

大豆イソフラボンおよび環境ホルモンの抗体産生調節作用

山田耕路^{*1}・韓 達昊¹・呉 博聖¹・安田 伸¹・菅野道廣²・立花宏文¹

¹九州大学大学院農学研究院 ²熊本県立大学環境共生学部

Immunoglobulin Production-regulating Activity of Soy Isoflavones and Environmental Estrogens

Koji YAMADA¹, Dal-Ho HAN¹, Po-Sheng WU¹, Shin YASUDA¹, Michihiro SUGANO²
and Hirofumi TACHIBANA¹

¹Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

²Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto,
Kumamoto 862-8502

ABSTRACT

We tried the establishment of estrogen-free culture system of mouse spleen lymphocytes and found that 7-days cultivation of the lymphocytes in phenol red-free DMEM medium supplemented with 5% charcoal-treated fetal bovine serum allowed us to estimate immunoglobulin production-regulating activity of environmental estrogens. Using the system, we found that soy isoflavones such as daidzein and genistein suppressed IgE production of the lymphocytes at low concentrations around 10^{-8} M, while enhanced IgE production at high concentrations over 10^{-4} M. An endogenous estrogen, 17β -estradiol exerted only IgE production-enhancing activity at high concentrations. These results suggest that IgE production-suppressing and -enhancing activities are regulated by different mechanisms. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 103-107, 2002.

Key words: mouse splenocytes, isoflavone, immunoglobulin production

食品および環境中には種々の環境ホルモンが存在しており、野生動物のみならずヒトの内分泌系を攪乱する可能性が示されている。大豆中のイソフラボンはエストロゲン活性を有するが、その作用は濃度により大きく異なることが明らかとなっている^{1,2)}。すなわち、

大豆イソフラボンは 10^{-7} M前後の低濃度領域ではヒト乳癌細胞株MCF-7細胞の増殖を促進するが、 10^{-5} M以上の高濃度領域では致死作用を示す。また、茶ポリフェノールなどの植物成分が低濃度領域でラットリンパ球のIgE産生を抑制して抗アレルギー作用を発現する一方、高濃度領域ではIgE産生の促進を通じてアレルギー応答を促進する可能性が示されている³⁾。本研究

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

では、大豆イソフラボンの抗体産生調節機能を明らかにするとともに、その活性発現におけるエストロゲン作用の関与を確認するため、エストロゲンフリーのマウスリンパ球培養系の確立を試み、本実験系を用いて内分泌攪乱物質の抗体産生調節機能について検討した。

方 法

試 薬

Daidzein (Dai), genistein (Gen), quercetin (Que), luteolin (Lut) などのフラボノイドはフジッコ(株)より、 17β -estradiol (ES), diethylstilbestrol (DES), tamoxifen (Tam), はSigma社より、bisphenol A (BA) はAldrich社より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) はBio Wittaker社より購入し、山田らの方法¹⁾により活性炭処理を行ったもの (cFBS) を培養に用いた。細胞培養用の基本合成培地はDMEM培地をSigma社より、RPMI1640培地を日水製薬より購入した。

マウス脾臓リンパ球の培養および抗体の定量

9週齢雄BALB/cマウスより脾臓を採取し、Lim *et al.*の方法⁴⁾によりリンパ球を分離した。接着細胞は山田らの方法⁵⁾に従い、脾臓リンパ球を37℃で30分静置培養することにより除去した。リンパ球の培養にはRPMI1640もしくはDMEM培地を用い、後者はフェノールレッド (PR) を含まないPR(-)DMEM培地およびPRを含むPR(+)DMEM培地のいずれかを用いた。FBSもしくはcFBSを含む培地中で一定期間培養後、培養上清中の抗体濃度をLim *et al.*の方法⁴⁾に従い、酵素抗体法を用いて定量した。

結果と考察

マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす培地組成の影響

マウス脾臓リンパ球は通常RPMI1640培地を用いて培養されるが、本培地にpH指示薬として添加されているPRがエストロゲン活性を有することが明らかとなっている^{1,2)}。そこで、PR除去培地が市販されているDMEM培地を用いてマウスリンパ球の培養を試みた。また、細胞増殖因子の給源として用いられるFBS中には内在性のエストロゲンが存在することが知られている。そこで、活性炭処理によりエストロゲンを除去したcFBSの影響についても検討した。Table 1に示したように、PRの有無に関わらずIgA, IgEおよびIgMの産生がDMEM培地中で認められたが、IgGの産

生は認められなかった。また、DMEM培地中でのこれら抗体の産生能は、RPMI1640培地中と比較すると有意に低いものであった。FBS添加培地に比べcFBS添加培地では抗体濃度が高い傾向が認められたが有意差を与えるには至らなかった。また、PR(-)DMEM培地中に比べPR(+)DMEM培地中ではIgAおよびIgE濃度が低く、IgM濃度が高い傾向が認められたが、いずれも有意差を与えるには至らなかった。培地中のIgE濃度は培養開始後1日目、IgA濃度は3日目に最高値を与え、それ以後抗体濃度の上昇が停止したが、IgM濃度は7日間にわたり増加した。そこで、内分泌攪乱物質の抗体産生に及ぼす影響を検討する場合、5% cFBS含有PR(-)DMEM培地中で7日間培養することとした。

マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす大豆イソフラボンおよび環境ホルモンの影響

Table 2にマウスリンパ球のIgA産生に及ぼす各種内分泌攪乱物質の影響を示した。内在性エストロゲンであるESは有意な影響を及ぼさなかったが、Tam, BAおよびGenは有意にIgA産生を抑制した。Daiも抑制傾向を示したが、QueおよびLutは有意な影響を及ぼさなかった。

Table 3にIgE産生に及ぼす影響を示した。ESは 10^{-5} M以上の高濃度領域で有意に高いIgE濃度を与えた。DESは 10^{-8} Mで無添加区より有意に低い値を、 10^{-4} M以上で有意に高い値を与え、Tamも同様な傾向を示した。BAは 10^{-8} から 10^{-6} Mの範囲で有意に低い値を与えたが、高濃度領域におけるIgE濃度の上昇は認められなかった。DaiおよびGenは 10^{-8} および 10^{-7} Mで有意に低い値を与え、 10^{-4} M以上で有意に高い値を与えた。QueおよびLutでは濃度依存的なIgE濃度の上昇のみが認められた。これらの内分泌攪乱物質の投与によるIgG産生の誘導は観察されなかった。

Table 4にIgM産生に及ぼす影響を示した。ESは 10^{-8} から 10^{-5} Mの濃度領域でIgM濃度を上昇させる傾向を示したが、有意差を与えるには至らなかった。DESは 10^{-8} M付近の低濃度領域と 10^{-4} M以上の高濃度領域でIgM濃度を有意に低下させた。TamおよびBAは 10^{-8} から 10^{-5} Mの低濃度領域でIgM濃度を有意に上昇させたが、Daiは 10^{-3} Mの高濃度領域においてのみ有意なIgM濃度の上昇を示した。一方、Genは 10^{-4} M以上の高濃度領域でIgM濃度を有意に低下させ、QueおよびLutはすべての処理濃度でIgM濃度を低下させた。

以上の結果は大豆イソフラボンを含む内分泌攪乱物質が抗体産生調節機能を有することを示唆している。しかしながら、その作用は化合物および処理濃度によ

Table 1. Effect of culture media on immunoglobulin production by mouse spleen lymphocytes

Medium	PR	Serum	Immunoglobulin concentration (ng/mL)			
			IgA	IgE	IgG	IgM
DMEM	—	FBS	3.3±0.5 ^{ab}	29.5±0.6 ^{ad}	Not detected	9.3±0.8 ^a
DMEM	—	cFBS	4.5±0.4 ^a	33.0±0.9 ^b	Not detected	13.1±1.3 ^a
DMEM	+	FBS	2.7±0.7 ^b	27.7±0.7 ^a	Not detected	11.5±0.9 ^a
DMEM	+	cFBS	3.9±0.3 ^{ab}	31.8±1.0 ^{bd}	Not detected	17.5±2.1 ^b
RPMI	+	FBS	10.7±0.3 ^c	82.6±1.6 ^c	9.1±0.6	25.3±0.8 ^c

Data are mean ± SE (n=4) and values without same superscript letter are significantly different at $P < 0.05$. Mouse spleen lymphocytes were cultured for 7 days in various media and Ig content in culture media was determined by ELISA. DMEM, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; RPMI, RPMI 1640 medium; PR, phenol red; FBS, fetal bovine serum; cFBS, charcoal-treated FBS.

Table 2. Dose-dependent effect of environmental estrogens on IgA production by mouse spleen lymphocytes

Conc (M)	IgA concentration (ng/mL)							
	ES	DES	Tam	BA	Dai	Gen	Que	Lut
None	2.7±0.2	2.7±0.2	2.7±0.2	2.7±0.2	2.7±0.2	2.7±0.2	2.7±0.2	2.7±0.2
10 ⁻⁸	3.3±0.3*	2.3±1.1	1.4±0.2***	0.8±0.2***	1.9±0.3**	2.0±0.1***	2.3±0.1*	2.4±0.2
10 ⁻⁷	3.1±0.4	2.5±0.7	1.4±0.2***	1.1±0.0***	2.1±0.2**	1.6±0.2***	2.3±0.2*	2.1±0.4*
10 ⁻⁶	3.1±0.7	1.9±0.5*	2.1±0.2**	1.3±0.0***	2.2±0.1**	1.8±0.1***	2.3±0.2*	2.5±0.2
10 ⁻⁵	2.8±0.3	2.3±1.1	1.6±0.1***	0.8±0.1***	2.1±0.2**	1.9±0.2**	2.5±0.2	2.8±0.4
10 ⁻⁴	2.4±0.3	0.8±0.3***	1.4±0.3***	0.7±0.1***	2.2±0.1**	1.8±0.1***	2.9±0.3	2.3±0.3
10 ⁻³	2.3±0.1*	1.9±0.9	2.0±0.3**	1.2±0.3***	2.4±0.1*	1.8±0.2***	2.4±0.2	2.4±0.4

Data are means ± SD (n=4: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Mouse spleen lymphocytes were cultured for 7 days in 5% cFBS/PR(-)DMEM medium containing various concentrations of estrogenic compounds and IgA content in culture media was determined by ELISA. cFBS, charcoal-treated fetal bovine serum; PR, phenol red; ES, 17 β -estradiol; DES, diethylstilbestrol; Tam, tamoxifen; BA, bisphenol A; Dai, daidzein; Gen, genistein; Que, quercetin; Lut, luteolin.

り異なっており、抗体産生調節機能の発現には複数の作用機構が関与することが示唆された。大豆イソフラボンは低濃度領域でIgE産生抑制効果を示し、高濃度領域ではIgE産生促進効果を示したが、内在性エストロゲンであるESは後者の活性のみを示した。また、大豆イソフラボンと類似した構造を有するQueやLutなどのフラボノイドはIgE産生促進効果のみを示し、イソフラボンとは抗体産生調節機能が異なることが明らかとなった。IgE産生促進効果は多価不飽和脂肪酸^{6,7)}およびフェノール性化合物³⁾を高濃度で投与した際に見いだされており、これらの化合物の酸化反応が活性発現に関与すると考えられている。茶ポリフェノールはイソフラボンと同様に低濃度領域でIgE産生を抑制するが、その活性発現には抗酸化作用が関与するものと考えられている³⁾。本研究において、細胞内酸化反応のみならず、内分泌攪乱物質のエストロゲン受容体との相互作用がB細胞の抗体産生に影響を及ぼす可能性が示された。

低濃度領域におけるIgE産生抑制効果は工業製品由

来の内分泌攪乱物質であるBAにも認められたが、BAは大豆イソフラボンよりIgA産生抑制効果が強く、腸管免疫系を損なう可能性が認められた。このような腸管免疫系の機能低下はアレルギーや病原体に対する防御機構の低下をもたらす危険性があり、大豆イソフラボンはBAより安全な抗アレルギー因子であると考えられた。以上の結果は、大豆イソフラボンの適切な用量での摂取はIgE産生の抑制を通じて抗アレルギー作用を発現する可能性を示している。

Table 3. Dose-dependent effect of environmental estrogens on IgE production by mouse spleen lymphocytes

Conc (M)	IgE concentration (ng/mL)							
	ES	DES	Tam	BA	Dai	Gen	Que	Lut
None	21.7±0.3	21.7±0.3	21.7±0.3	21.7±0.3	21.7±0.3	21.7±0.3	21.7±0.3	21.7±0.3
10 ⁻⁸	20.7±1.1	17.4±1.7**	16.2±1.1***	11.5±2.1***	8.2±0.7***	11.0±4.3**	25.8±2.8*	27.0±1.1***
10 ⁻⁷	23.1±2.6	20.3±1.9	19.3±1.8*	15.2±1.2***	12.3±1.3***	11.5±2.9***	30.2±2.2***	31.3±2.0***
10 ⁻⁶	22.4±2.9	22.0±0.8	19.3±1.6*	16.0±2.2**	16.6±4.4	15.1±4.3*	33.7±2.5***	35.1±2.3***
10 ⁻⁵	28.6±0.9***	22.9±0.6*	18.3±3.0	18.4±1.3**	24.2±2.9	14.5±7.4	39.2±4.6***	39.5±0.6***
10 ⁻⁴	27.9±1.4***	25.3±0.3***	23.8±0.9**	19.3±1.4*	29.5±2.9**	28.4±4.4*	47.1±4.7***	53.1±1.2***
10 ⁻³	28.9±1.1***	30.2±1.1***	16.6±1.0***	22.2±2.2	31.4±2.3***	41.1±3.7***	45.2±2.6***	53.7±1.2***

Data are means ± SD (n=4: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001). Mouse spleen lymphocytes were cultured for 7 days in 5% cFBS/PR(-)DMEM medium containing various concentrations of estrogenic compounds and IgE content in culture media was determined by ELISA. cFBS, charcoal-treated fetal bovine serum; PR, phenol red; ES, 17 β -estradiol; DES, diethylstilbestrol; Tam, tamoxifen; BA, bisphenol A; Dai, daidzein; Gen, genistein; Que, quercetin; Lut, luteolin.

Table 4. Dose-dependent effect of environmental estrogens on IgM production by mouse spleen lymphocytes

Conc (M)	IgM concentration (ng/mL)							
	ES	DES	Tam	BA	Dai	Gen	Que	Lut
None	13.9±0.8	13.9±0.8	13.9±0.8	13.9±0.8	13.9±0.8	13.9±0.8	13.9±0.8	13.9±0.8*
10 ⁻⁸	18.5±2.8*	8.7±0.7***	28.6±0.7***	22.2±1.7***	11.2±0.7**	15.2±2.0	2.9±0.1***	3.1±0.5***
10 ⁻⁷	20.3±1.1***	9.7±1.7**	32.5±2.3***	23.2±1.9***	11.4±0.2**	14.5±1.0	2.8±0.0***	3.2±0.7***
10 ⁻⁶	20.1±2.7**	14.4±2.6	26.4±1.6***	27.7±1.9***	15.1±2.8	15.8±3.1	2.8±0.0***	3.2±0.8***
10 ⁻⁵	19.0±3.7	13.0±1.0	18.4±0.8***	25.4±2.5***	15.9±1.1*	14.8±0.5	2.8±0.0***	3.1±0.5***
10 ⁻⁴	13.2±2.0	4.4±1.5***	14.1±1.4	20.7±0.9***	16.3±1.0**	7.7±1.8***	3.5±0.7***	3.4±0.7***
10 ⁻³	13.0±2.0	4.0±0.2***	11.5±0.6	15.9±1.2*	22.2±1.6***	3.5±1.7***	2.9±0.2***	4.9±2.5***

Data are means ± SD (n=4: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001). Mouse spleen lymphocytes were cultured for 7 days in 5% cFBS/PR(-)DMEM medium containing various concentrations of estrogenic compounds and IgM content in culture media was determined by ELISA. cFBS, charcoal-treated fetal bovine serum; PR, phenol red; ES, 17 β -estradiol; DES, diethylstilbestrol; Tam, tamoxifen; BA, bisphenol A; Dai, daidzein; Gen, genistein; Que, quercetin; Lut, luteolin.

要 約

エストロゲンフリーのマウス脾臓リンパ球培養系の確立を試み、活性炭処理ウシ胎児血清を5%含むフェノールレッド除去DMEM培地を用いてリンパ球を7日間培養することにより、内分泌攪乱物質の抗体産生調節機能を検定しうることを明らかにした。この系を用いて大豆イソフラボンの抗体産生調節機能を検討し、daidzeinおよびgenisteinが10⁻⁸ M前後の低濃度領域でIgE産生抑制効果を発現するが、10⁻⁴ M以上の高濃度領域ではIgE産生を促進することを見出した。内在性エストロゲンである17 β -estradiolは高濃度領域におけるIgE産生促進効果のみを示し、IgE産生抑制効果と促進効果は異なる機構により制御されていることが示唆された。

文 献

- 1) 山田耕路・韓 達昊・宮崎義之・菅野道廣・立花宏文 (2000): ヒト乳がんMCF-7細胞の増殖に及ぼすイソフラボンの作用。大豆たん白質研究, **3**, 54-58.
- 2) 山田耕路・韓 達昊・菅野道廣・立花宏文 (2001): 大豆イソフラボンのエストロゲン活性発現抑制効果。大豆たん白質研究, **4**, 123-128.
- 3) Yamada K, Watanabe T, Kaku S, Hassan N and Sugano M (1997): Effects of tea extracts and phenolic compounds on immunoglobulin production

- by mesenteric lymph node lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *Food Sci Technol Int*, **3**, 179-183.
- 4) 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 Biotechnol Biochem*, **59**, 624-627.
 - 5) 山田耕路, 高杉美佳子, 田村由希, 宮崎義之, 菅野道廣, 立花宏文 (1999) : 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応用. 大豆たん白質研究, **2**, 65-69.
 - 6) Yamada K, Hung P, Yoshimura K, Taniguchi S, Lim BO and Sugano M (1996) : Effect of unsaturated fatty acids and antioxidants on immunoglobulin production by mesenteric lymph node lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *J Biochem*, **120**, 138-144.
 - 7) Hung P, Yamada K, Lim BO, Mori M, Yuki T and Sugano M (1997) : Effect of unsaturated fatty acids and α -tocopherol on immunoglobulin levels in culture medium of rat mesenteric lymph node and spleen lymphocytes. *J Biochem*, **121**, 1054-1060.