[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.69, No.9, pp.1171~1174, 1995]

イワシ由来短鎖ペプチドの食品への 免疫学的適用性

関 英治, 箴島克裕, 松藤 寛*, 松井利郎*, 箴島 豊*
(仙味エキス株式会社開発部, *九州大学農学部食糧化学工学科)

平成 7 年 2 月 16 日 受 理

Immunologically Applicability for Foods of Short Chain Peptides Derived from Sardines

Eiji SEKI, Katsuhiko OSAJIMA, Hiroshi MATSUFUJI,*
Toshiro MATSUI,* and Yutaka OSAJIMA,*

Research Laboratories, Senmi Ekisu Co., 779-2 Noda, Hirano-cho, Ozu-shi 795

**Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1
Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812*

Short chain peptides with the average chain length of 2.67 prepared from sardine protein have reductive effects on blood pressure, and are expected to be a physiologically functional foodstuff. The short chain peptides were found to be negative in the active systemic anaphylaxis (ASA) test in guinea pigs sensitized by oral administrations of the short chain peptides. Negative results were also obtained in the homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, which was done against sera from guinea pigs sensitized by oral administration of the short chain peptides. The short chain peptides have a potent angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity, this enzyme catalyses the activation of angiotensin II and inactivation of bradykinin. The bradykinin is able to stimulate macrophages, to enhance lymphocyte migration, and to increase secretion of lymphokines. The short chain peptides favor bradykinin activity, which showed concentrated pigment coloration in the PCA test by subcutaneous sensitization. These results suggest that the short chain peptides have no antigenicity by oral administration, and are usable in foods.

(Received February 16, 1995)

結 言

免疫機能のアンバランスによりアレルギーは生ずる。頻度の高い食品アレルギーの原因食物、卵白、牛乳および大豆を子供が摂取すると、体内消化酵素の活性低下、未発達な腸管免疫機構とも合わせて、発症する場合が多い。その食品工学的予防については、プロテアーゼの作用により、アレルゲンの抗体産生能を低くすること⁽¹⁻³⁾が行われている。高分子量 5000 以上の物質には抗原性があるが、経口投与では、体内消化酵素に

よる分解により、ほとんど、その免疫原性が消失すると推定される。

著者らは、イワシの酵素分解物に血圧降下作用を認め、機能性食品素材としての利用を進めている。イワシ由来ペプチドは、ジ、トリペプチドを主成分とする短鎖ペプチドであり、皮下免疫でも、その抗原性はないと推定される。さらに、本ペプチドが、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) を阻害し、ブラジキニンの不活性化を抑制するがゆえに、エフェクター作用の促進が考えられる。本報では、モルモットを用いて無免

疫原性の検証と若干の免疫反応の賦活性化について論じた。IgE 抗体の産生が行われず、アナフィラキシー反応を誘発しないことを確認し、アジュバンドにより IgG 抗体産生を促進させ、能動性全身性アナフィラキシー反応と同種受身皮膚アナフィラキシー反応を行なった。

実験方法

1. 試料 イワシ短鎖ペプチドは、既報⁽⁴⁾の方法に従い調製した。ジ・トリペプチドを 33:67 の比で含有する平均分子量 315, 平均鎖長 2.67 のペプチドであり、4 残基以上は、ほとんど認められない。易水溶性の白色粉末である。対照物質は、牛血清アルブミン(BSA, Sigma 社製)と、日本薬局方生理食塩液(大塚製薬製)を用いた。免疫補助剤として、フロイント完全アジュバンド(FCA, ヤトロン製)を、色素は、エバンスブルー(メルク社製)を使用した。

2. 使用動物 雄性 Harrley 系モルモット(日本エスエルシー社)を購入し、能動性全身性アナフィラキシー反応(ASA 反応)は、5 週齢(体重 312~389 g)、同種受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA 反応)は、7 週齢(体重 470~506 g)を、1 群 6 匹として用いた。動物は、予備飼育期間(1~2 週間)および実験期間を通じて恒温恒湿(24±2°C, 55±10%)の条件下で飼育し、飼育用飼料(RC 4, オリエンタル酵母工業製)および次亜塩素酸ナトリウム添加後紫外線照射により殺菌した自家揚飲料水を自由摂取させた。

3. 感作 皮下投与の感作は、短鎖ペプチドおよび BSA の投与量を、ともに、動物 1 匹当たり 1 mg とした。生理食塩水 0.25 ml に懸濁あるいは溶解後、等容量の FCA を加え、注射筒で混合調製した乳化液を、背部皮下に注射した。15 日後、二次感作を行なった。経口投与の感作は、短鎖ペプチドの投与量を動物 1 kg 当たり 10 および 100 mg とした。その生理食塩溶液 2.5 ml を、週 5 日間連続で 3 週間、計 15 回、経口投与し、感作を行った。

4. 惹起抗原の調製 ASA 反応は、惹起抗原として、短鎖ペプチドを生理食塩液にて、40 および 400 mg/ml 溶液とし、BSA は、40 mg/ml 溶液を調製した。PCA 試験は、短鎖ペプチドの 40 および 400 mg/ml 溶液および BSA の 40 mg/ml 溶液に、それぞれ、等容量の 2%エバンスブルー生理食塩液を混合し、調製した。

5. ASA 反応 短鎖ペプチドおよび BSA の各投与

量で、皮下投与の群は最終感作 16 日後に、また、経口投与の群は、最終感作 12 日後に、各惹起抗原に対応する感作動物の背中足静脈に動物 1 匹当たり 0.25 ml を注射した。これより、2 時間、江田式⁽⁵⁾の判定基準に従い、アナフィラキシー反応を観察した。

判定基準

1) 搔鼻	5) くしゃみ	9) 虚脱
2) 立毛	6) 嘔気	10) 排便
3) 衰弱	7) 喘鳴	11) 排尿
4) 呼吸困難	8) 痙攣	12) 死亡

全般的評価

- : いずれの症状も示さないもの
 + : 上記の症状が 1~3 個のもの
 ++ : 上記の症状が 4~7 個のもの
 +++ : 上記の症状が 8 個以上または死亡したもの

6. PCA 反応 皮下感作群は最終感作 14 日後、経口感作は最終感作 10 日後、感作動物の心臓より採血し分離した各血清を用いて PCA 反応を実施した。各血清を生理食塩液にて、5, 15, 45, 135, 405, 1215, 3645 および 10935 倍に希釈し、無処置モルモットの背部左右 2 列の皮内に 0.1 ml 投与して受身感作を行った。投与 24 時間後に、色素を含む惹起抗原調製液を動物 1 匹当たり、0.25 ml、背中足静脈より注射して、PCA 反応を惹起した。生理食塩液および BSA 感作群も同様に行った。惹起抗原投与約 30 分後に、皮膚の反応局所内面に生じた色素斑の直径および短径を測定し、2 径の平均が 5 mm 以上の色素斑を示した場合を陽性とし、その最大希釈倍数を抗体価とした。

実験結果

1. 能動性全身性アナフィラキシー反応(ASA 反応)

Table I に ASA 反応の結果を示した。短鎖ペプチドおよび生食食塩液を皮下に感作した群ならびに、短鎖ペプチドを経口で感作した群は、惹起抗原投与後、アナフィラキシー反応はみられず死亡例も認められなかった。対照の BSA を皮下に感作した群は、惹起抗原投与後、搔鼻、虚脱、嘔気、衰弱、喘鳴、呼吸困難、痙攣などの典型的なアナフィラキシー・ショック症状が認められ、30 分以内に全例が死亡した。

2. 同種受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA 反応)

Table II に PCA 反応の結果を示した。生理食塩液を

Table I. Active systemic anaphylaxis in guinea pigs immunized with the short chain peptides

Immunization Antigen (dose, time, routes)	Challenge Antigen	dose (i.v.) mg/animal	No. of animals	Anaphylactic signs				Mortality No. of died
				No. of	—	+	++	
Saline + FCA ^{a)} (0.25 ml/animal, 2 times, s.c. ^{b)})	Saline	(0.25 ml)	6	6	0	0	0	0
BSA + FCA (1 mg/animal, 2 times, s.c.)	BSA	10	5	0	0	0	5	5
The short chain peptides + FCA (1 ml/animal, 2 times, s.c.)	The short chain peptides	10	6	6	0	0	0	0
The short chain peptides (10 mg/kg, 15 times, p. o. ^{c)})	The short chain peptides	10	6	6	0	0	0	0
The short chain peptides (100 mg/kg, 15 times, p. o.)	The short chain peptides	100	6	6	0	0	0	0

^{a)} Solutions are diluted with an equal volume of FCA. FCA, freund's complete adjuvant ; BSA, bovine serum albumin.

^{b)} sub cutaneoue

^{c)} per os

Table II. Passive cutaneous anaphylaxis Induced by the short chain peptides

Immunization	Challenge			Diameter (5.0 mm<)									No. of died
Antigen (dose, time, routes)	Antigen	dose(i.v.) mg/animal	No. of animals	1/Dilution of anti-sera									
				×5	×15	×45	×135	×405	×1215	×3645	×10935		
Saline+FCA ^{a)} (0.25 ml/animal, 2 times. s. c ^{b)})	Saline	(0.25 ml)	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	— ^{d)}	—	—	0	
BSA+FCA (1 mg/animal, 2 times, s. c.)	BSA	10	12	1/6	1/6	1/6	6/6	6/6	6/6	4/6	4/6	0 5	
The short chain peptides+FCA (1 mg/animal, 2 times, s. c.)	The short chain peptides	10	6	3/6	3/6	2/6	2/6	0/6	—	—	—	0	
The short chain peptides (10 mg/kg, 15 times, p. o. ^{c)})	The short chain peptides	10	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	—	—	—	0	
The short chain peptides (100 mg/kg, 15 times, p. o.)	The short chain peptides	100	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	—	—	—	0	

^{a)} Solutions are diluted with an equal volume of FCA. FCA, freund's complete adjuvant ; BSA, bovine serum albumin.

^{b)} sub cutaneous

^{c)} per os

^{d)} not examined.

皮下に感作した群および短鎖ペプチドを経口で感作した群は、それぞれ全例に色素斑は認められず陰性であった。一方、短鎖ペプチドを皮下に感作した群は、3/6例において色素斑が認められ、その抗体価は、15~135であった。また、BSAを皮下に感作した群では、5/12例がアナフィラキシー反応を呈して死亡し、7/12例において、抗血清に依存した色素斑が認められ、その抗体価は、1215~10935以上であった。

考 察

ジペプチドおよびトリペプチドは、ほとんど免疫原性がないと考えられている。イワシ由来短鎖ペプチド

が経口投与での ASA および PCA 反応、皮下投与での ASA 反応において、BSA で観察されたアナフィラキシー反応が認められなかったことは、これを支持した。皮下投与で FCA をアジュバントとして PCA 反応を行なったところ、3/6例に陽性反応が認められた。惹起抗原投与後 24 時間で IgG 抗体が産生していると考えられ、ハプテンとして作用し、III型アレルギーが発現した可能性はある。ウシ、ヒトカゼインのトリペプチドには、貪食細胞の活性化作用のあること⁽⁶⁾が認められており、IgG 抗体の産生の促進を行なうマイトジェインとしての作用も考えられる。2 次免疫後の血清で、IgE 抗体産生を観察したところ、陰性であった。よって、FCA をア

ジュバントとすると、一層、IgE 抗体は、抑制されることから、IgG 抗体の産生を推定した。IgG 抗体のエフェクター作用には、補体系の活性化、貪食細胞の亢進がある。イワシ由来短鎖ペプチドに ACE 阻害作用があり、血管内皮細胞の間隙を広げる作用があるブラジキニンの不活性化の抑制を行なうことにより、免疫反応を促進する効果が推定される。その血管透過性が、リンパ液の分泌の促進、リンパ球の遊走を増大させ、その貪食細胞の活性化を行なう。PCA 反応の血管透過性の亢進は、一過性の反応であり、本ペプチドの色素斑が BSA の場合と比較し、濃色であったことより、上記の作用が関与しているものと思われる。ペプチドの免疫応答機構については、タンパク質の抗原の場合と異なるのか、どの程度が応答するのか不明な点が多い。ASA 反応の皮下免疫で、アナフィラキシー反応が認められないことは、経口で、仮に IgA 抗体などの防御機構を通過しても免疫原性のないことを示し、食品への適用性が認められた。

要 約

イワシ由来短鎖ペプチドの抗原性についてモルモットを用いて検討し、以下の結果を得た。

イワシ由来短鎖ペプチドを経口投与により単独に感

作した場合、能動性全身性アナフィラキシー反応、同種受身皮膚アナフィラキシー反応ともに陰性であったことより、経口感作では、抗体産生のないことが示された。また、短鎖ペプチドを免疫補助剤である FCA と共に、モルモットの皮下に感作した場合、能動性全身性アナフィラキシー反応は陰性であったが、同種受身皮膚アナフィラキシー反応においては、抗体価 15~135 の陽性反応が認められ、FCA をアジュバントとする皮下感作では、特異的な抗体が産生されるが、アナフィラキシー反応を誘発するものではないことが示され、食品への適用性が認められた。

- (1) A. Enomoto, D.H. Shon, Y. Aoki, K. Yamauchi and S. Kaminogawa: *Mol. Immunol.*, **27**, 581—586 (1990).
- (2) D.H. Shon, A. Enomoto, K. Yamauchi and S. Kaminogawa: *Eur. J. Immunol.*, **21**, 1475—1480 ((1991)).
- (3) S. Kaminogawa and A. Enomoto: *Comments Agr. and Food Chemistry*, **2**, 321—337 (1992).
- (4) 関 英治, 箆島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箆島 豊: 日食工誌, **40**, 783—791 (1993).
- (5) 江田昭英, 森 裕志, 稲垣直樹, 鶴岡伸夫, 加藤 譲: 基礎と臨床, **16**, 7223—7228 (1982).
- (6) D.M. Samour, F. Floch, and P. Jolles: *J. Dairy Res.*, **56**, 357—362 (1989).