

マウスリンパ球を用いた抗体産生調節因子機能検定系の 開発とその利用

山田耕路^{*1}・高杉美佳子²・田村由希¹・宮崎義之¹・菅野道廣³・立花宏文¹

¹九州大学大学院生物資源環境科学研究科 ²山口県立大学生生活科学部

³熊本県立大学環境共生学部

Development of Assay System for Immunoglobulin Production Regulating Factors Using Mouse Lymphocytes and Its Application

Koji YAMADA¹, Mikako TAKASUGI², Yuki TAMURA¹, Yoshiyuki MIYAZAKI¹,
Michihiro SUGANO³ and Hirofumi TACHIBANA¹

¹ Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Graduate School
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

² Faculty of Human Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Yamaguchi 753-8502

³ Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, Kumamoto 862-8502

ABSTRACT

To clarify the regulatory mechanism of immunoglobulin (Ig) production by food components, we tried to establish the assay system using mouse spleen lymphocytes. At first, we examined the effect of adhesive cells on Ig production by mouse splenocytes and found that adhesive cells markedly enhance Ig production of the lymphocytes. When the spleen lymphocytes were isolated after various adhesive periods to remove adhesive cells, decrease of Ig level was observed with the elongation of adhesive periods and the decreasing rates were varied with Ig classes. The stimulatory effect of adhesive cells was observed most markedly in IgA production within 1 day cultivation, but the effect was observed after 2 to 5 days latent period in IgG and IgM production. When the cells were cultured with anti-cytokine antibodies, IgG production was enhanced in the presence of anti-IL-2 and anti-IL-4 antibodies. These results suggest that cytokines are involved in the class specific enhancement of Ig production by adhesive cells. In addition, Ig production of the lymphocytes was strongly enhanced by the addition of lipopolysaccharide, pokeweed mitogen and phytohemagglutinin, but suppressed by concanavalin A. When the lymphocytes were cultured with 60% ethanol extract of soybean protein and its diluted samples, stimulation of Ig production was observed in the presence of 10 times diluted sample and 10⁶ times diluted samples, especially in the absence of adhesive cells. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 65-69, 1999.

Key words : mouse splenocytes, immunoglobulin production, lectin, cytokine, soybean protein extract

* 〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

食物および環境アレルギーの発症には I 型アレルギーが重要な役割を演じる。I 型アレルギーは、肥満細胞などの表面の高親和性 IgE 受容体に結合したアレルギー特異的 IgE が新たに侵入したアレルギーにより架橋され、ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出されることにより発症する¹⁾。一方、アレルギー特異的 IgA はアレルギーの腸管吸収障害を通じて、IgG は IgE との競合を通じて I 型アレルギー反応を障害する。これら抗体の生産はサイトカインによりクラス特異的な調節を受けるが、近年、ある種の食品成分も同様な効果を有することが明らかにされつつある²⁾。すなわち、胆汁酸、過酸化水素、不飽和脂肪酸などはラットリンパ球の IgE 産生を特異的に促進し、その他の抗体の産生を抑制することにより I 型アレルギー応答を促進する可能性が報告されている³⁾。また、ある種の食物繊維の摂食により、ラットの血清 IgG レベルが上昇するとともに、腸間膜リンパ節リンパ球の IgA および IgG 産生能が増強されるが、それにともない、リンパ球の IFN- γ 産生が活性化されることが報告されている⁴⁾。

これら食品成分の抗体産生調節機能はラットを用いた摂食実験および実験動物由来のリンパ球を用いて検定された。しかし、ラットではサイトカイン、抗サイトカイン抗体、各種リンパ球表面抗原に対する標識抗体などの免疫関連試薬の整備が不十分であるため、作用機構の解析が困難である。そこで、ヒトに次いで免疫関連試薬が充実しているマウス実験系を用いて抗体産生調節因子機能検定系の確立を試みた。

方 法

実験材料および試薬

レクチンは lipopolysaccharides (LPS) を Difco 社より、phytohemagglutinin (PHA) を Vector 社より、pokeweed mitogen (PWM) および concanavalin A (Con A) を EY 社より購入した。抗 IL-1 α 、抗 IL-1 β 、抗 IL-2、抗 IL-4 および抗 IFN- γ 抗体はいずれも Genzyme 社より購入した。大豆たん白質抽出液は大豆たん白質 1 g 当たり 10 mL の 60% エタノール-PBS を加えて抽出した。

脾臓リンパ球の培養と抗体の定量

脾臓リンパ球は Lim et al. の方法⁵⁾ に従い 8～9 週齢の BALB/c マウスより分離し、ウシ胎児血清を 10% 添加した RPMI 1640 培地を用いて培養した。必要な場合、脾臓細胞を 37℃ で静置培養し、接着細胞を除去して実験に供した。レクチンは pH 7.4 の生理リン酸緩衝液 (PBS) に溶解して細胞培養液に添加した。抗サイトカイン抗体は PBS で 25 倍 (抗 IL-4)、50 倍 (抗 IL-1 α 、抗 IL-1 β 、抗 IL-2) もしくは 1,000 倍 (抗 IFN- γ) に希釈し、これら 50 μ L を培養液 1 mL に添加してリンパ球を培養した。培養上清中の抗体濃度は Lim et al. の方法⁵⁾ に従い酵素抗体法を用いて測定した。実験結果の統計処理には Student の *t* 検定を用いた。

結 果 と 考 察

マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす接着細胞除去時間の影響

マウスリンパ球の抗体産生に及ぼす接着細胞の影響

Table 1. Effect of adhesion period on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes stimulated with lipopolysaccharides

Adhesion period (hr)	Relative Ig content		
	IgA	IgG	IgM
0	100.0 $\pm$ 9.5	100.0 $\pm$ 3.9	100.0 $\pm$ 10.0
0.5	80.8 $\pm$ 6.5*	54.3 $\pm$ 3.4**	30.3 $\pm$ 0.8**
1.0	57.3 $\pm$ 6.4**	16.4 $\pm$ 1.2**	19.3 $\pm$ 0.1**
2.0	22.1 $\pm$ 2.4**	8.6 $\pm$ 4.3**	11.6 $\pm$ 1.0**
4.0	11.3 $\pm$ 2.2**	3.6 $\pm$ 0.3**	5.6 $\pm$ 0.4**
6.0	4.8 $\pm$ 0.5**	0.1 $\pm$ 0.0**	1.4 $\pm$ 0.2**

Data are means $\pm$ SE (n = 4, **P* < 0.05, ***P* < 0.01).

を明らかにするため、接着細胞を除去するための静置培養時間を変えることにより接着細胞除去率を変化させ、抗体産生に及ぼす影響を検討した。Table 1 に示したように、培養上清中の IgA, IgG および IgM レベルは静置培養時間が延長するに伴い急速に低下し、接着細胞がこれらの抗体産生を強く促進していることが明らかとなった。接着細胞の除去による抗体濃度の低下は IgM で最も速やかに起こり、IgA 濃度の低下がもっともゆるやかに進行した。以上の結果は、接着細胞が抗体産生に及ぼす影響は抗体のクラスにより異なることを示唆している。静置培養時間 6 時間では、これらの抗体の濃度が接着細胞を除去していない場合の 5% 以下に低下した。そこで、以後の実験では接着細胞除去時間を 6 時間とした。

マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼすレクチン添加の影響

リンパ球の分化・増殖はレクチンにより特異的な影響を受ける。PHA は T 細胞の増殖を促進し、Con A は Ts 細胞の増殖を促進する。一方、ある種の PWM は B 細胞の増殖を特異的に促進し、LPS は B 細胞および T 細胞をポリクローナルに促進する。このようなリンパ球の分化・増殖の特異的促進は B 細胞の抗体産生能の変化をもたらしうが、これとは別にこれらレクチンが B 細胞に対する直接作用を通じてラットリンパ球の抗体産生をクラス特異的に調節することが報告されている³⁾。そこで、マウス脾臓細胞の抗体産生に及ぼすレクチンの影響について検討した。まず、LPS を用いて濃度依存性について検討した結果、接着細胞存在下では終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最も高い抗体濃度が得られることが明らかとなった（データは示さず）。また、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LPS 存在下でマウスリンパ球を 10 日間培養し、

抗体濃度の経時的变化を追跡した結果、接着細胞の IgA 産生増強効果は培養開始後 1 日目ですでに認められるのに対し、IgM 産生は 3 日目に初めて認められ、5 日目に顕著に認められること、IgG は 7 日間の培養により初めて接着細胞の促進効果が顕著に認められることが明らかとなった（データは示さず）。

つぎに、レクチン濃度を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として種々のレクチン存在下で 7 日間培養して、レクチンの抗体産生調節機能を検討した（Table 2）。接着細胞を除去した場合、LPS の共存下では IgA 濃度が 25 倍に、IgG 濃度が 460 倍に、IgM 濃度が 340 倍に上昇した。PWM 共存下でも LPS よりやや弱いのが、同様な比率で抗体濃度の上昇が起こった。PHA 存在下では、IgA 濃度の上昇が比較的顕著となり、IgG および IgM 濃度の上昇は LPS や PWM で刺激した場合程顕著ではなかった。一方、Con A 存在下では IgA 産生が完全に抑制され、IgG 産生も強く抑制されたが、IgM 産生はほとんど影響を受けなかった。

接着細胞共存下では、IgA 濃度が 5.5 倍に、IgG 濃度が 2.0 倍に、IgM 濃度が 5.0 倍に上昇した。LPS 存在下では、IgA 濃度が 40 倍に、IgG 濃度が 1,800 倍に、IgM 濃度が 890 倍に上昇したが、これらの抗体濃度の上昇倍率は LPS および接着細胞の促進倍率を単に掛け合わせたものではなく、抗体のクラスによって効果が異なった。同様な現象は PWM あるいは PHA で刺激した場合にも認められた。Con A 存在下では、非存在下と比較するといずれの抗体濃度も低値を与えたが、接着細胞を除去した場合より高い抗体濃度を与え、接着細胞非存在下で認められた IgA 産生の抑制が非可逆的なものではないことが明らかとなった。

マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす抗サイトカイ

Table 2. Effect of mitogens on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes with or without adhesive cells

	Adhesive cell	Relative Ig content				
		None	LPS	PWM	PHA	Con A
IgA	—	1.0 $\pm$ 0.5	25 $\pm$ 4**	16 $\pm$ 7**	39 $\pm$ 3**	0**
IgG	—	1.0 $\pm$ 0.2	460 $\pm$ 20**	190 $\pm$ 36**	50 $\pm$ 6**	0.2 $\pm$ 0.0**
IgM	—	1.0 $\pm$ 0.1	340 $\pm$ 2**	97 $\pm$ 3**	25 $\pm$ 2**	1.2 $\pm$ 0.0**
IgA	+	5.5 $\pm$ 0.3	40 $\pm$ 16**	43 $\pm$ 3**	50 $\pm$ 13**	2.8 $\pm$ 0.5**
IgG	+	2.0 $\pm$ 0.0	1800 $\pm$ 130**	650 $\pm$ 13**	58 $\pm$ 1**	0.8 $\pm$ 0.0**
IgM	+	5.0 $\pm$ 0.6	890 $\pm$ 31**	560 $\pm$ 16**	58 $\pm$ 1**	2.0 $\pm$ 0.1**

Data are means $\pm$ SE (n = 4, **P < 0.01).

Table 3. Effect of anti-cytokine antibodies on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes with or without adhesive cells

Anti-cytokine antibody	IgG (ng/mL)	
	Adhesive cell (−)	Adhesive cell (+)
None	8.4 ± 0.3	17.9 ± 0.3
Anti-IL-1 α	9.5 ± 0.3**	18.5 ± 0.7
Anti-IL-1 β	10.0 ± 0.1**	20.1 ± 0.6**
Anti-IL-2	17.8 ± 1.0**	27.0 ± 0.4**
Anti-IL-4	22.4 ± 0.1**	29.2 ± 0.3**
Anti-IFN- γ	8.0 ± 0.3	15.6 ± 0.4**

Data are means ± SE (n = 4, **P < 0.01).

Table 4. Effect of soy protein extract on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes with or without adhesive cells

Relative concentration	Adhesive cell (−)			Adhesive cell (+)		
	IgA (ng/mL)	IgG (ng/mL)	IgM (μ g/mL)	IgA (ng/mL)	IgG (ng/mL)	IgM (μ g/mL)
0	18.5 ± 2.2	3.1 ± 1.2	0.87 ± 0.09	44.1 ± 6.5	1.3 ± 1.3	1.58 ± 0.03
10 ⁻⁹	15.0 ± 1.8	3.5 ± 0.8	0.77 ± 0.04	43.6 ± 3.1	0.8 ± 0.6	1.41 ± 0.07
10 ⁻⁸	18.5 ± 1.3	4.5 ± 1.3	0.87 ± 0.05	43.5 ± 3.5	1.3 ± 0.4	1.47 ± 0.13
10 ⁻⁷	14.4 ± 1.4	3.1 ± 1.1	0.70 ± 0.03	46.5 ± 2.3	1.3 ± 0.9	1.50 ± 0.05
10 ⁻⁶	24.5 ± 0.2*	8.8 ± 2.1**	1.38 ± 0.09**	48.3 ± 2.8	2.0 ± 0.9	2.05 ± 0.19**
10 ⁻⁵	16.4 ± 0.7	3.5 ± 1.1	0.81 ± 0.04	44.8 ± 2.8	1.0 ± 0.7	1.55 ± 0.06
10 ⁻⁴	16.3 ± 1.6	3.3 ± 0.7	0.81 ± 0.01	44.2 ± 5.9	1.4 ± 1.0	1.71 ± 0.19
10 ⁻³	17.5 ± 0.7	3.4 ± 0.4	0.80 ± 0.06	41.5 ± 4.1	1.2 ± 0.5	1.54 ± 0.04
10 ⁻²	18.5 ± 1.5	4.1 ± 1.1	0.84 ± 0.03	47.4 ± 5.6	0.8 ± 0.7	1.75 ± 0.06
10 ⁻¹	16.6 ± 2.8	7.5 ± 0.6*	1.06 ± 0.02*	49.4 ± 2.4	1.3 ± 1.0	1.90 ± 0.04
10 ⁰	18.8 ± 0.4	3.0 ± 1.1	0.76 ± 0.03	43.7 ± 2.5	0.2 ± 0.2	1.33 ± 0.11

Data are means ± SE (n = 4, *P < 0.05, **P < 0.01).

ン抗体添加の影響

抗体産生のクラス特異的調節は IFN- γ , IL-2, IL-4 などのサイトカインにより行われることが知られている。そこで、マウス脾臓細胞の抗体産生に及ぼすサイトカインの効果を抗サイトカイン抗体存在下で培養することにより検定した。Table 3 に示したように、接着細胞非存在下で、抗 IL-2 および抗 IL-4 抗体の添加により IgG 濃度の顕著な上昇が観察された。接着細胞存在下では、無添加区で IgG 濃度がほぼ 2 倍に上昇し、抗 IL-2 および抗 IL-4 抗体添加区では無添加区より有意に高い IgG 濃度が得られたが、抗サイトカイン抗体

の IgG 産生促進活性は接着細胞非存在下で見られた程度顕著なものではなかった。これらの結果は、マウス脾臓細胞の IgG 産生が IL-2 および IL-4 により抑制されており、抗 IL-2 あるいは抗 IL-4 抗体の添加によりこの抑制が解除されることを示唆している。

マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす大豆たん白質抽出物添加の影響

つぎに、本実験系を用いて大豆成分の抗体産生調節機能について検討を行った。イソフラボンなどの大豆成分を抽出することを目的として大豆たん白質標品の 60% エタノール抽出を行い、得られた抽出液を 60% エ

タノール-PBSで希釈し、培地の200分の1量をマウス脾臓細胞に添加して3日間培養後、培養上清中の抗体濃度を測定した(Table 4)。接着細胞非存在下では、IgA濃度の有意な上昇が 10^6 倍希釈液添加区で認められた。また、IgG濃度の上昇が10倍希釈液と 10^6 倍希釈液添加区で認められ、IgM濃度についても同様の傾向が認められた。接着細胞存在下でも大豆たん白質抽出液は同様な効果を示したが、非存在下と比較すると抗体濃度の上昇は若干低い傾向が認められた。

以上の結果は、マウス脾臓リンパ球培養系がレクチン、抗サイトカイン抗体、食品成分などの抗体産生調節機能検定系として利用可能であることを示しており、免疫関連試薬が充実したマウス実験系の確立によりこれら因子の抗体産生調節機構の解明が促進されることが期待される。大豆たん白質抽出液が2つの濃度領域で抗体濃度の上昇を誘導したことは、本抽出液中に複数の抗体産生促進因子が存在することを示唆しており、その分離精製および同定が今後の課題である。

要 約

食品成分の抗体産生調節機構を解明するため、マウス脾臓リンパ球を用いた機能検定系の確立を試みた。まず、マウス脾臓細胞の抗体産生に及ぼす接着細胞の影響について検討し、接着細胞がリンパ球の抗体産生を顕著に促進することを見いだした。接着細胞を除去するため脾臓リンパ球を種類の接着期間の後分離した場合、抗体濃度は接着時間の延長に伴い低下し、その低下速度は抗体クラスにより異なった。接着細胞の促進効果はIgA産生で最も強くかつ培養初期から認められたが、IgGおよびIgM産生においては数日の潜伏期間の後促進効果が発現した。また、脾臓細胞を抗サイトカイン抗体とともに培養した場合、IgG産生が抗IL-2および抗IL-4抗体存在下で促進された。これらの結果は、接着細胞のクラス特異的な抗体産生促進効果の発現にサイトカインが関与することを示唆している。また、マウス脾臓リンパ球の抗体産生はlipopolysaccharides, pokeweed mitogen, phytohemagglutininにより強く促進され、concanavalin Aにより阻害されたが、接着細胞の存在により一部の抗体産生がさらに増強された。脾臓リンパ球を大豆たん白質の60%エタノール抽出液およびその希釈液とともに培養した結果、その10倍希釈液および 10^6 倍希釈液において抗体産生促進効果が発現することが明らかとなった。

文 献

- 1) Metcalfe DD (1991): Food allergy. *Curr Opin Immunol*, **3**, 881-886.
- 2) Yamada K, Tachibana H, Matsuo N, Nishiyama K and Sugano M (1999): Structure-activity relationship of immunoregulatory factors in foodstuffs. *Food Sci Technol Res*, **5**, 1-8.
- 3) Lim BO, Yamada K and Sugano M (1994): Effects of bile acids and lectins on immunoglobulin production in rat mesenteric lymph node lymphocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **30A**, 407-413.
- 4) Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P and Sugano M (1997): Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J Nutr*, **127**, 663-667.
- 5) Lim BO, Yamada K, Yoshimura K, Watanabe T, Hung P, Taniguchi S and Sugano M (1995): Free bile acids inhibit IgE production by mouse spleen lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide and interleukins. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 624-627.