

マウス脾細胞の機能と食餌タンパク質

細川 優¹⁾, 坪山 宣代²⁾, 吉原 富子³⁾, 増山 律子¹⁾, 戸谷 誠之¹⁾

(¹⁾国立健康栄養研究所 母子健康栄養部*, ²⁾高知医科大学 化学教室**,

³⁾東京家政大学 家政学部***)

The Effect of Dietary Protein on Mitogen Response of Splenocytes in C57BL/6 Mice

Yu HOSOKAWA¹⁾, Nubuyo TSUBOYAMA²⁾, Tomiko YOSHIHARA³⁾, Ritsuko MASUYAMA¹⁾, Masayuki TOTANI¹⁾

¹⁾*Division of Maternal and Child Health Science, The National Institute of Health and Nutrition,*

²⁾*Department of Chemistry, Kochi Medical School and* ³⁾*School of Home Economics, Tokyo Kasei University*

We first studied the effect of dietary protein concentration on immune responsiveness of C57BL/6 mice by measuring the proliferation response of splenocytes to mitogens. We used egg protein (PEP) as a protein source in diet, since PEP contains essential amino acids in good balance. The response of splenocytes to LPS, which is a B-cell specific mitogen, in mice fed on 2% protein diet was significantly lower than those in mice fed on each of 5% or 10% protein diet. While, the response of splenocytes to Con A, which is a T-cell specific mitogen, was unaffected by dietary protein restriction.

Next, we studied the effect of dietary protein type on immune responsiveness in relation to its sulfur amino acid concentration. The response of splenocytes to Con A in mice fed on 10% lactalbumin diet was significantly lower than those of mice fed on each of 10% soy protein (SPI), gluten, casein or PEP diet. The response to Con A of splenocytes in SPI and gluten diet groups were also slightly lower than those of casein and PEP diet groups. However, the response of splenocytes to LPS was unchanged by dietary protein type. In addition, the response of splenocytes to Con A in SPI diet group was significantly increased by the supplement with L-methionine in the diet, which is a first limiting amino acid of SPI and casein. The response of splenocytes to Con A in casein diet group was also marginally increased, while, that of gluten diet group did not change by L-methionine supplement. These results suggest that the immune response in T-cell may be in part controlled by the availability of sulfur amino acid from diet. However, the reason why the splenocytes in lactalbumin diet group shows low responsiveness to Con A is uncertain.

*所在地：東京都新宿区戸山1-23-1 (〒162)

**所在地：高知県南国市岡豊町小蓮 (〒781-51)

***所在地：東京都板橋区加賀1-18-1 (〒173)

序 論

タンパク質-エネルギー欠乏症 (PEM) では、細胞性免疫、NK 活性、食食活性、補体活性などの多くの生体防御機能が低下する¹⁾。しかし、PEM の場合は種々の栄養素の複合的欠乏の結果であり、個々の栄養素と免疫機能との関わりは反映しない。したがって、食餌タンパク質と免疫機能との関わりを探るために、無タンパク食あるいは低タンパク食で飼育した動物モデルを用いて多くの研究が行われている。一方、これまでに食餌タンパク質のクオリティーと免疫機能との関連を探究した研究は少ない。Bounous 等^{2,3)} は BCG で免疫したマウスを用いた研究で、ラクトアルブミン食で飼育すると B 細胞と T 細胞の免疫レスポンスが高まることを報告している。我々も食餌タンパク質のアミノ酸バランス、特に含硫アミノ酸濃度と免疫機能との関連に興味をもち研究を行ってきた。これと関連して、Fukukawa 等⁴⁾ は、加齢に伴い低下するマウス T 細胞のマイトゲンレスポンスは、食餌中に還元型グルタチオン (GSH) を添加すると部分的に回復することを報告している。in Vitro の実験系においても、培養液中に GSH、メルカプトエタノールを添加すると T 細胞のマイトゲンレスポンスが著しく上昇することから、細胞内の酸化還元状態と免疫レスポンスとの関連が推測されている^{5,6)}。本研究では、リンパ球の免疫機能レベルを探る指標としてマイトゲンレスポンスを選び、食餌タンパク質と含硫アミノ酸の摂取量が与える影響を解析する目的で本研究を試みた。

実 験 方 法

1. 動物

3 週齢の雌性 C57BL/6 マウス (1 群 4 匹) を 10% の全卵タンパク食で 3 日間予備飼育後、実験食に切り替えて 16 日あるいは 21 日飼育し実験に供した。飼料は自由摂取とした。

2. 飼料

AIN76 組成を基本とした飼料を調製した。表 1 に示すように、タンパク源として分離大豆タンパク質 (不二製油) (SPI)、グルテン (東京化成)、カゼイン (オリエンタル酵母)、全卵タンパク質 (太陽化学) (PEP)、ラクトアルブミン (東京化成) (Lact) をタンパク量で 10% 加えた。

3. 脾臓細胞の分離

頸椎脱臼で屠殺したマウスから無菌的に脾臓を摘出し、注射筒を用いて細胞を 10% FBS を添加した PBS 中に押し出した。ナイロンメッシュで濾過し、細胞を PBS で洗浄した後、10% FBS を添加した RPMI-1640 培養液で細胞浮遊液 (2×10^6 /ml) を調製した。

4. マイトゲンレスポンス

細胞浮遊液 0.2ml をマイクロタイタープレートの各ウエルに分注し、マイトゲン (LPS: $10 \mu\text{g}/\text{ml}$; Con A: $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて炭酸ガス培養器中、 37°C で培養した。30 時間後、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の [メチル- ^3H] チミジンを加えてさらに 18 時間培養した。細胞ハーベスターを用いて細胞をガラスフィルター上に集めた後、トルエンシンチレータを加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

Table 1. Amino acid composition in experimental diets

Amino acid	10% SPI	10% Gluten	10% Casein	10% PEP	NRC ¹⁾
ILe	5.7	4.1	5.6	5.5	4
Leu	8.6	7.5	9.7	8.8	7
Lys	6.7	*1.9	8.3	7.2	4
SAA	*2.8	4	*3.6	5.9	5
AAA	9.8	9.1	11	9.3	7.6
Thr	3.9	2.8	4.3	4.6	4
Try	1.5	1.1	1.3	1.5	1
Val	5.3	4.5	7	6.8	5
His	2.9	2.4	3.1	2.5	2
Arg	8.4	3.8	3.8	6.4	3

1) Estimated nutrient requirements of mice⁷⁾. *First limiting amino acid.

結果と考察

1. 食餌タンパク質量とマイトゲンレスポンス

始めに基礎実験としてマイトゲンレスポンスにおよぼす食餌タンパク質量の影響を検討した。この場合は、アミノ酸バランスが良好な全卵タンパク質 (PEP) を使用し、2%, 5%あるいは10%タンパク食でマウスを16日間飼育した。2%, 5%および10%群の最終体重は、 $12.2 \pm 0.7\text{g}$, $17.0 \pm 0.5\text{g}$, $18.4 \pm 1.0\text{g}$ で、10%のタンパク量でほぼプラトーに達した。マウスの場合、12%のカゼイン濃度で成長を維持できると報告されている⁷⁾。2%群では脾臓の重量と回収した細胞数が、5%, 10%群の約半分であった。表2に示すように、B細胞に特異的なマイトゲンである LPS ($10\mu\text{g/ml}$) に対するレスポンスを検討したところ、2%群では5%群の約半分であった。タンパク量が5%になると10%群との間には差は認められなかった。一方、T細胞に特異的なマイトゲンである Con A に対するレスポンスは、食餌タンパク量で変化しなかった。次に、2%群で認められる LPS レスポンスの低下が、脾細胞中に含まれる B細胞数の低下に起因するかを検討した。2%, 5%および10%群の脾細胞中に含まれる FITC-ラベル IgG 陽性細胞数の割合は、それぞれ45, 47および44%で、各群に差はなかった。以上の結果から、

Table 2. The effect of dietary protein concentration on mitogen response of splenocytes

Dietary treatment	Mitogen	
	LPS ($10\mu\text{g/ml}$)	Con A ($5\mu\text{g/ml}$)
	[³ H] thymidine uptake (dpm)	
2% PEP	35968 $\pm$ 10443a	153205 $\pm$ 12686
5% PEP	84985 $\pm$ 5525b	114898 $\pm$ 7996
10% PEP	97009 $\pm$ 15801b	134456 $\pm$ 8081

1) Mice were fed on experimental diets for 16 days ad libitum.

2) Mean values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.01$) by Tukey multiple comparisons test.

食餌タンパク量は、抗体産出細胞であるB細胞のレスポンスにのみ影響を与え、それは各々の細胞のレスポンスの低下に起因することが確かめられた。

2. 食餌タンパク質の種類とマイトゲンレスポンス

次に、食餌タンパク質のクオリティーとリンパ球レスポンスとの関連を探った。この研究では、前述の PEP 食の研究結果をふまえて食餌タンパク量を10%とした。表1に示すタンパク質を10%含む飼料でマウスを21日間飼育して脾細胞のマイトゲンレスポンスを検討した。SPI (大豆タンパク) とカゼインでは、含硫アミノ酸が第一制限アミノ酸であり、グルテンの場合はリジンが第一制限アミノ酸である。体重、脾臓の重量と細胞数およびT細胞サブセットを表3に示した。SPI群とグルテン群では、制限アミノ酸の効果で成長が抑制されている。体重に対する脾臓重量の割合と脾細胞数もカゼイン、PEP群に比べて低値を示した。タンパク質-エネルギー欠乏症で低下するCD4陽性細胞/CD8陽性細胞比もこれらの食餌タンパク質では若干低下していた。LPSに対するレスポンスを検討したところ各群に差を認めなかった(表4)。一方、Con Aに対するレスポンスは、ラクトアルブミン群で他のタンパク群に比べ有意に低かった。今回の結果は上述した Bounous 等³⁾とは逆の結果である。その原因として、Bounous 等の研究とは異なり、今回はBCGによる免疫は行っていない。今後種々の条件下でラクトアルブミンの効果を検討する必要がある。また、SPIとグルテン群も、カゼイン、PEP群に比べてCon A

Table 3. The effect of dietary protein type on body weight, spleen weight, and yield and FACS analysis of splenocytes

Diets	Fial BW (g)	Spleen weight/BW (%)	Splenocytes ($\times 10^{-6}/g$ BW)	CD4+/CD8+
10% SPI	15.2 $\pm$ 0.7	0.569 $\pm$ 0.036	9.74	1.18
10% Gluten	14.8 $\pm$ 1.3	0.508 $\pm$ 0.108	10.14	1.03
10% Casein	16.5 $\pm$ 0.6	0.695 $\pm$ 0.064	11.88	1.29
10% PEP	17.0 $\pm$ 1.1	0.656 $\pm$ 0.110	13.29	1.31
10% Lact	18.2 $\pm$ 0.2	0.650 $\pm$ 0.074	14.01	1.29

1) Mice were fed on experimental diets for 21 days ad libitum.

Table 4. The effect of dietary protein type on mitogen response of splenocytes

Dietary treatment	Mitogen	
	LPS (10 μ g/ml)	Con A (5 μ g/ml)
	[³ H] thymidine uptake (dpm)	
10% SPI	28580 $\pm$ 1826a	39890 $\pm$ 5800
10% Gluten	30692 $\pm$ 3440a	41680 $\pm$ 2860
10% Casein	36862 $\pm$ 3521a	43430 $\pm$ 3180
10% PEP	39666 $\pm$ 1973a	41330 $\pm$ 2890
10% Lact	16478 $\pm$ 4463a	32700 $\pm$ 4520

1) Mean values with different superscript letters are significantly different ($P<0.01$) by Tukey multiple comparisons test.

レスポンスが低い傾向が見られたが、有意な差ではなかった。

3. 含硫アミノ酸摂取量とマイトゲンレスポンス

T細胞のCon A レスポンスは、培養液中にグルタチオンを添加すると上昇することが認められており、この現象は細胞中の総チオール量が低い加齢マウスから分離したT細胞で著しいことも認められている。従って、Con A レスポンスがSPI 群で低い理由の一つとして、食餌から摂取する含硫アミノ酸量の不足により、体内での利用性が低下していることと関連する可能性がある。次に、含硫アミノ酸が制限アミノ酸である10%SPI 食、10%グルテン食、10%カゼイン食に、含硫アミノ酸濃度がNRC⁷⁾の必要量と推定されている0.5%となるようにL-メチオニンを添加して、Con A レスポンスに与える効果を検討した。含硫アミノ酸が第一制限アミノ酸であり、NRC 必要量の56%しか含まれていないSPI 食では、L-メチオニンを添加すると、Con A レスポンスは対照の187%に上昇した(表5)。同様に、含硫アミノ酸量がNRC 必要量の72%しか含まれないカゼインでもCon A レスポンスが上昇する傾向を認めたが有意ではなかった。一方、グルテン食ではL-メチオニンの添加効果はまったく認められなかった。グルテン中の含硫アミノ酸含量もNRC 必要量の80%しか含まれていない。成長期の含硫アミノ酸はタンパク合成への利用率が高いアミノ酸である。上述の結果から、グルテンの場合はリジンの強い制限により成長、タンパク合成は抑制されており、免疫レスポンスに関しては含硫アミノ酸は充足した状態である可能性が強い。

Table 5. The effect of L-methionine supplemented diet on Con A response of splenocytes

Supplementation	10% SPI	10% gluten	10% Casein
[³ H] thymidine uptake (dpm)			
None	28918±2408	70183±3520	35826±6190
L-methionine	54029±6517*	66165±9396	46751±5395

1) Mice were fed on experimental diets for 16 days ad libitum.

2) L-methionine was supplemented in the diet as 0.5% of final sulfur amino acid concentration.

3) Cells were stimulated with 5μg/ml of Con A. *P<0.05 by Student's test.

Bounou 等³⁾は、20%カゼイン食にシステインを添加すると、抗体産出細胞数を示すリンパ球のPFC (plaque-forming cell) レスポンスが上昇することを認めており、この知見は今回の結果を支持する。リンパ球、特にT細胞機能と含硫アミノ酸との関連は、HIV 感染患者でも確認されている。これらの患者では、血漿とリンパ球のGSH 濃度の低下が観察され、これがT細胞機能不全の原因の一つであると考えられている⁸⁾。この場合は、治療薬としてGSHの前駆体となるN-アセチルシステインを使用している。現在、リンパ球機能に対する含硫アミノ酸の効果は、細胞内の酸化還元状態の変化から細胞膜の安定性を介してレスポンスを高めると推測されているが、これについては今後の重要な問題点である。一方、ラクトアルブミン食では、有意に低いCon A レスポンスを認めた。ラクトアルブミンには、NRC の必要量の126%の含硫アミノ酸が含まれている。従って、含硫アミノ酸濃度のみで、Con A レス

ポンスが低値を示す理由を説明できない。他のアミノ酸と含硫アミノ酸濃度との相対的バランスも免疫レスポンスに影響している可能性もあり今後の問題点である。

参 考 文 献

- 1) Chandra, R.K. (1991) Am. J. Clin. Nutr. 53 : 1087-1101.
- 2) Bounous, G. & Kongshavn, P.A.L. (1985) J. Nutr. 115 : 1403-1408.
- 3) Bounous, G., Letourneau, L. & Kongshavn, P.A.L. (1983) J. Nutr. 113 : 1415-1421.
- 4) Furukawa, T., Meydani, S.N. & Blumberg, J.B. (1987) Mech. Aging Dev. 38 : 107-117.
- 5) Franklin, R.A., Mingli, Y., Arkins, S. & Kelley, K.W. (1990) J. Nutr. 120 : 1710-1717.
- 6) Heidrick, M.L., Albright, J.W. & Makinodan, T. (1980) Mech. Aging Dev. 13 : 367-378.
- 7) National Research Council (1995) Nutrient requirements of laboratory animals Fourth Revised Edition, National Academy Press, Washington, D.C.
- 8) Kalebic, T., Kinter, A., Poli, G., Anderson, M.E., Meister, A. & Fauci, A.S. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 986-990.