

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3報)

松田 幹*・山口研志・中村 良

名古屋大学農学部

Immunological Response and Tolerance to Dietary Soybean Protein

Tsukasa MATSUDA, Kenji YAMAGUCHI and Ryo NAKAMURA

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

ABSTRACT

Immune response of infant mice to fed soybean proteins was investigated to get information on oral-immunogenic properties of soybean proteins. The 5 strains of inbred mice (A/J, BALB/c, C57BL/6, C3H/He, DBA/2) of 3 week-old were fed a purified diet containing the defatted soybean flour (50% by weight) as a protein source. Blood was collected individually from each mouse before and after the soybean protein feeding. Measurement of serum antibodies specific for major soybean proteins such as 2S, 7S and 11S fractions indicated that weak but definite antibody response was induced in A/J mice by the feeding with the defatted soybean-based diet. To estimate oral-tolerance these mice were received the i. p. injection of crude soybean protein with Freund's adjuvant and serum antibody response was examined. The marked IgG response to 7S fraction was induced for all the 5 strains, whereas no or very weak IgG response to 2S and 11S fractions was induced for C3H/He and C57BL/6 strains, suggesting that oral tolerance to the 2S and 11S fractions was induced in a strain-dependent manner. Furthermore, no IgE response to 11S fraction was induced for all the 5 strains, and C3H/He and C57BL/6 mice showed IgE response to neither of the three soybean protein fractions. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 66-70, 1996.

Key words : soybean allergy, antibody response, oral immunogenicity, oral tolerance

食品たん白質の経口免疫原性に関するこれまでの一連の研究において、分離大豆たん白質(SPI)は他の食品たん白質(牛乳, 卵, 米)に比べて, マウスにおける消化管経由での免疫応答を誘導しにくい傾向がみられた¹⁾. また, 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したが, 大豆たん白質の経口摂取により, 全ての個体においてその血清抗体は増加せず, むしろ減少した²⁾. このように食餌性大豆たん白質抗原に対して低い抗体応答が観察される原因として, SPIに含まれるたん白質抗原が製造過程で変性し, 経口免疫原性が低下している可能性, あるいは離乳後,

*〒464-01 名古屋市中種区不老町

摂取した非精製飼料中に含まれる大豆たん白質により経口免疫寛容が誘導された可能性などが考えられる。

そこで今年度は、SPIの経口免疫原性が低い原因の一つを探るために、大豆たん白質の主要成分について経口免疫寛容原性を中心に比較検討した。変性たん白質は一般に経口免疫原性が低いため、未変性たん白質を多く含むと考えられる脱脂大豆粉をSPIの代わりに用いて、5系統の近交系マウスに飼料とともに経口摂取させ、血清抗体応答を調べた。さらに、経口免疫寛容の誘導の有無を調べるために、大豆たん白質を経口摂取させたマウスに同一抗原をFreundのアジュバントとともに腹腔内投与し、抗原特異的な抗体応答の抑制を調べた。

実験方法

実験動物および抗原投与

実験開始時において3週齢の近交系(A/J, BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2) 雌マウスを用いた。精製飼料はA I N推奨の組成で、たん白質含量は25%とした。たん白質源として不二製油より供与された脱脂大豆粉を用いた。脱脂大豆粉中のたん白質含量を50%として、精製飼料中の脱脂大豆添加量を50%とした。脱脂大豆粉中に含まれるたん白質以外の成分に相当する重量のしょ糖とスターチを削減し、最終的に約25%のたん白質を含む大豆たん白質精製飼料を調製した。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(C E-2, 日本クレア)で飼育した。Fig. 1 に示すように、3週間の間隔をおいて2回(実験開始後1日目から7日目までと28日目から35日目まで)脱脂大豆粉を含む精製飼料を摂取させた。その間、経時的に眼窩静脈洞より採血し、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。次に、精製飼料の最終投与から8週間、市販の非精製飼料で飼育した後、粗大豆たん白質(2 S, 7 S, 11 S 画分を含む)をFreund's 完全アジュバントとともに腹腔内投与(50 μ g/マウス)した。さらにその4週間後に Freund's 不完全アジュバントとともに同量の抗原を追加投与した。

血清抗体の測定

血清抗体測定用抗原として的大豆たん白質には、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。さらに、既報に従い2 S, 7 S, 11 S 画分を調製した。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^{1,2)}。

結果と考察

実験期間中のマウスの体重変化

離乳直後(3週齢)から最初の腹腔内投与後(17週齢)まで、個体ごとの体重を測定し、脱脂大豆粉の摂取がマウスの生育に及ぼす影響を調べた。実験期間中の体重変化を各系統ごとに4個体の平均値としてFig. 1 に示した。実験開始後3週目までは体重は順調に増加したが4週目くらいに増加率が鈍くなり、2回目の脱脂大豆粉摂取期間には全ての系統で体重が10~20%程度減少した。その後、市販の非精製飼料に戻して飼育すると体重は再び増加し、1週間でもとの体重レベルまで回復した。

SPIをたん白質源とした精製飼料で飼育したマウスでは、これまでに生育の抑制や体重の減少は観察されなかったことから、脱脂大豆粉摂取期間に観察されたマウス体重の減少の原因は、脱脂大豆粉中に存在する未変性のトリプシンインヒビターやレクチンによるたん白質分解抑制や消化管上皮の機能障害などが考えられる⁵⁾。

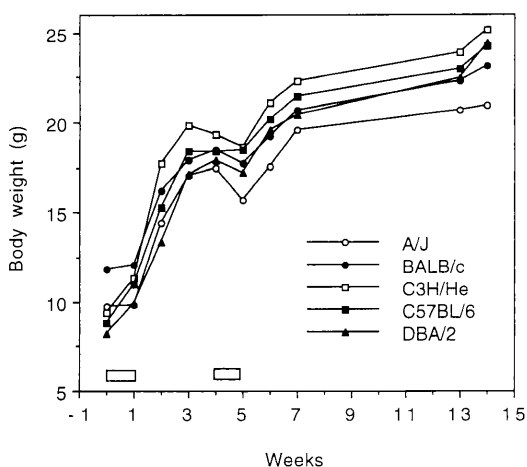


Fig. 1. Changes in the body weight of five strains of mice fed the soybean protein diet. The 5 strains of inbred mice were fed defatted soybean flour-based purified diet twice with a three-week interval (shown as open squares). They were fed commercial non-purified diet during the rest of the period. Each point represents mean.

脱脂大豆粉摂取による血清特異抗体の変動

脱脂大豆粉を含む精製飼料の摂取前後における血清中の抗大豆たん白質抗体の変動を、粗大豆たん白質を抗原としてELISAで調べた。Fig. 2に示すように、A/J系統の一部の個体にIgG抗体の増加が見られたが、他の系統では顕著な抗体価の上昇は観察されなかった。BALB/cおよびC3H/Heでは、6週齢のマウスにSPIを経口摂取させた時と同様に、摂取前に

存在した特異抗体が大豆たん白質の経口摂取により減少する傾向が見られた。また、IgE抗体に関しては、A/Jにおいて1回目の摂取後に弱い応答が見られた。このIgE応答は弱いものではあるが、A/Jマウス4個体全てに観察され、実験期間を通して低いレベルに保たれていたC57BL/6と比較すると有意に高いものであった (Fig. 3)。これまでの6週齢のマウスを用いてSPIを経口摂取させた実験系ではBALB/cマウ

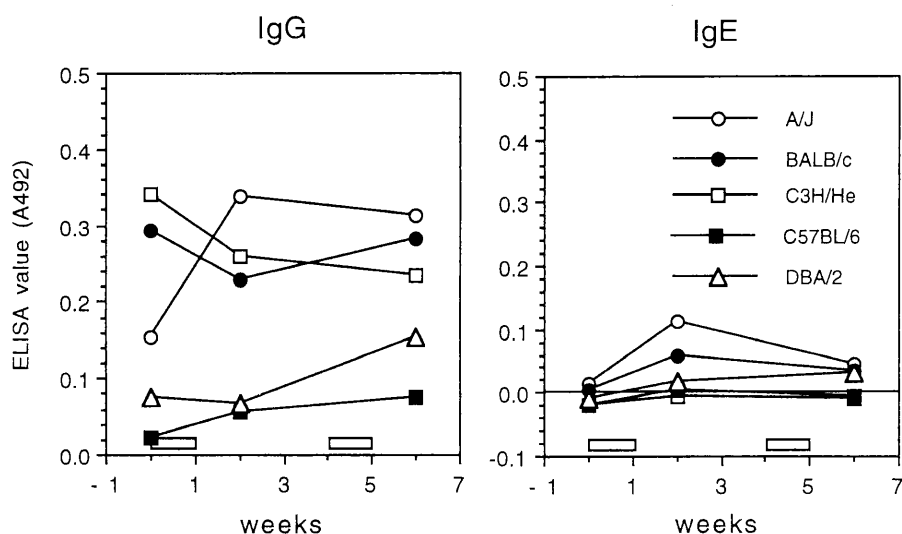


Fig. 2. Changes in serum IgG and IgE antibody to soybean protein of 5 inbred mice by feeding on defatted soybean-based diet. The serum antibodies specific for crude soybean protein were analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration is shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each point represents mean of 4 mice. The open square indicates the period of feeding on the defatted soybean-based diet.

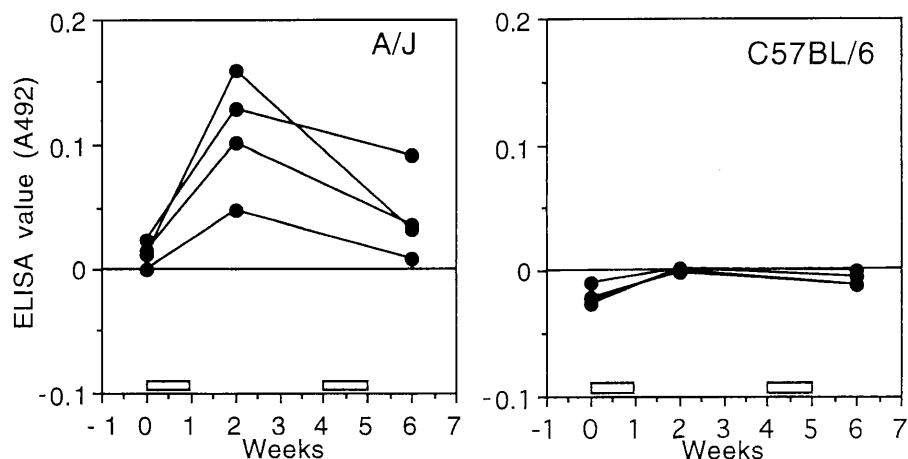


Fig. 3. Changes in serum IgE antibody to soybean protein of A/J and C57BL/6 mice by feeding on defatted soybean-based diet. The serum IgE antibody specific for crude soybean protein was analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration is shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each point represents the value for each mouse. The open square indicates the period of feeding on the defatted soybean-based diet.

スに2S画分に対する弱いIgG応答が見られた以外は、大豆たん白質に対する特異抗体応答は観察されなかった。今回初めてIgE応答が観察されたが、これは3週齢のマウスを用いたためか、あるいはたん白質源として脱脂大豆粉を用いたためのいずれか、または両方のためと推定される。離乳直後のマウスに未変性たん白質を多く含む脱脂大豆粉を摂取させたため、免疫系

が過度に刺激され、IgE応答が誘導されたものと考えられる。

経口摂取による免疫寛容の誘導

2回目の脱脂大豆たん白質摂取後、8週間、市販の固形非精製飼料で飼育し、大豆たん白質主要画分に対する血清抗体を測定し、低いレベルの抗体しか検出されないことを確認した。次に、大豆たん白質に特異的

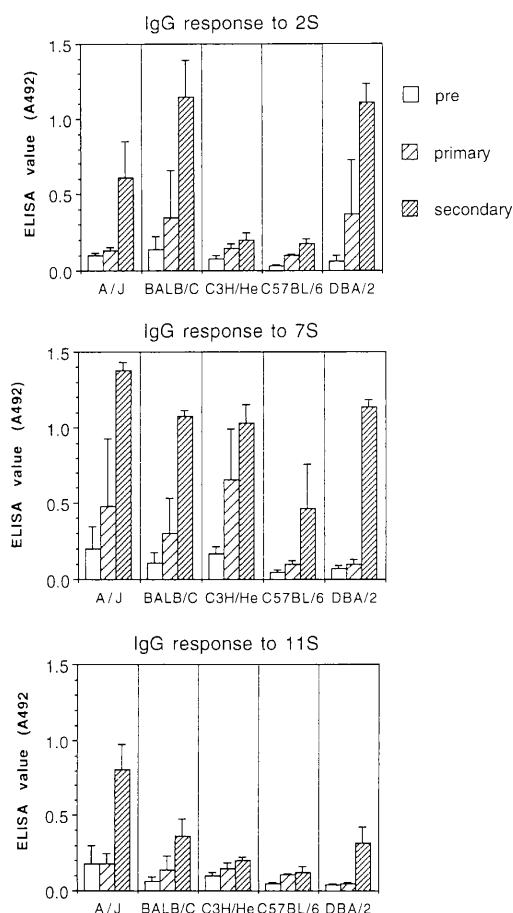


Fig. 4. Changes in serum IgG antibody to soybean protein of 5 inbred mice by i. p. injection of soybean protein. The mice fed the defatted soybean-based diet twice received i. p. injection of crude soybean protein with Freund's adjuvant. The data of blood samples collected before injection (pre: □) and after the first (primary: ▨) and second (secondary: ▩) i. p. injection are shown. The serum antibodies specific for soybean 2S, 7S and 11S fractions were analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration is shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Values are means \pm SD for 4 mice per group.

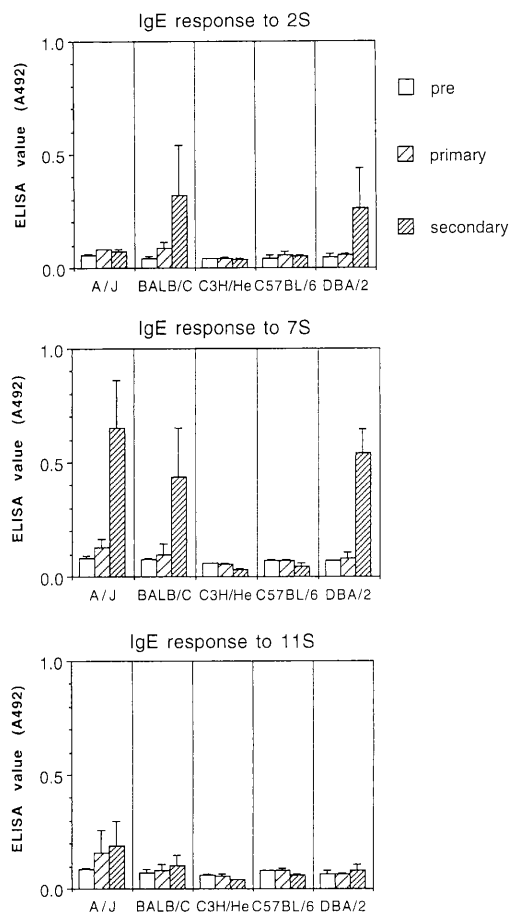


Fig. 5. Changes in serum IgE antibody to soybean protein of 5 inbred mice by i. p. injection of soybean protein. The mice fed the defatted soybean-based diet twice received i. p. injection of crude soybean protein with Freund's adjuvant. The data of blood samples collected before injection (pre: □) and after the first (primary: ▨) and second (secondary: ▩) i. p. injection are shown. The serum antibodies specific for soybean 2S, 7S and 11S fractions were analyzed by ELISA. Apparent antibody concentration is shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Values are means \pm SD for 4 mice per group.

な経口免疫寛容の誘導の有無を調べるために、粗大豆たん白質をアジュバントとともに2回腹腔内に投与し、2S, 7S, 11S 画分に対する特異抗体応答を調べた。

1回目の腹腔内投与により、7S 画分に対しては3系統で、2S 画分に対しては2系統でIgG 応答が見られたが、11S 画分に対しては全ての系統で無応答であった (Fig. 4)。また、IgE 応答に関しては、全ての系統でいずれのたん白質画分に対しても応答は見られなかった。2回目の腹腔内投与により、7S グロブリンに対しては全ての系統でIgG 応答が誘導されたが、2S, 11S グロブリンに対してはC3H/He とC57BL/6では全く応答が見られず、強い免疫寛容現象が観察された。また、IgE 応答に関しては、11S グロブリンに対する応答が全系統のマウスでほとんど誘

導されず、さらにC3H/He とC57BL/6では2S, 7S, 11S いずれに対してもIgE 抗体は産生されなかった (Fig. 5)。

このように、一部のマウスにおいて、アジュバントとともに大豆たん白質を腹腔内に投与しても抗体応答が全く誘導されないことが明らかとなった。これらのマウスではあらかじめ大豆たん白質を経口摂取したことにより免疫寛容が成立したと考えられるが、この経口免疫寛容の成立はマウスの系統と大豆たん白質の種類に強く依存していた。マウスにおいて、大豆たん白質の中では11S 画分のたん白質が最も経口寛容を誘導し易く、C57BL/6系統のマウスは大豆たん白質に対して強く経口免疫寛容を誘導することが明らかとなった。

要 約

SPI の経口免疫原性が低い原因を探るために、大豆たん白質の主要成分について経口免疫寛容原性を中心に比較検討した。変性たん白質は一般に経口免疫原性が低いため、未変性たん白質を多く含むと考えられる脱脂大豆粉をSPI の代わりに用いて、5系統の近交系マウスに飼料とともに経口摂取させ、血清抗体応答を調べた。A/J 系統の一部の個体にIgG 抗体の増加が見られたが、他の系統では顕著な抗体価の上昇は観察されなかった。また、IgE 抗体に関しては、A/J において1回目の摂取後に弱い応答が見られた。次に、経口免疫寛容の誘導の有無を調べるために、大豆たん白質を経口摂取させたマウスに同一抗原をFreund のアジュバントとともに腹腔内投与し、抗原特異的な抗体応答の抑制を調べた。2回の腹腔内投与により、7S グロブリンに対しては全ての系統でIgG 応答が誘導されたが、2S, 11S グロブリンに対してはC3H/He とC57BL/6では全く応答が見られず、強い免疫寛容現象が観察された。またIgE 応答に関しては、11S グロブリンに対する応答が全系統のマウスでほとんど誘導されず、さらにC3H/He とC57BL/6では2S, 7S, 11S いずれに対してもIgE 抗体は産生されなかった。

文 献

- 1) 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.
- 2) 松田 幹, 青木 直人, 安達 貴弘, 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 (第2報). 大豆たん白質研究会会誌, **16**, 87-93.
- 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) Linear IR (1962): Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am J Clin Nutr*, **11**, 281-298.