

## 含硫アミノ酸の摂取量とマウス脾細胞の応答性

細川 優<sup>1)</sup>, 坪山 宜代<sup>1)</sup>, 増山 律子<sup>2)</sup>, 吉原 富子<sup>3)</sup>, 戸谷 誠之<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>国立健康栄養研究所・母子健康栄養部\*, (<sup>2)</sup>東京農業大学・栄養生理化学研究室\*\*,

(<sup>3)</sup>東京家政大学・家政学部\*\*\*)

### The effect of sulfur amino acid intake on the proliferation response of splenocytes in growing mice

Yu Hosokawa<sup>1)</sup>, Nobuyo Tsuboyama<sup>1)</sup>, Ritsuko Masuyama<sup>2)</sup>, Tomiko Yoshihara<sup>3)</sup>, Masayuki Totani<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>*Division of Maternal and Child Health Science, National Institute of Health and Nutrition,*

<sup>2)</sup>*Department of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,*

<sup>3)</sup>*School of Home Economics, Tokyo Kasei University*

The effects of dietary proteins containing different levels of sulfur amino acid on the responsiveness of splenocytes to concanavalin A (Con A) were examined. The Con A-induced DNA synthesis of splenocytes in mice fed a purified egg protein (PEP) diet was significantly higher than those in mice fed a soy protein isolate (SPI) or casein diet. Reduced glutathione (GSH) and 2-mercaptoethanol (2-ME) markedly stimulated Con A-induced DNA synthesis in vitro, and the stimulatory effects of 2-ME were more marked in SPI and casein diet groups compared to the PEP diet group. In contrast, L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) markedly inhibited Con A-induced DNA synthesis in splenocytes. The degree of inhibition was greater in the order SPI, casein and PEP diet groups. These results suggest that the sulfur amino acids concentration in the dietary protein may play a key role in the regulation of lymphocyte responsiveness to Con A in growing mice.

飼料中への還元型グルタチオン (GSH) の添加, あるいは2-メルカプトエタノール (2-ME) の注射により, マウスのリンパ球機能が上昇することが認められている<sup>1,2)</sup>。チオール化合物の効果は, in vitroでも認められる。培養液にGSH, 2-MEあるいはシステインを添加すると, マイトゲンで誘導した増殖反応などが上昇する<sup>3,4)</sup>。一方, Bounous等は, 羊赤血球で免疫したマウスの脾細胞では, 溶血

---

\*所在地: 東京都新宿区戸山1-23-1 (〒162)

\*\*所在地: 東京都世田谷区桜丘1-1-1 (〒156)

\*\*\*所在地: 東京都板橋区加賀1-18-1 (〒173)

素産生細胞 (PFC) の活性が食餌タンパク質の種類で変化すること, カゼイン飼料ではL-システインの補足でPFCが上昇することを報告している<sup>5)</sup>。これらの知見は, 食餌タンパク質からの含硫アミノ酸の供給状況が, 脾細胞の応答性を規定する要因の一つになっていること示唆している。本研究では, 含硫アミノ酸レベルが異なる3種類の飼料タンパクでマウスを飼育し, 脾臓T細胞のCon Aに対する増殖応答から, 脾臓への含硫アミノ酸の供給, リンパ球のグルタチオンレベル, および免疫応答への影響を検討した。

## 実験方法

4週齢の雌C57BL/6マウス4匹を一群として実験に供した。マウスは, 10%精製全卵タンパク質食(PEP)で3日間予備飼育後, 実験食(Table 1)に切り替えて2週間飼育した。実験食は, 自由摂取とした。L-Metを補足した大豆タンパク質食(SPI)とカゼイン食には, それぞれ3.5gあるいは

**Table 1.** Compositions of experimental diets

Ingredients	10%	10%	10%
	SPI	Casein	PEP
	g/kg diet		
Protein source	122	116	104
Sucrose	200	200	200
Cornstarch	533	539	551
Corn oil	50	50	50
AIN-76 mineral mix	35	35	35
AIN-76 vitamin mix	10	10	10
Cellulose	50	50	50

L-methionine-supplemented SPI and casein diets were supplemented with 3.5 and 2.4 g/kg of L-methionine, respectively.

**Table 2.** Effects of dietary treatment on body weight gain and spleen weight index

Dietary group	Body weight (g)		Spleen Weight Index (mg/g) <sup>1)</sup>
	Initial	Final	
SPI	13.1±0.5	17.1±0.4	4.13±0.16 <sup>a</sup>
Met-suppl SPI	13.1±0.5	16.7±0.9	4.03±0.54
Casein	13.4±0.8	17.8±1.1	4.11±0.39 <sup>a</sup>
Met-suppl casein	13.2±0.3	17.1±0.5	4.99±0.16 <sup>*</sup>
PEP	13.4±0.4	18.4±0.2	4.83±0.22 <sup>b</sup>

Mice were fed 10% PEP diet for 3 days, and then fed experimental diets for 14 days ad libitum. <sup>1)</sup>Spleen weight (mg)/body weight (g) ratio. Values are means ± SD. Means with different superscript letters represent significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test. \*,  $p < 0.05$  compared with corresponding control by Student's t-test.

2.4g/kg 飼料の L-Met を添加した。脾臓細胞の分離と細胞増殖の測定は前報の通り行った<sup>7)</sup>。統計処理は、パーソナルコンピュータ用解析プログラム Instat で行った。

### 結果と考察

最初に、含硫アミノ酸の供給の観点から、脾臓 T 細胞の増殖応答に及ぼす食餌タンパク質の種類の影響を検討した。食餌タンパク質として、SPI, カゼインおよび PEP を 10% の含量で用いた。SPI とカゼイン食には、飼料中の含硫アミノ酸含有量が PEP と同じになるように L-Met を補足した飼料群も設定した。2 週間の飼育期間終了時の体重には、各群で差はなかった。しかし、体重当たりの脾臓重量 (mg 脾臓重量/g 体重) は、PEP 食に比べて SPI とカゼイン食は有意に低かった (Table 2)。カゼイン食では、L-Met の補足で体重当たりの脾臓重量は有意に上昇したが、SPI 食では変わらなかった。

次に、脾細胞を 48 時間 Con A で誘導し、<sup>[3H]</sup> チミジンの取り込みから、増殖応答性を検討した。PEP 食では、SPI とカゼイン食に比べて有意に高いチミジンの取り込みが観察された (Table 3)。カゼイン食では、L-Met の補足で、わずかに取り込みは上昇したが、有意ではなかった。SPI 食では、全く変化しなかった。

さらに、in vitro での GSH ( $5 \times 10^{-3}M$ ) と 2-ME ( $5 \times 10^{-5}M$ ) の添加効果を検討した (Table 3)。培養液への GSH あるいは 2-ME の添加で、<sup>[3H]</sup> チミジンの取り込みは著しく上昇したが、2-ME でその効果はより大きかった。GSH を添加すると、カゼインと PEP 食とに差はなくなったが、SPI 食は依然として有意に低かった。2-ME を添加すると、3 種類の食餌タンパク間に差はなくなった。2-ME を添加した場合の、チミジンの取り込みの上昇率を求めてみると、当然のことながら PEP に比べて SPI とカゼインでは有意に大きかった (Table 4)。

次に、グルタチオン合成の阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン (BSO) の効果を検討した。 $10^{-4}M$  の BSO を培養液に添加すると、いずれの飼料群でも著しく阻害した。しかし、阻害率は、SPI で最も大きく、カゼイン、PEP 食の順になった。SPI 食では、L-Met の補足で阻害率は有意に低下した。 $2 \times 10^{-5}M$  の BSO を添加した場合には、SPI 食のみで有意な阻害が観察された。

培養液に GSH あるいは 2-ME の添加すると、T 細胞中のグルタチオンレベルは上昇する<sup>7)</sup>。又、BSO を添加すると T 細胞のグルタチオンは低下し、種々の刺激で誘導される増殖反応は低下する<sup>8)</sup>。これら

**Table 3.** Effects of dietary treatment on the proliferation of splenocytes

Dietary group	No addition	$5 \times 10^{-3}M$ GSH	$5 \times 10^{-5}M$ 2-ME
		dpm $\times 10^{-3}$	
SPI	10.13 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	78.68 $\pm$ 28.41 <sup>a</sup>	216.52 $\pm$ 41.91
Met-suppl SPI	10.26 $\pm$ 0.99	94.18 $\pm$ 10.00	229.86 $\pm$ 40.39
Casein	10.80 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>	107.13 $\pm$ 27.76 <sup>a,b</sup>	241.54 $\pm$ 39.46
Met-suppl casein	14.98 $\pm$ 1.13	125.80 $\pm$ 13.52	244.66 $\pm$ 49.27
PEP	20.48 $\pm$ 3.57 <sup>b</sup>	153.64 $\pm$ 31.84 <sup>b</sup>	256.68 $\pm$ 29.80

Means with different superscript letters represent significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test.

**Table 4.** Augmentation of Con A-induced proliferation of splenocytes by GSH and 2-ME

Dietary group	$5 \times 10^{-3}$ M GSH $5 \times 10^{-5}$ M 2-ME	
	% change	
SPI	632 ± 94	2131 ± 327 <sup>a</sup>
Met-suppl SPI	772 ± 53	2234 ± 254
Casein	864 ± 234	2284 ± 461 <sup>a</sup>
Met-suppl Casein	793 ± 165	1639 ± 353
PEP	582 ± 93	1286 ± 290 <sup>b</sup>

Results are calculated as the percent increases above with medium alone. Means with different superscript letters represent significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test.

**Table 5.** Inhibition of Con A-induced proliferation of splenocytes by BSO

Dietary group	$2 \times 10^{-5}$ M $10^{-4}$ M	
	Inhibition (%)	
SPI	39.0 ± 18.9	93.4 ± 1.18 <sup>a</sup>
Met-suppl SPI	35.3 ± 7.0	86.7 ± 2.45 <sup>*</sup>
Casein	0	85.0 ± 2.80 <sup>b</sup>
Met-suppl Casein	0	80.0 ± 2.82
PEP	5.5 ± 1.9	73.6 ± 1.41 <sup>c</sup>

Means with different superscript letters represent significant differences ( $P < 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test. \*,  $P < 0.05$  compared with corresponding control by Student's t-test.

の事実から、グルタチオンはT細胞の増殖応答に必須であることが示唆されている。今回、SPIとカゼイン、特にSPIでは、PEPに比べて増殖反応が低かった。又、2-MEによる上昇率とBSOの阻害率も大きかった。これらの結果は、PEPに比べてSPIとカゼイン食では、T細胞中のグルタチオンレベルが低いことを反映していると考えられる。成長から見ると飼料タンパク質の影響はなかった。しかし、体重当たりの脾臓重量も、SPIとカゼイン食では低く、脾臓とリンパ球の機能を維持する上では、含硫アミノ酸の供給は不足していると推定される。又、増殖応答に関して、Metの補足効果は明確に認められなかった。これに関連して、Radix等も、16% SPI飼料に0.6%のDL-Metを補足しても、マウス脾細胞のCon Aに対する増殖反応は変わらなかったと報告している<sup>9)</sup>。L-Metの補足は、グルタチオン合成の律速となるシステイン、シスチンの供給に関して、利用効率が悪い可能性は否定できない。しかし、他の必須アミノ酸の摂取バランスの関与も考えられ、今後の課題である。

文 献

- 1) Furukawa, T., S. N. Meydani and J. B. Blumberg (1987) Mech. Aging Dev. 38 : 107-117
- 2) Makinodan, T. and J. W. Albright (1979) Mech. Aging Dev. 11 : 1-8
- 3) Heidrick, M. L., J. W. Albright and T. Makinodan (1980) Mech. Aging Dev. 13 : 367-378
- 4) Franklin, R. A., Y. Mingli, S. Arkins and K. W. Kelley (1990) J. nutr. 120 : 1710-1717
- 5) Bounous, G., N. Shenouda, P. A. L. Kongshavn and D. G. Osmond (1985) J. Nutr. 115 : 1409-1417
- 6) 細川 優, 坪山宣代, 吉原富子, 増山律子, 戸谷誠之 (1996) 微量元素研究 13 : 151-156
- 7) Zmuda, J. and B. Friedenson (1983) J. Immunol. 130 : 362-364
- 8) Suthanthiran, M., M. E. Anderson, V. K. Sharma and A. Meister (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 3343-3347
- 9) Radix, P. M., C. S. Walters and J. A. Adkins (1983) J. Nutr. 113 : 159-164