

大豆トリプシンインヒビターがアレルゲンたん白質の *in vivo* 消化性と経口免疫原性に及ぼす影響

二宮憲子・山田千佳子・松田 幹*

名古屋大学大学院生命農学研究科

Effect of Soybean Trypsin Inhibitor on *in vivo* Digestibility and Oral Immunogenicity of Allergenic Proteins

Noriko NINOMIYA, Chikako YAMADA and Tsukasa MATSUDA

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601

ABSTRACT

In the previous report (Ninomiya N et al, *Soy Protein Research, Japan*, **1**, 75-80, 1998), Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI) intragastrically (*i.g.*) administered to mice was shown to remain intact mostly in small intestine and inhibit intestinal trypsin activity, suggesting the lowering of food protein digestibility. In the present study, the inhibitory effect of *i.g.* administered KSTI on three intestinal proteases, trypsin, chymotrypsin, elastase was investigated and compared with that of egg lysozyme, which induced immune response by *i.g.* administration. Almost no trypsin activity was detected in the small intestine of the mice, when KSTI was administered. Furthermore, both of chymotrypsin and elastase activities of the mice administered KSTI were also much lower than those of mice given lysozyme or phosphate buffered saline. These results suggested that KSTI inhibited trypsin and markedly reduced the protease activity in the small intestine, and thereby remained intact in large quantity in the small intestine. Furthermore, the effect of the amount of protein administered *i.g.* on serum antibody response and the protein remaining in the small intestine was also investigated using egg lysozyme as a model antigen. The increase in the amount of protein administered did not increase the amount of intact protein in the small intestine but that of fragments which retained antigenic activity. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 70-75, 1999.

Key words : soybean trypsin inhibitor (KSTI), food allergy, digestibility

これまでの研究により、マウスにおいて、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、消化管経路での刺激による血清抗体応答を誘導しにくいことが明らかとなった^{1,2)}。一方、大豆トリプシンインヒビター (KSTI) は、症例は少ないものの、重篤なアナフィラキシー性の即時型アレルギーを

*〒464-8601 名古屋市中千種区不老町

引き起こすことが知られている³⁾。昨年度の研究により、KSTIを胃内に投与すると、小腸内に未分解の状態で見出され、小腸内トリプシン活性が顕著に阻害されることを明らかにした⁴⁾。今年度は、小腸内でのトリプシン活性の阻害が他のプロテアーゼの活性に及ぼす影響を調べ、KSTIが他のたん白質に比べて多量に小腸内の残存する機構について検討した。さらに多量に消化管内に残存するにもかかわらず、抗体応答を誘導しない原因についても検討した。

方 法

実験材料

大豆トリプシンインヒビター (KSTI) は SIGMA より、卵白リゾチームは生化学工業より、B10.A マウスは日本 SLC より購入した。プロテアーゼ活性測定用の合成基質として用いた α -N-benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPA) および α -N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine *p*-nitroanilide (SAAAPA) はペプチド研究所より、 α -N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BTPA) は SIGMA より購入した。

KSTI の経口投与と小腸内容物の調製

B10.A マウス (6～8 週齢、雌) を用いて、24 時間絶食させた後、KSTI、あるいは卵白リゾチームをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解して (100 mg/mL) 一群 3 匹としてマウス一匹あたり 20 mg をゾンデで胃内投与した。30 分後に屠殺し、胃、小腸を摘出した後、小腸は全体を 6 等分し、十二指腸から順に小腸断片 1～6 とした。胃および小腸管腔内容物をそれぞれの組織あたり 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プロテアーゼ活性の測定に用いた。対照として PBS を胃内投与したマウスを同様に処理して、プロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ活性の測定

トリプシン活性測定には、BAPA を 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 20 mM CaCl₂ に溶解し、2 mg / mL 溶液を基質溶液として用いた。キモトリプシン活性測定には、少量の dimethylsulfoxide に溶解した BTPA を 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 / 20 mM CaCl₂ / 0.05% Triton X-100 で希釈し、2 mg / mL 溶液として測定に用いた。また、エラスターゼ活性測定には SAAAPA を 100 mM triethanolamine-HCl, pH 7.8 / 0.05% Triton X-100 に 2 mg / mL 濃度で溶解して測定に用いた。

96 穴プレートに各酵素活性測定用の緩衝液を 150 μ L 加え、37℃ で 5 分間加温し、そこに各基質溶液 (2 mg

/ mL) および小腸内容物上清をそれぞれ 25 μ L ずつ添加し、混合した後、37℃ で保温しながら 1 分ごとの 405 nm での吸光度を 10 分間測定した。吸光度の経時的測定にはマイクロプレート用分光光度計 SOFTmax PRO を用いて自動記録した。単位時間あたりの吸光度の増加を酵素活性として表示した。

たん白質の胃内投与による血清抗体応答の誘導と血清抗体の測定

B10.A マウスを用いて、マウス一匹あたり PBS 200 μ L に溶解した卵白リゾチーム (5 mg, 10 mg および 20 mg) を、一日一回、ゾンデで胃内投与した。胃内投与を 7 日間行い、最終投与の 7 日後に静脈より採血し、遠心分離により個体ごとに血清を分離し、血清抗体測定用の票品とした。胃内投与したリゾチーム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)⁵⁾ 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 IgG および抗マウス IgE (ノルディック) を用いた。

胃内投与リゾチームの小腸内容物中からの検出

上述した KSTI と同様に、5 mg および 10 mg のリゾチームを胃内に投与し、小腸から回収した内容物の遠心分離上清 20 μ L を用いて、小腸内に残存するリゾチームを SDS-PAGE⁶⁾ 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、リゾチーム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⁷⁾、小腸内に残存するリゾチームおよびその抗原性ペプチドを検出した。

結果と考察

KSTI の胃内投与による小腸内プロテアーゼ活性の低下

B10.A マウスの胃内にリゾチーム、KSTI および PBS を投与し、30 分後の小腸内のトリプシン活性を測定した結果を Fig. 1 に示す。リゾチームを投与した群では十二指腸下部および回腸下部に高い活性が検出された。また、PBS 投与群においては、空腸下部から回腸部に高い活性が検出された。この結果は、必ずしもたん白質を投与しなくても胆汁は分泌されることを示唆するが、リゾチーム投与群と PBS 投与群とでは活性の局在する部位がやや異なっており、分泌量や腸管内での移動速度が異なると推定された。一方、KSTI を投与した群では小腸全域においてトリプシン活性はほとんど検出されなかった。これは、トリプシンを KSTI が阻害すると同時に、分泌されたトリプシノーゲンの自己触

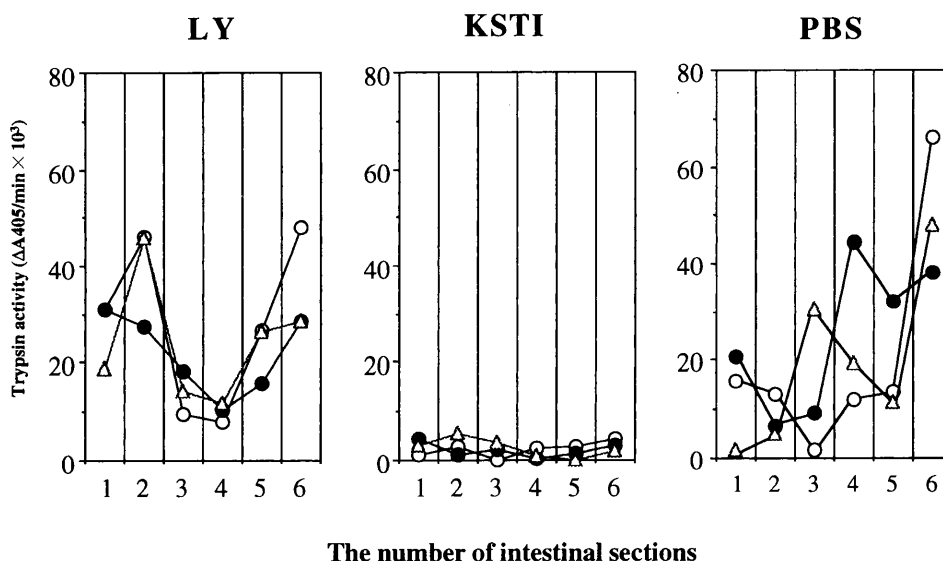


Fig. 1. Trypsin activity in the small intestine of mice after intragastric administration of lysozyme (LY), Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI), and PBS. The intestinal contents were recovered from 6 sections (the order is from duodenum to ileum) 30 min after administration. The trypsin activity was measured by using α -N-benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPA) as a substrate.

媒の活性化も阻害した結果と考えられる。

同じ小腸内容物について、キモトリプシン活性およびエラスターゼ活性を測定した結果を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。いずれのプロテアーゼも、リゾチームおよび PBS 投与群では、検出される部位に個体間で差異が見られたものの、小腸全域において活性が検出された。一方、KSTI 投与群では、いずれのプロテアーゼにおいても、小腸の上部あるいは下部に局所的に弱い活性が検出されるのみで、LY あるいは PBS 投与群よりも明らかに低い値であった。

リゾチーム投与群と KSTI 投与群について、小腸の 6 つの断片でのプロテアーゼ活性の総和として表し、比較した (Fig. 4)。このように、小腸内の全活性について比較すると、KSTI 投与群では リゾチーム投与群に比べて、トリプシン活性のみならず、キモトリプシンおよびエラスターゼ活性も顕著に低いことが明確に示された。

トリプシンは唾液として分泌されたプロ型のキモトリプシノーゲン、プロエラスターゼを限定分解し、活性型に変換することが知られている。KSTI はキモトリプシン、エラスターゼは阻害しないため、KSTI がトリプシンを顕著に阻害することにより、他のプロテアーゼの活性型への変換が行われず、結果として消化管内

のプロテアーゼ活性が顕著に低下したものと考えられる。KSTI は他のたん白質と比べて、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、いずれに対しても分解を受けにくい⁴⁾。胃内に投与した KSTI が、未分解のまま小腸内に多量に残存する理由として、プロテアーゼに対する抵抗性ととも、そのトリプシン阻害活性により、小腸内のプロテアーゼ活性を低下させていることによるものと推定された。

胃内に投与するたん白質の量と小腸内残存量および血清抗体応答との関連

胃内に投与された KSTI は、小腸内に多量に残存するにも関わらず、血清抗体応答を誘導しない理由を探るために、リゾチームを用いて、異なる投与量での小腸内残存量と抗体応答を調べた。5 mg 投与群と 20 mg 投与群について血清抗体応答を測定した結果、データは示さないが、特に IgE 抗体において、投与量が多い方が高い抗体応答が誘導される傾向がみられた。そこで、両群について小腸内に残存するリゾチームを特異抗体を用いた免疫ブロット法により調べた。Fig. 5 に示すように、5 mg 投与群と 20 mg 投与群いずれにおいても、回腸部に未分解のリゾチームが検出されたが、そのバンドの強度に両群で顕著な差は認められなかった。一方、20 mg 投与群では、回腸部にリゾチームの

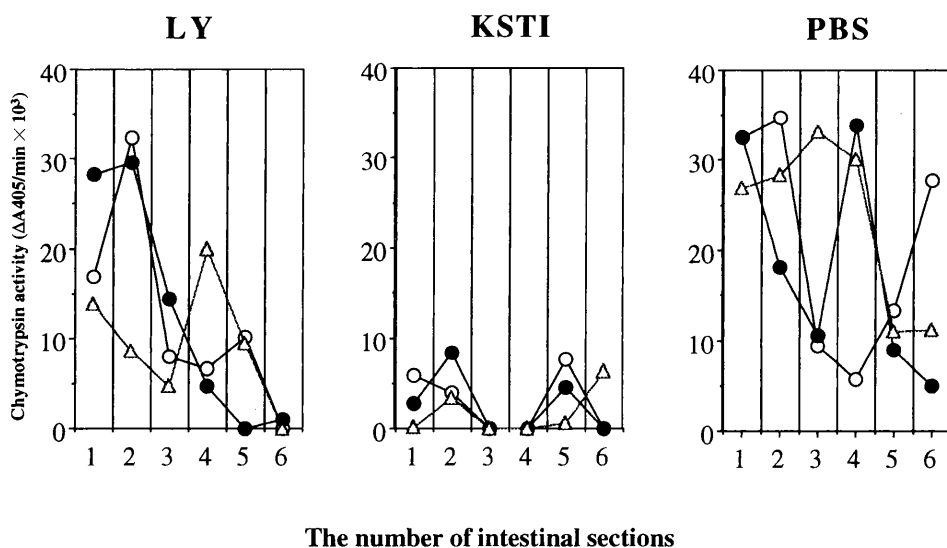


Fig. 2. Chymotrypsin activity in the small intestine of mice after intragastric administration of lysozyme (LY), Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI), and PBS. The intestinal contents were recovered from 6 sections (the order is from duodenum to ileum) 30 min after administration. The chymotrypsin activity was measured by using α -N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BTPA) as a substrate.

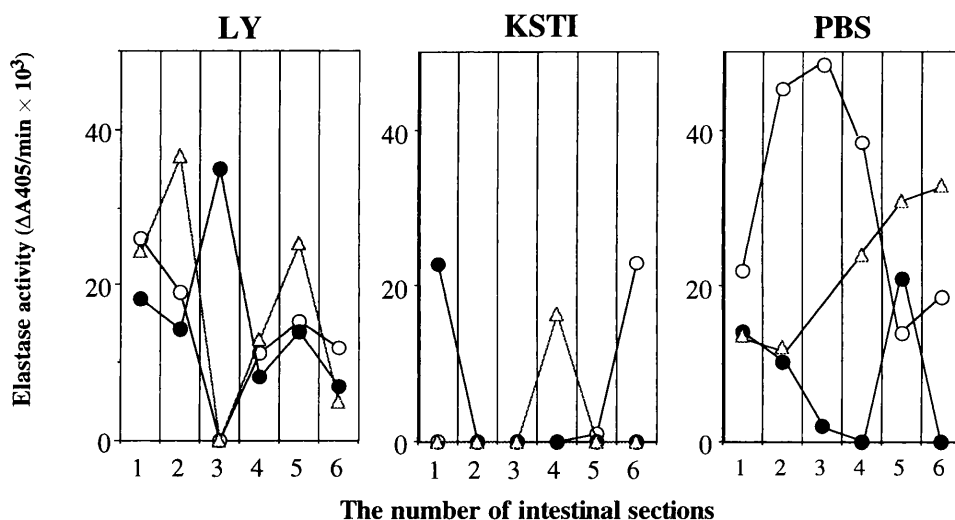
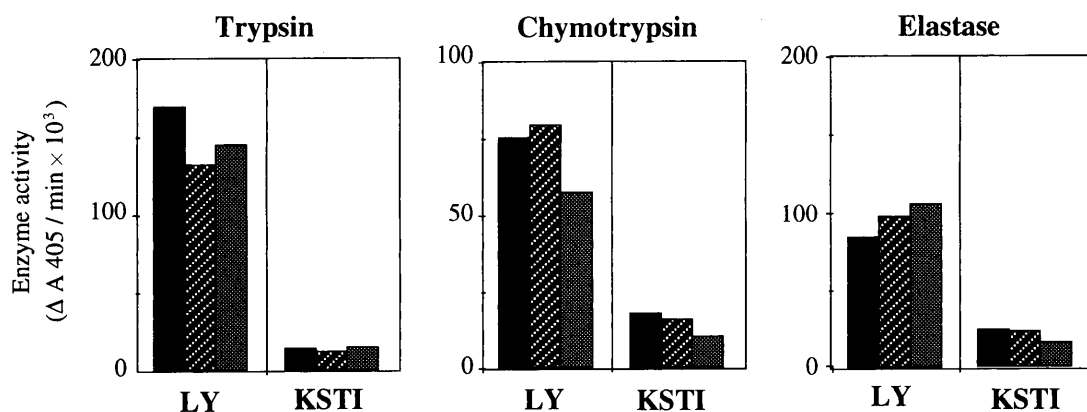


Fig. 3. Elastase activity in the small intestine of mice after intragastric administration of lysozyme (LY), Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI), and PBS. The intestinal contents were recovered from 6 sections (the order is from duodenum to ileum) 30 min after administration. The elastase activity was measured by using α -N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine *p*-nitroanilide as a substrate.



Intragastrically administered proteins

Fig. 4. Protease activity in the small intestine of mice after intragastric administration of lysozyme (LY), Kunitz soybean trypsin inhibitor (KSTI), and PBS. The total activities of trypsin, chymotrypsin, and elastase in the small intestine (the sum of 6 sections in Figs 1-3) are shown for each mouse.

部分分解断片と考えられる不鮮明な帯状の抗体陽性シグナルが検出された。この結果は、投与量を増加しても、小腸内では、必ずしも未分解のたん白質量が増加せず、むしろ抗原性を保持した分解断片が増加することを示している。KSTIでは、このような分解断片よりも未分解のたん白質が多量に小腸内に残存しており、このような部分分解断片と抗体応答の誘導との関連に興味を持たれる。

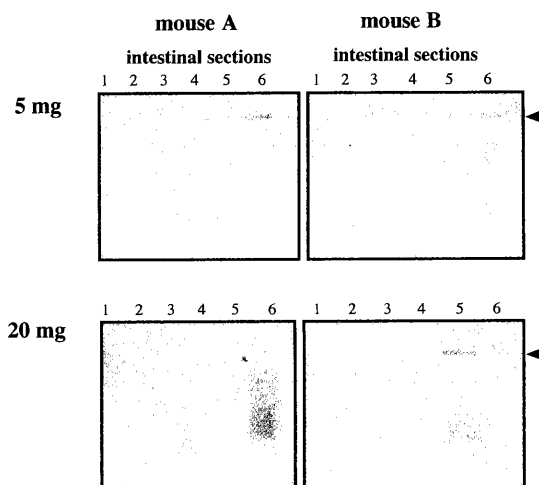


Fig. 5. Detection of lysozyme and its fragments in the small intestine of mice after intragastric administration. After the oral administration of lysozyme (5 and 20 mg/mouse), the intestinal contents were recovered and separated by SDS-PAGE, followed by blotting onto a PVDF membrane. The lysozyme and its antigenic fragments were detected by immunostaining with anti-lysozyme antibody. The arrowheads show the position of the intact lysozyme.

要 約

昨年度までの研究により、大豆トリプシンインヒビターを投与すると、小腸内トリプシン活性が顕著に阻害され、消化管内に未分解のたん白質が多く残存することを示した。未分解のアレルゲンが体内に取り込まれやすくなると推定されたが、*in vivo* 消化性と経口免疫原性はかならずしも逆相関しない結果が得られた。本研究では、大豆トリプシンインヒビターの投与によるトリプシン以外の膵液たん白質分解酵素活性の変動を測定し、これらの酵素活性と投与たん白質の *in vivo* 消化性との関連を調べることににより、トリプシン活性の阻害がアレルゲンたん白質の消化性と経口免疫原性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。大豆トリプシンインヒビターあるいは卵白リゾチームをマウスの胃内にゾンデを用いて一定量投与し、一定時間後に解剖し、小腸各部の内容物を採取した。内容物中のトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼの活性を各々に特異的な合成基質を用いて測定した結果、大豆トリプシンインヒビターを投与すると、腸内トリプシン活性が顕著に阻害されるのみならず、大豆トリプシンインヒビターでは直接阻害されないキモトリプシンおよびエラスターゼの活性も低下することが明らかとなった。これらの結果から、大豆トリプシンインヒビターを投与すると腸内のたん白質分解酵素活性が顕著に低下することにより未分解のたん白質抗原が多量に残存すると推定された。さらに、異なる量のリゾチームを胃内に投与して、小腸内の残存量と抗体応答を調べた結果、未分解のたん白質よりも免疫原性を保持した部分分解フラグメントが抗体応答の誘導に関与する可能性が示唆された。

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 (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) 二宮憲子, 市場愛子, 松田 幹 (1998): 大豆たん白質の *in vitro* および *in vivo* 酵素分解性と経口免疫原性. 大豆たん白質研究, **1**, 75-80.
- 5) Engvall E and Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- 6) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 7) Aoki N, Kuroda H, Urabe M, Taniguchi Y, 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.