

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 (第2報)

Immunological Response and Tolerance to Dietary Soybean Protein

松田 幹・青木直人・安達貴弘・中村 良 (名古屋大学農学部)

Tsukasa MATSUDA, Naohito AOKI, Takahiro ADACHI and Ryo
NAKAMURA

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

ABSTRACT

Immune response of several inbred mice to fed soybean proteins was investigated to get information on immunogenic properties of soybean proteins. The inbred mice (A/J, BALB/c, C57BL/6, C3H/He, DBA/2, B10. A and B10. D2) were fed a purified diet containing 25% soy protein isolate (SPI) as a protein source, and blood was collected individually from each mice before and after the soy protein feeding. Measurement of serum antibodies specific for major soybean proteins such as 2S, 7S and 11S fractions indicated that no remarkable antibody response was induced in these mice by the feeding with the SPI-based diet. However, a considerable level of serum antibody to soybean proteins was shown to exist already in several mice before the feeding, probably due to the pre-sensitization by soy protein antigens contained in commercial non-purified diet used for the mouse breeding. Several antigens recognized by the pre-existing antibodies were further purified from 2S fraction, and their antigenic and trypsin inhibitory activities measured for each sub-fraction indicated that the major antigens differed from mouse to mouse and antigenic activity did not necessarily correlate to trypsin inhibitory activity. Such pre-existing antibodies to soy proteins were remarkably decreased by feeding with the SPI-based diet, suggesting that oral immune tolerance to soy protein antigens was induced by the SPI feeding. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 87-93, 1995.

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を持つ個体が存在することを明らかにしてきた¹⁾。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、その詳細は明かではない。そこで本研究では、7系統の近交系マウスを用いて、大豆たん白質経口摂取前後における大豆たん白質主要画分(2S, 7S, 11S)に特異的な血清抗体の変動を測定することにより、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調べた。また、マウス血清抗体により特異的に認識される大豆たん白質抗原を精製し、マウス個体ごとにそれ

らの抗体の抗原認識パターンを比較した。さらに、大豆アレルギーに対する大豆油の関与の可能性が一部の臨床医学者により示唆されているため、大豆レシチンを大豆たん白質と同時に経口摂取させ、大豆たん白質抗原に対する免疫応答におよぼす大豆レシチンの影響についても検討した。

実験方法

実験動物および抗原投与

実験開始時において6～8週齢の近交系(A/J, BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2, B10. A, B10.

D2) 雌マウスを用いた。精製飼料はAIN推奨の組成で、たん白質含量は25%とした。たん白質源として分離大豆たん白質 (SPI) を用いた。また、精製飼料乾燥重量に対して10%の大豆レシチンを添加して、十分に混合したものをレシチン添加飼料とした。精製飼料は一日にマウス体重100 g当たり20 gを与え、自由摂取させた。また、精製飼料を摂取しない期間は、市販の非精製飼料 (CE-2, 日本クレア) で飼育した。Fig. 1に示すように、2週間の間隔において2回 (実験開始後1日目から7日目までと22日目から28日目まで) SPIを含む精製飼料を摂取させた。その間、経時的に眼下静脈洞より採血し、個体毎に血液を遠心分離して得られた血清を-20°Cで保存した。

血清抗体の測定

血清抗体測定用抗原としての大豆たん白質には、脱脂大豆粉末 (Sigma) から63mMトリス-塩酸緩衝液、pH7.8で抽出し²⁾、透析、凍結乾燥したものをを用いた。さらに、前報³⁾に従い2S, 7S, 11S画分を調製した。2S画分については、イオン交換 H P L C (TSK-gel DEAE-5PW) を用いてさらに分画した。分画した大豆たん白質に対する血清中の特異抗体の検出には、100倍希釈した血清について酵素免疫測定法 (ELISA)⁴⁾を用いて前報に従って測定した³⁾。

トリプシン阻害活性の測定

大豆たん白質2S画分について、ウシトリプシンに対する阻害活性を合成基質BAPA (α -N-benzoyl-L-ar-

ginine-p-nitroanilide)を用いて既報⁵⁾に従って測定した。酵素反応は50 mM CaCl₂を含む5 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で37°Cで行い、420 nmの吸光度を連続的に記録し、トリプシン活性は単位時間当たりの吸光度変化 (Δ 420 nm) で表した。阻害活性は、サンプルの添加により低下したトリプシン活性として表示した。

結果と考察

SPI精製飼料摂取による血清抗体の変動

近交系のマウスを大豆たん白質を含む精製飼料で飼育し、血液中含まれる大豆たん白質主要画分に対する特異抗体 (IgGおよびIgE) をELISAで調べた。7系統、合計35匹のマウスについて測定したが、SPIの経口摂取によって大豆たん白質に対する特異抗体の顕著な上昇は観察されなかった。しかし、BALB/c, B10.A, B10.D2系統の一部の個体の血清中に、SPIの経口摂取以前に、既に大豆たん白質に対する特異IgG抗体が存在した。Fig. 2に示すように、2個体のBALB/cで、それぞれ2Sおよび11S画分に対する抗体が、また、3個体のB10.D2では、それぞれ2, 7および11S画分に対する抗体が検出された。B10.Aでは7Sに対する特異抗体が存在した。これらの大豆たん白質に対するIgG抗体は、6個体全てにおいてSPIの摂取により増加せず、むしろ顕著に低下した。さらに、2回目のSPI摂

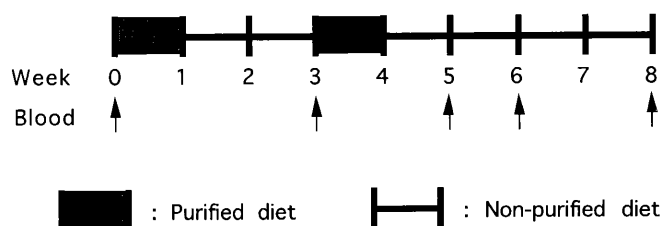
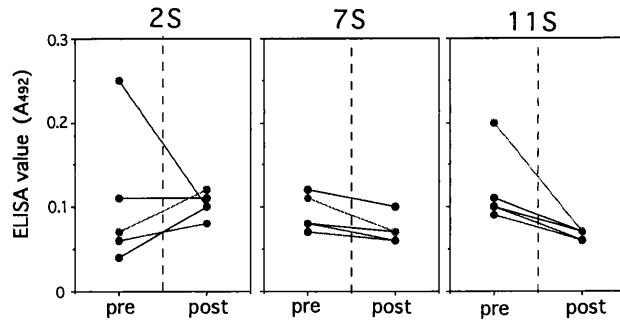
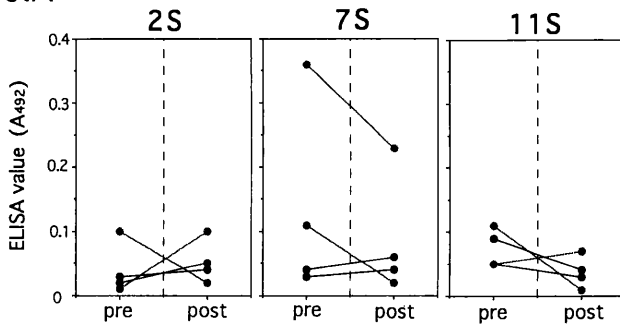


Fig. 1. Periodic schedule of SPI-feeding and bleeding of mice. Various strains of inbred mice were fed SPI-based purified diet twice with a two-week interval. They were fed commercial non-purified diet during the residual period. Blood was collected from each mouse at days 0, 21, 35, 42 and 56 as indicated by arrows.

BALB/c



B10.A



B10.D2

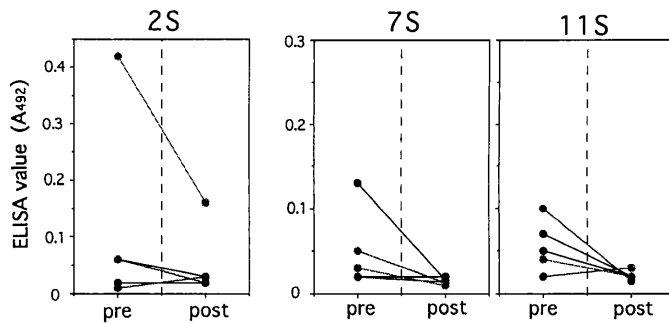


Fig. 2. Changes in serum antibody to soybean proteins of some inbred mice by SPI-feeding. The data of blood samples collected before feeding (Pre) and after the second feeding (at day 35) were shown as representatives. The serum antibodies specific for soybean 2S, 7S and 11S fractions were analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each symbol represents individual mouse.

取の2および4週間後に採血し、血清抗体を測定したが、大豆たん白質に対する特異抗体は検出されなかった。

購入したクローズドコロニーマウス (ddY) 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既に報告したが¹⁾、今回の研究により、近交系マウスにおいても、系統によって大豆たん白質に対する抗体を産生している個体が存在することが明らかとなった。これは、おそらく離乳後に摂取した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る。これらの抗体がSPI摂取により顕著に減少したことから、SPIの経口摂取は免疫寛容を誘導したと考えられた。同様に非精製飼料中にはたん白質源として脱脂粉乳も含まれるが、牛乳カゼインの経口摂取により、DBA/2においてカゼインに対するIgGおよびIgE抗体の産生が誘導されることが明らかとなっている。大豆たん白質がカゼインに比べて経口免疫寛容を誘導し易いか否かを明らかにするためには、更に寛容誘導に関する定量的な研究が必要であろう。

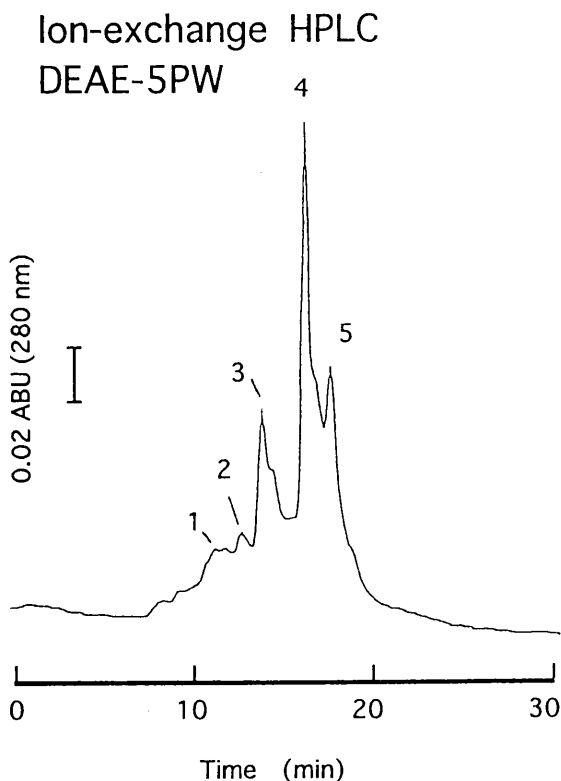


Fig. 3. HPLC analysis of proteins in the soybean 2S fraction. The 2S fraction prepared from defatted soybean meal was further fractionated by ion-exchange HPLC. The proteins dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, applied to a column (TSK-gel DEAE-5PW) and eluted with a linear NaCl gradient for 30 min. Flow rate was 1 mL / min and elution profile was monitored by UV absorbance at 280 nm. Each peak (numbered 1 to 5) was collected and used for further analyses.

マウス血清抗体により認識される2S画分たん白質

BALB/cおよびB10.D2のいくつかの個体において、実験開始前の血清中に2S画分に対して比較的高い抗体価が認められた。そこでこれらの血清に含まれる抗体と2S画分に含まれるたん白質との反応特異性を調べた。まず2S画分に含まれるたん白質をイオン交換HPLCでさらに分画した。すなわち、透析後、凍結乾燥した2S画分を50 mM Tris-HCl緩衝液に溶解し、カラムに注入した後、吸着したたん白質を同緩衝液に加えた0～0.5 M/30 minの直線の塩 (NaCl) 濃度勾配により1 mL/minの流速で溶出した。Fig. 3に示すように3つの主要ピークといくつかの小さなピークが検出された。1～5のピークを分取し、各々についてマウス血清IgG抗体との反応性をELISAで調べた。Fig. 4に示した2個体の例のように、各ピークとの抗体の反応性のパターンには個体間で差が見られたが、ピーク

1, 4, 5が高く、ピーク2, 3が低い傾向が見られた。2S画分にはトリプシンインヒビターが含まれているため、分離した各ピークについてトリプシン阻害活性を測定した。Fig. 5に示すようにピーク1に最も高い阻害活性が検出されたが、ピーク5には極僅かの阻害活性しか検出されなかった。このようにトリプシン阻害活性と抗原性は対応しないことと、マウス個体によって抗原となるたん白質成分が異なることから、2S画分の抗原たん白質は必ずしも大豆トリプシンインヒビター (KSTI) のみではないと推定される。ヒトにおいてもKSTIに対するアレルギー反応には個人差があり、これまでに大豆アレルギー患者について、KSTIがアレルゲンになっている症例⁶⁾とそうでない症例⁷⁾が報告されており、系統間さらに個体間でのKSTIに対する免疫応答の差異が見られたマウスにおける実験結果と矛盾しない。

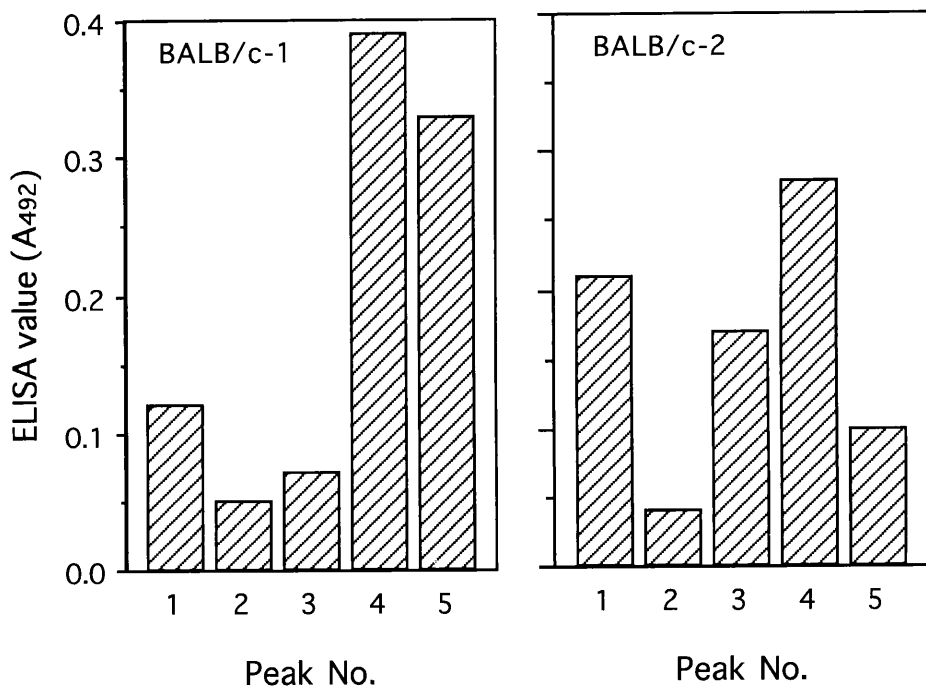


Fig. 4. Trypsin inhibitory activity of proteins in soybean 2S fraction. The proteins fractionated by HPLC (Fig. 3) were assayed for their trypsin inhibitory activity. Trypsin activity was measured spectrophotometrically by using α -N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide as substrate.

経口摂取大豆たん白質に対する免疫応答におよぼす大豆レシチンの影響

脂質2重膜のリポソームを形成するなど優れた界面活性剤として知られるリン脂質である大豆レシチンが、消化管内の未分解のたん白質抗原の体内への取り込みやその後の抗原認識や免疫応答に影響する可能性について調べた。5匹のBALB/cに10%の大豆レシチンを添加したSPI精製飼料を、実験1と同様に経口摂取させ、血清中の大豆たん白質に対する抗体価の変動を測定した。Fig. 6に示すように、レシチンを同時に摂取しても主要大豆たん白質画分に対する抗体価の上昇は観察されなかった。また、いくつかの個体において実験

開始前に大豆たん白質に対する特異IgG抗体が検出されたが、レシチンとともにSPIを摂取することにより顕著に減少した。従って10%程度大豆レシチンの同時摂取は経口摂取大豆たん白質に対する免疫応答には大きくは影響しないことが明らかとなった。

卵白や牛乳カゼインと異なり、SPIの経口摂取によつてはこれまでに用いた系統のマウスに対しては免疫応答を誘導することができなかった。このようなSPIのマウスにおける経口免疫原性が低い理由は未だ明らかではないが、1) 大豆たん白質が卵白やカゼインに比べて経口免疫寛容を誘導し易い、2) 未分解の

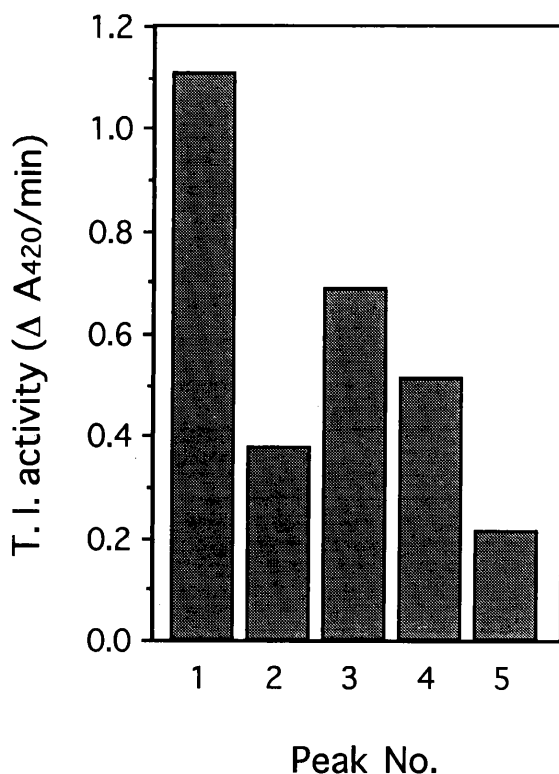


Fig. 5. Antigenic activity of proteins in soybean 2S fraction. The proteins fractionated by HPLC (Fig. 3) were assayed for their antigenic activity to serum antibodies of BALB/c mice. Two representative results are shown, and apparent antibody concentration specific for antigens in each peak was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm).

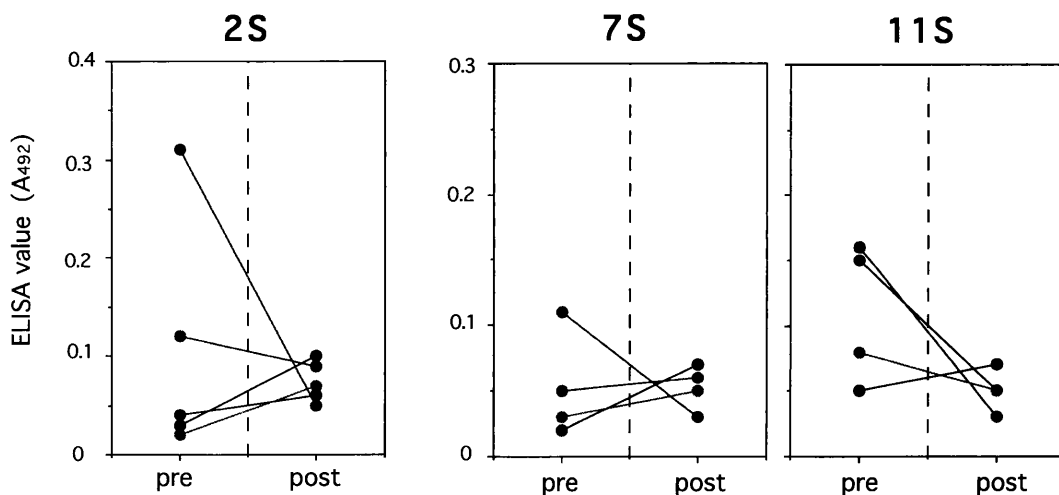


Fig. 6. Changes in serum antibody to soybean proteins of BALB/c mice by feeding SPI and soybean lecithin. The data of blood samples collected before feeding (Pre) and after the second feeding (at day 35) were shown as representatives. The serum antibodies specific for soybean 2S, 7S and 11S fractions were analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each symbol represents individual mouse.

大豆たん白質の体内への取り込み効率が低い, 3)SPIに加工することにより大豆たん白質の免疫活性が低下する, などが考えられる。これらの問題について現在さらに研究を進めている。

文 献

- 1) 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ゲン活性の検討. 大豆たん白質研究会会誌, **14**, 21-27.
- 2) Thanh VH and Sibasaki K (1976): Major proteins in soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **29**, 336-340.
- 3) 松田 幹, 石井哲也, 青木直人, 中村 良 (1994): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **15**, 109-114.
- 4) Engval E and Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- 5) Matsuda T, Watanabe K and Nakamura R (1982): Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochim Biophys Acta*, **707**, 121-128.
- 6) Moroz LA and Yang WH (1980): Kunitz soybean trypsin inhibitor—a specific allergen in food anaphylaxis. *N Engl J Med*, **302**, 1126-1128.
- 7) Herian A, Taylor SL and Bush RK (1990): Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **92**, 193-198.