30K*混合食の調製ならびに給餌

20%カゼイン食を基本食として、それに1 kgあたり0.2 gの*Gly m Bd 30K*を添加したもの(*Gly m Bd 30K*混合食)を調製した。マウスには、離乳以後基本食を給餌し、実験期間(一週間)は、*Gly m Bd 30K*添加食を給餌し*ad lib*で摂食させた。

結果及び考察

KSTIによるBALB/cマウスの感作とRBL-2H3細胞を用いた*in vitro*実験系の策定

大豆たん白質の中で最も主要な食餌性アレルギーは、*Gly m Bd 30K*である。しかしながら、水酸化アルミニウムアジュバントと共に大豆たん白質抽出物でBALB/cマウスを免疫した場合には、KSTIに対するIgEの産生されることが示されている⁸⁾。このようにKSTIは、大豆たん白質の中でマウスに対して最も強力なアレルギー感作能を持つ実験的アレルギーである。そこで、まずこのKSTIでマウスを免疫して得られた血清を用いて実験を行うこととした。

血清中にアレルギー特異的IgEが存在するかどうかを最も簡単に調べる方法として、抗IgE抗体を用いるイムノプロット法がある。しかし、この方法では、そ

のアレルゲンとIgE抗体の組み合わせが本当に生体内において、アレルギー応答を惹起可能であるか、即ち好塩基球または肥満細胞上において、高親和性IgE受

Inoculate 1×10^5 cells dispersed in $80 \mu\text{L}$ medium^a into each well of 96 well micro-plate

Incubate at 37°C under humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 24 hours

Add $20 \mu\text{L}$ of the medium containing the antibody

Incubate at 37°C under humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 1 hours

Discard the medium

Wash with HBS^b for three times

Add the $100 \mu\text{L}$ of HBS containing the allergen

Transfer $40 \mu\text{L}$ of supernatant into another 96 well micro-plate

Add $10 \mu\text{L}$ of the substrate solution^c

Incubate at 37°C for 1 hr

Add $125 \mu\text{L}$ of stop solution^d

Measure OD at 415 nm by micro-plate reader

^a MEM containing 10% FCS

^b 10 mM HEPES buffered saline

^c 4 mM p - nitropheny - N - acetyl - β - D - glucosaminide in citrate buffer, pH 4.5

^d 0.5 M Sodium carbonate, pH 10.0

Fig. 1. Protocol of micro assay using RBL-2H3 cells

Control Serum	Anti-KSTI Serum		
	1/100	1/10	1/1

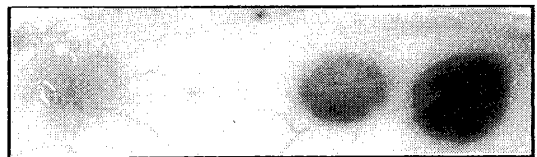


Fig. 2. Results of the PCA test. The mouse anti-KSTI serum at given dilutions and an undiluted non-immunized control serum were intracutaneously injected. After 2 hours, a solution containing 0.1% KSTI and 0.5% Evans blue was intravenously injected.

容体の架橋形成が可能であることを判定することはできない。そこで、従来、動物のアレルギー感作の確認には、その個体の血清を他の個体に注射し、局所的にアレルギー応答を再現する受動皮膚アナフィラキシー(PCA)反応が用いられてきた。Fig. 2にKSTI免疫マウス血清を用いたPCA反応の結果を示す。非免疫マウス血清では全く応答しないが、KSTIを投与されたマウスの血清を用いた場合には血清濃度とアレルギー応答の激しさに正の相関があることから、このマウスは、KSTIによるアレルギー感作の成立した状態にあることが確認された。

*in vivo*実験系であるPCA反応は、アレルギー反応の数値処理など科学的解析において客観性に欠ける面があり、また多数のサンプルを処理するのに適した実験系とはいいがたい。これまで、細胞内情報伝達の解析に用いられてきたRBL-2H3細胞は、*in vitro*でアレルギー応答を確認できる株化細胞である⁴⁾。この細胞を用いて、マウス血清のレアギン活性やアレルギー物質のスクリーニングを行う実験系を策定した。Fig. 2で確認されたKSTI感作マウスの血清、ならびに抗原であるKSTIを、好塩基球系白血病細胞株であるRBL-

2H3からの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ分泌実験に適用した結果がFig. 3である。本酵素は、アレルギー応答時にヒスタミンなどと平行に放出されることが示されている^{9,10)}。Fig. 3から明らかなように、用いられた免疫血清の濃度依存的に細胞からの酵素放出量が増大した。このように、RBL-2H3細胞応答の結果は、PCA反応の結果とほぼ平行な関係にあったことから、RBL-2H3細胞を用いる実験系は、PCA反応と同等のアレルギー応答解析実験系として有用であることが示された¹¹⁾。本研究では、アレルギー応答の数値的判断や実験デザインの容易さを考慮し、以後のアレルギー応答解析には、このRBL-2H3細胞応答実験系を適用することにした。

主要大豆アレルギーたん白質である *Gly m Bd 30K* によるマウスの感作

KSTIの場合と同様に水酸化アルミニウムアジュバントを用いて、マウスを *Gly m Bd 30K* で免疫し、得られた血清について、antiマウスIgEを用いたイムノブロットならびに、RBL-2H3細胞応答反応について検討した。Fig. 4は、*Gly m Bd 30K* の免疫血清(レーン1)または非免疫血清(レーン2)によるイムノブ

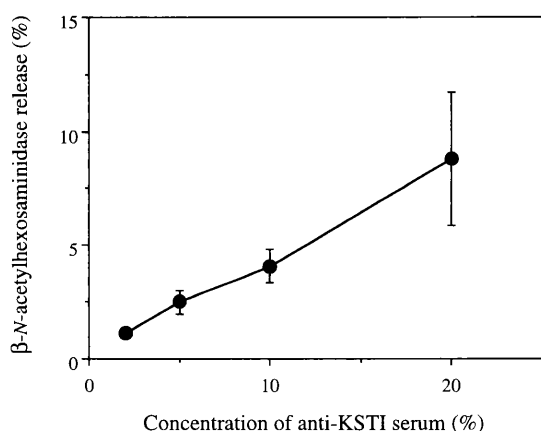


Fig. 3. β -N-Acetylhexosaminidase released from RBL-2H3 cells after treating with the mouse anti-KSTI serum. One $\times 10^5$ RBL-2H3 cells were pre-incubated with various concentrations of the mouse anti-KSTI serum for 1 hour at 37°C and subsequently incubated with 0.1 μ g/mL of KSTI for 1 hour at 37°C.

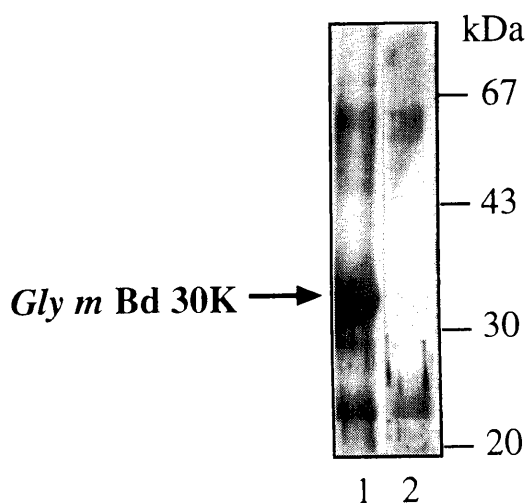


Fig. 4. Immunoblots for *Gly m Bd 30K*. Purified *Gly m Bd 30K* was loaded on SDS-PAGE and electrotransferred onto pieces of nitrocellulose membrane. The nitrocellulose membrane was incubated with serum from mice immunized against *Gly m Bd 30K*, lane 1 or non-immunized serum, lane 2. Subsequently the membrane was incubated with the peroxidase labeled anti-mouse IgE. Reacted IgE was detected by a enhanced chemiluminescence kit.

ロットの結果である。レーン1には、*Gly m Bd 30K*の分子量の位置にレーン2には見られない濃いバンドが存在する。このことは、免疫血清中にのみ*Gly m Bd 30K*と特異的に結合するIgEが存在することを示している。またFig. 5に示したように、用いた血清濃度依存的に*Gly m Bd 30K*によるRBL-2H3細胞からの β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ放出が起こった。この結果から、水酸化アルミニウムアジュバントと共に*Gly m Bd 30K*をマウスの皮下に投与することで、*Gly m Bd 30K*とに結合し、しかもRBL-2H3細胞応答を惹起可能な*Gly m Bd 30K*特異的IgEの産生が誘導可能であることが明らかとなった。

食餌によるアレルゲン特異的IgEの誘導

我々は、これまでに経口投与によりマウスを初回免疫する事を試みたが、成功を見ていない。実験動物を用いて摂食性のアレルギーを検討する場合には、検討するアレルゲンに対し反応性の高い系統を選択して、実験に供するのが定法である。しかしながら、通常購入可能な実験動物は、大豆たん白質を主要なたん白質として包含した飼料を給餌されており、大豆に対してアレルギー応答を示すような個体は、すでに淘汰されているのではないかと考えられ、このことが大豆の経

口投与による初回免疫が不調である原因ではないかと思われる。そこで、あらかじめ皮下免疫によって*Gly m Bd 30K*特異的なIgEを産生できるようにしておいたマウスについて、*Gly m Bd 30K*摂食による血清IgE応答を検討した。最終皮下投与から長期間おき、摂食開始直前の血液ならびに、一週間*Gly m Bd 30K*混合食を摂食した後の血液を、それぞれの時点でマウスの尾静脈よりサンプリングした。Fig. 6から明らかなように、摂食後の血清とインキュベートしたRBL-2H3細胞は、摂食前の血清とインキュベートしたものと比較して、*Gly m Bd 30K*に対して明らかに高い応答性を示した。このことは、アレルゲンの摂食によって、それに特異的IgEの産生が惹起されたことを示唆している。この実験系は、大豆に対して感受性を示すアレルギー患者のモデルとして、低アレルゲン化食品の安全性などを検討する面で有効であると考えられる。

文 献

- 1) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhn Y-L, Hirano H and Nishikawa K (1993) : Identification of the soybean allergenic protein,

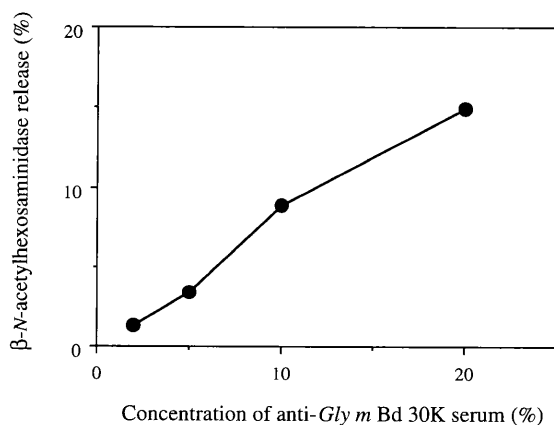


Fig. 5. β -*N*-Acetylhexosaminidase released from RBL-2H3 cells after treating with the mouse anti-*Gly m Bd 30K* serum. One $\times 10^5$ RBL-2H3 cells were pre-incubated with various concentrations of the mouse anti-*Gly m Bd 30K* serum for 1 hour at 37°C and subsequently incubated with 10 μ g/mL of *Gly m Bd 30K* for 1 hour at 37°C.

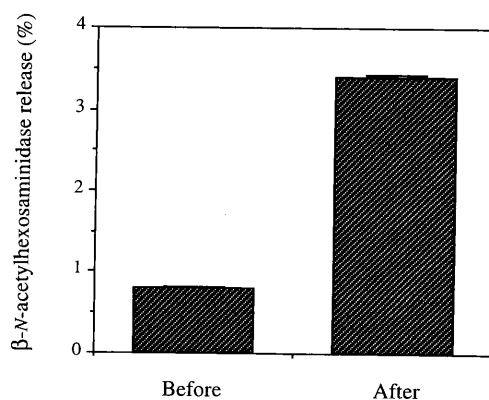


Fig. 6. β -*N*-Acetylhexosaminidase release from RBL-2H3 cells pre-incubated with serum before or after allergen feeding. One $\times 10^5$ RBL-2H3 cells were pre-incubated with the medium containing 10% of the mouse anti-*Gly m Bd 30K* serum obtained before or after allergen feeding for 1 hour at 37°C and subsequently incubated with 10 μ g/mL *Gly m Bd 30K* for 1 hour at 37°C.

- Gly m* Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1030-1033.
- 2) Kalinsky A, Weisemann JM, Mathews BF and Herman EM (1990) : Molecular cloning of a protein associated with soybean oil bodies that is similar to thiol protease of papain family. *J Biol Chem*, **265**, 13843-13848.
 - 3) Ovary Z (1958) : Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antigen-antibody interaction. *Prog Allergy*, **5**, 459-508.
 - 4) Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG and Siraganian RP (1981) : IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines : isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol*, **11**, 317-323.
 - 5) Landegren U (1984) : Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods*, **67**, 379-388.
 - 6) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
 - 7) Tsuji H, Bando N, Kimoto M, Okada N and Ogawa T (1993) : Preparation and application of monoclonal antibodies for a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of the major soybean allergen, *Gly m* Bd 30K. *J Nutr Sci Vitaminol*, **39**, 389-397.
 - 8) Ogawa T, Tsuji H, Bando N and Sasaoka K (1992) : Identification of a soybean proteins producing IgE antibodies in Balb/c mice. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 978-979.
 - 9) Schwarz LB, Austen KF and Wasserman SI (1979) : Immunologic release of β -hexosaminidase and b-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol*, **123**, 1445-1450.
 - 10) Schwarz LB, Lewis RA, Seldin D and Austen KF (1981) : Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol*, **126**, 1290-1294.
 - 11) Yamanishi R, Kondo K, Tsuji H and Ogawa T (1995) : Micro-assay to measure the allergenicity of Kunitz-type soybean trypsin inhibitor toward Balb/c mice by using RBL-2H3 cells. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 1272-1275.