

大豆たん白質の経口摂取が食餌性たん白質抗原に対する 免疫応答に及ぼす影響

二宮憲子・山口研志・松田 幹*

名古屋大学農学部

Effect of Soybean Protein Co-feeding on Immune Response to Fed Protein Antigens

Noriko NINOMIYA, Kenji YAMAGUCHI and Tsukasa MATSUDA

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

ABSTRACT

Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) is one of the causative allergens of soybean food allergy, and it would reduce digestibility of food proteins and might affect the adsorption of undigested food protein antigens through intestinal epithelium. KSTI (20 mg) was intra-gastrically administered to mice and, then, the mice was killed and the small intestinal content was recovered. Intact KSTI was detected in the intestinal content by immunoblot analysis using anti-KSTI antibody, and trypsin activity of the intestinal content was inhibited almost completely. To examine the effect of trypsin inhibition on antibody response to fed protein antigens, egg lysozyme as a model antigen was intra-gastrically administered to B10. A mice with and without KSTI, and the serum IgG and IgE responses to administered lysozyme (LY) were measured by ELISA. The antibody responses of mice given LY with KSTI were not higher than those of mice without KSTI, suggesting that co-administration of KSTI does not enhance the antibody responses to intra-gastrically administered protein antigens. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 68-73, 1997.

Key words: Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI), food allergen, oral antigen, lysozyme

これまでの食品たん白質の経口免疫原性に関する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ことが明らかとなった^{1,2)}。また, 大豆たん白質を含む市販非精製飼料で飼育されたマウスの血清中には, 大豆 2S グロブリン画分のトリプシンインヒビター (KSTI) に対す

る特異抗体が存在することも明らかとなった³⁾。ヒトにおいても, 大豆アレルギー患者について, KSTI がアレルゲンとなる症例が報告されており³⁾, 未分解のトリプシンインヒビターが消化管内に残存し, 一部が体内に取り込まれ, 免疫応答を誘導するものと考えられる。一方, トリプシンインヒビターはレクチンとともに大豆たん白質中の抗栄養因子として知られ, 食物たん白質の消化率の低下や, 小腸上皮に対する傷害を引き起こすと考えられている。食物たん白質の消化性

*〒464-01 名古屋市千種区不老町

や腸管上皮の傷害は、未分解のたん白質抗原の生体内への取り込みに影響し、食品アレルギーの発症に関与する可能性がある。今年度は、食品アレルギーの原因となる他の食品たん白質抗原とトリプシンインヒビターを同時に摂取した場合に、それらの抗原に対する血清抗体応答にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的として、卵白アレルギーの一つであるリゾチーム (LY) と大豆トリプシンインヒビター (KSTI) を同時に胃内投与した時の LY に対する血清 IgG, IgE 応答への KSTI の影響について検討した。

実験方法

たん白質の胃内投与と小腸内容物の調製

経口投与に用いたオボアルブミン (OVA) は卵白より硫酸分画および結晶化により精製した。オボムコイド (OM) とリゾチーム (LY) は、それぞれ和光純薬および生化学工業より、また大豆トリプシンインヒビター (KSTI) は、SIGMA より購入した。

B10. A マウス (6~8 週齢, 雌) を用いて、24 時間絶食させた後、OVA, OM, KSTI を生理食塩水に溶解 (100 mg/mL) してマウス一匹あたり 20 mg をゾン

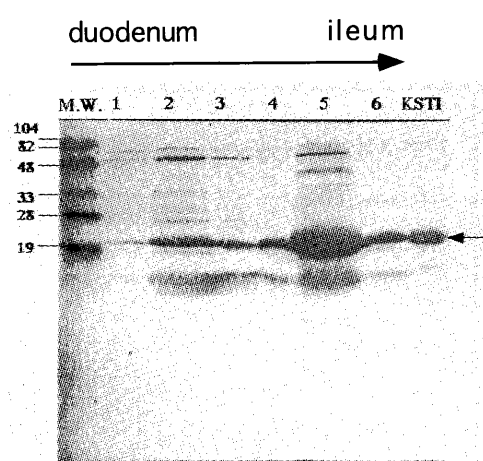
デで胃内投与した。また、2 種のたん白質を同時に投与する実験ではそれぞれ 10 mg ずつを混合して同様に胃内投与した。30 分後に屠殺し、小腸を摘出して 6 等分した。小腸管腔内容物を小腸断片あたり 1 mL の PBS で洗浄・回収した。回収された溶液を 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、その上清を小腸内容物溶液として以下のたん白質抗原分析および酵素活性測定に用いた。

電気泳動と免疫ブロット分析

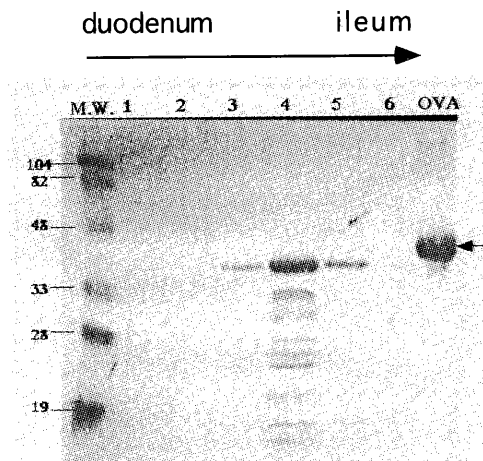
小腸内容物溶液 20 mL を用いて、小腸内に残存するたん白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動⁴⁾で分析した。さらに、分離したたん白質をゲルからニトロセルロース膜に転写し、各たん白質抗原に対するウサギ抗血清とパーオキシダーゼで標識した抗-ウサギ IgG 抗体を用いて免疫染色し⁵⁾、小腸内に残存する経口投与たん白質抗原およびその抗原ペプチドを検出した。

トリプシンおよびキモトリプシン活性の測定

マウス小腸内容物のトリプシンおよびキモトリプシン活性は、それぞれの酵素に対する合成基質 BAPA (α -N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide) および BTPA (α -N-benzoyl-L-tyrosine-p-nitroanilide)



anti-KSTI



anti-OVA

Fig. 1. SDS-PAGE/immunoblot analysis of soybean trypsin inhibitor (KSTI) and egg albumin (OVA) administered intra-gastrically to mice. Twenty milligrams of KSTI or OVA were administered intra-gastrically to mice, and 30 min later the mice were killed and the small intestine was cut into 6 sections. The intestinal contents were recovered from each section and analyzed by SDS-PAGE/immunoblot analysis using rabbit anti-KSTI and anti-OVA antibodies. The arrows indicate the migration positions of intact KSTI and OVA.

を用いて前報⁶⁾に従って測定した。小腸内容物溶液20 mL について、50 mM CaCl₂ を含む 5 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した合成基質と混合し、酵素反応をキュベット中で行った。酵素反応生成物の吸光度を420 nm で連続的に記録し、酵素活性は単位時間当たりの吸光度変化 ($\Delta 420$ nm) で表した。

たん白質の胃内投与による血清抗体応答の誘導

経口投与 LY に対する血清抗体応答が誘導される B10. A マウスを用いて、マウス一匹あたり生理食塩水 200 mL に溶解した LY (5~40 mg) を、1日1回、ゾンデで胃内投与した。胃内投与を6日間行い、その7日後に静脈より採血し、遠心分離により血清を分離し、血清抗体測定用の標品とした。

血清抗体の測定

胃内投与したたん白質抗原 (LY, OVA, OM, KSTI) に対する血清中の特異抗体の検出には、100倍希釈したマウス血清について酵素免疫測定法 (ELISA)⁷⁾を用いて前報に従って測定した^{1,2)}。二次抗体としてパーオキシダーゼ標識した抗マウス IgG1 および抗マウス IgE (ノルディック) を用いた。

結果と考察

小腸内に残存する胃内投与たん白質の検出

KSTI および比較対照として OVA を用いて、胃内

投与30分後に小腸から回収した内容物中に残存するたん白質を各々に対する特異抗体を用いた免疫プロット法により調べた。Fig. 1 に示すように、小腸内の全領域から未分解の KSTI が検出され、特に空腸下部から回腸上部に多量の KSTI が検出された。一方、比較対照に用いた OVA では、小腸内から未分解のたん白質は検出されず、空腸下部から回腸上部に、OVA の部分分解断片が検出された。図には示さないが、各たん白質について別の個体を用いて実験し、同様の結果を得た。これらの結果から、KSTI は OVA よりも消化管内での酵素分解を受けにくいことが明らかとなった。さらに胃内投与後、一定の間では、抗原あるいはトリプシンインヒビターとしての活性が小腸内に残存することが予想された。

小腸内トリプシン、キモトリプシン活性におよぼす KSTI 投与の影響

小腸内に多量の KSTI が検出されたため、小腸に分泌された膵液トリプシンの活性が阻害される可能性が示唆された。そこで、KSTI および比較対照として、卵白トリプシンインヒビターである OM、またトリプシン阻害活性を持たない OVA を用いて、これらのたん白質の胃内投与後の小腸内トリプシン活性を測定した。Fig. 2 に示すように、OVA 投与マウスでは空腸から回腸にかけてトリプシン活性が検出されたが、これとは対照的に KSTI 投与マウスでは小腸の全領域に

Trypsin activity

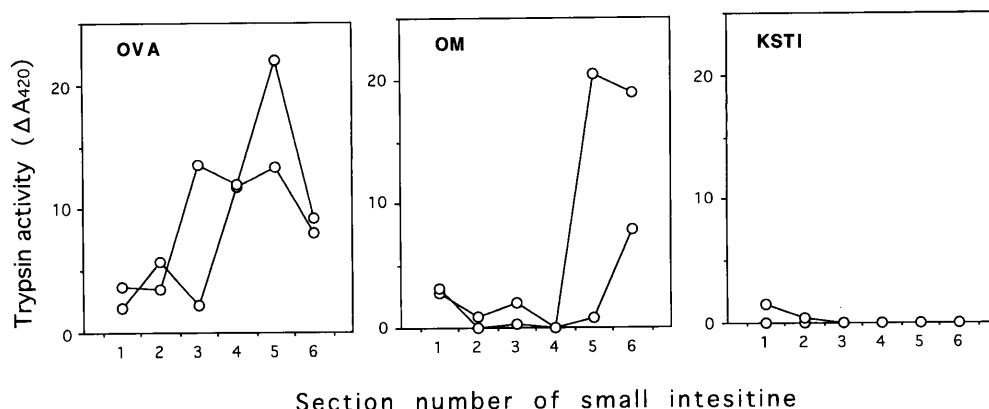


Fig. 2. Effect of intra-gastrically administered KSTI on intestinal trypsin activity.

Twenty milligrams of KSTI, egg white trypsin inhibitor (OM) or OVA were administered intra-gastrically to mice, and 30 min later the mice were killed and the small intestine was cut into 6 sections. The intestinal contents were recovered from each section and used for trypsin activity measurement with BAPA as substrate.

においてトリプシン活性はほとんど検出されなかった。一方、OM 投与マウスでは空腸部までは極く僅かの活性しか検出されなかったが、回腸部では OVA 投与マウスのそれに対応するほどのトリプシン活性が検出された。これらの結果から、KSTI, OM いずれもマウストリプシンを阻害し、本実験条件下では、胃内投与されたこれらのトリプシンインヒビターの一部は小腸内でも活性を保持した状態で存在することが明らかとなった。また、卵白トリプシンインヒビター OM よりも大豆トリプシンインヒビター KSTI のほうが消化管内で安定であり、トリプシン阻害活性を長時間保持することが推定された。OM のような Kazal 型トリプシンインヒビターは過剰量のトリプシンにより徐々に分解され、一度阻害された酵素作用が時間の経過とともに再び現れることが知られている⁸⁾。一方、KSTI に代表される Kunitz 型トリプシンインヒビターは、一旦酵素・インヒビター複合体が形成されると安定で、いわゆる永久阻害することが知られている。本研究での成果は、これらの2種類のトリプシンインヒビターの阻害効果が動物消化管内でもあてはまることを示唆している。OM は小腸内で徐々に分解を受け阻害活性を失うため、回腸部でトリプシン活性が検出され、一方、KSTI による阻害は安定であり、小腸内で長時間阻害

効果が維持されるためトリプシン活性はほとんど検出されなかったものと考えられる。

胃内投与 LY に対する血清抗体応答とトリプシンインヒビター同時投与の影響

KSTI あるいは OM の投与により小腸内トリプシン活性が阻害されることが明らかになったため、次に、これらのトリプシンインヒビターを LY と同時に胃内投与した時の LY に対する血清抗体応答に対する影響を調べた。まず胃内投与による血清抗体応答の誘導に対する LY の投与量の影響を調べた。Fig. 3 に示すように、いずれの投与量でも LY に対する抗体価の上昇は見られたが、10 mg あるいは20 mg の投与で安定した抗体価の上昇が誘導されることが明らかとなった。

この結果を基に、LY 投与量を一回10 mg とし、KSTI, OM, あるいは OVA 10 mg と混合して、同様に B10. A マウスの胃内に投与した。LY に対する IgG1 および IgE 抗体の応答を調べた結果、Fig. 4 に示すように、IgG1 に関しては、対照として用いた OVA との同時投与群、あるいは OM との同時投与群での抗体価と同程度か、あるいはわずかに低い傾向を示した。さらに IgE 抗体応答においても、KSTI との同時投与群では、OM との同時投与群と同様に、OVA との同時投与群よりも低い傾向を示した。これらの結

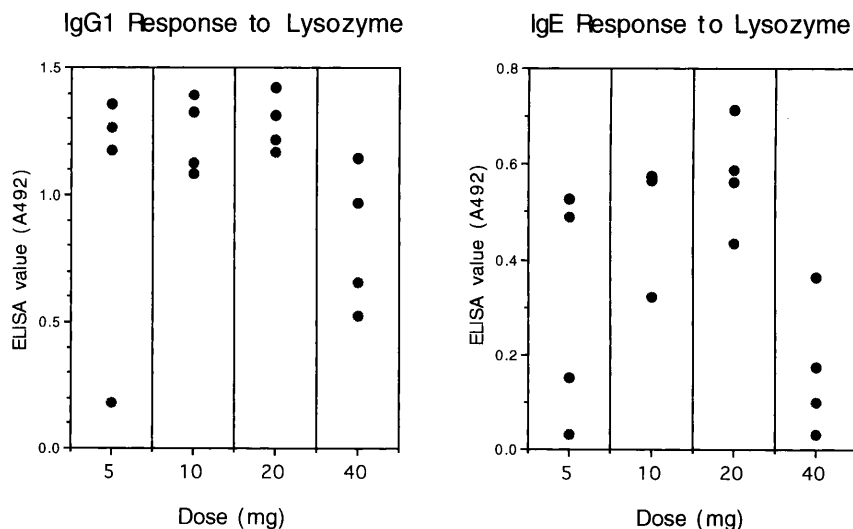


Fig. 3. IgG1 and IgE responses of mice to LY administered intra-gastrically. Several doses (5 to 40 mg/mouse/day) of egg lysozyme (LY) were administered to mice intra-gastrically for 6 days, and 7 days after the last administration blood was collected separately from each mouse. The serum IgG1 and IgE antibodies specific for LY were analyzed by ELISA using peroxidase-labeled antibodies specific for each immunoglobulin isotype. Apparent antibody concentration was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each point represents the value for each mouse.

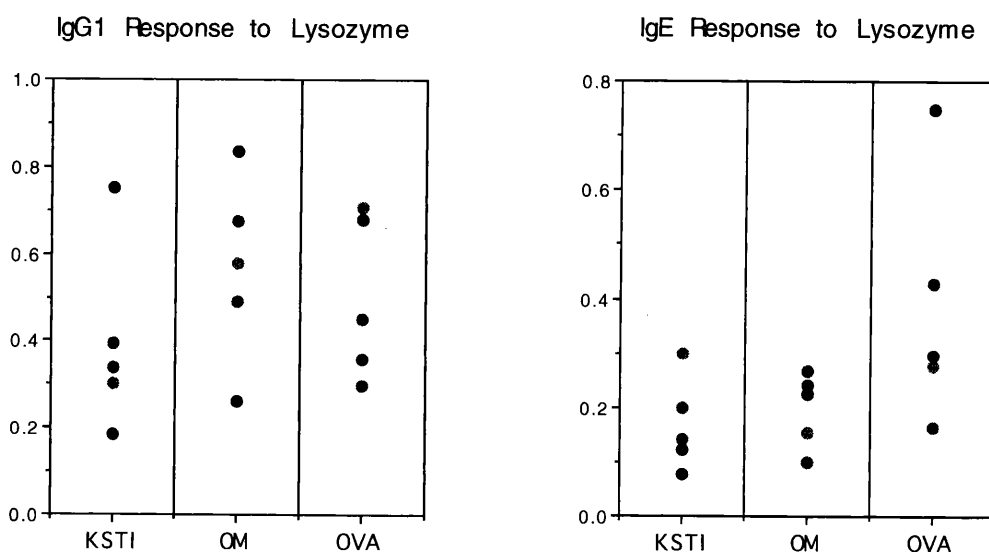


Fig. 4. Effect of the KSTI co-administration on IgG1 and IgE responses of mice to LY administered intra-gastrically. LY (10 mg) mixed with 10 mg of KSTI, OM or OVA was administered to mice intra-gastrically for 6 days, and 7 days after the last administration blood was collected separately from each mouse. The serum IgG1 and IgE antibodies specific for LY were analyzed by ELISA using peroxidase-labeled antibodies specific for each immunoglobulin isotype. Apparent antibody concentration was shown as ELISA value (absorbance at 492 nm). Each point represents the value for each mouse.

果は、インヒビターによるトリプシンの阻害によって小腸内のLY抗原の分解性が低下し、小腸経由での抗原刺激が増強されるという仮説に反するものであり、食品中のトリプシンインヒビターは、必ずしも同時に摂取するたん白質抗原の経口免疫原性を増強しないことを示唆している。抗体価の上昇ではなく、むしろ低

下傾向を示した理由は明らかではないが、40 mg のLY投与群ではIgE抗体応答がむしろ低下しており (Fig. 3), トリプシンインヒビターの同時投与によりLYの小腸内での分解性が低下し、見かけ上多量のLYを投与した時と同様な状態となり、抗体応答が低下したとも考えられる。

要 約

大豆トリプシンインヒビター (KSTI) は大豆アレルゲンの一つであるが、その阻害活性により、同時に摂取されたたん白質の消化率を低下させ、未分解たん白質抗原の生体内への取り込みに関与する可能性がある。KSTI (20 mg) をマウス胃内に投与し、30分後に小腸内容物を採取した。免疫プロットにより解析した結果、小腸各部位から未分解の KSTI 抗原が検出された。また、小腸内容物中のトリプシン活性も完全に阻害されていた。次に、経口投与リゾチームに対して IgE 抗体応答を示す B10. A マウスを用いて、KSTI (10 mg) の同時胃内投与がリゾチームに対する抗体応答におよぼす影響を調べた。リゾチームに対する IgG1 および IgE 抗体応答いずれについても、KSTI 同時投与による増強効果は見られず、むしろ抑制傾向を示した。これらの結果から、この投与条件 (10 mg リゾチーム/マウス) では、同時に投与された KSTI による小腸内トリプシン活性の低下はリゾチームの経口免疫原性を増強しないと考えられた。

文

- 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(1995) : 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) Moroz LA and Yang WH (1980) : Kunitz soybean trypsin inhibitor—A specific allergen in food anaphylaxis. *N Engl J Med*, **302**, 1126-1128.
- 4) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 5) Aoki N, Kuroda H, Urabe M, Taniguchi Y,

献

- Adachi T, Nakamura R and Matsuda T (1994) : Production and characterization of monoclonal antibodies directed against bovine milk fat globule membrane (MFGM). *Biochim Biophys Acta*, **1199**, 87-95.
- 6) Matsuda T, Watanabe K and Nakamura R (1982) : Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochim Biophys Acta*, **707**, 121-128.
- 7) Engval E and Perlmann P (1971) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)—Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- 8) 加藤郁之進(1979) : 動物のタンパク質分解酵素インヒビター. 蛋白質・核酸・酵素, **24**, 667-679.