

臍帯血を用いた大豆有効成分による
自然免疫制御機能の解析

大阪市立大学大学院 医学研究科発達小児医学

徳原 大介

研究の背景および目的

大豆は小児の重要な栄養源である。新生児・乳児期には母乳や人工ミルクの代替ミルクとして用いられるだけでなく、離乳食にも主要な食材の一つとして用いられ、豊富なタンパク源としての特性から大豆は乳幼児の身体的な発育に大きな役割を果たすと考えられる^{1,2)}。一方、大豆に含まれるイソフラボンとサポニンはいずれもエストロゲン様の作用や抗癌作用など多様な生理的活性を示すことが報告され³⁻⁵⁾、腸炎抑制などの免疫抑制効果も動物・細胞実験において報告されている⁶⁻¹⁰⁾。大豆ミルクを飲む乳児ではイソフラボン（ゲニステインやダイゼイン）やサポニンの摂取量が成人と比較して顕著に高いため¹¹⁻¹³⁾、乳幼児期にはそれら大豆成分（イソフラボンやサポニン）による生理作用を成人よりも強く受けると考えられるが、それら大豆成分が乳幼児の成長発達に果たす具体的な役割については情報が無い。

乳幼児期は身体的発育のみならず、神経・免疫・内分泌の面でも劇的な変化・成長を遂げる時期である。中でも、新生児期・乳児期は年長児や成人と比較して免疫システムが幼若であり、そのため感染症に罹患しやすく、また重篤化しやすいと考えられてきた¹⁴⁾。その免疫システムにおける外的刺激に対するセンサーの役割を果たすのが Toll 様受容体（TLR）を介した自然免疫であり、これまで我々は、新生児・乳児期の TLR を中心とした自然免疫機構に関して、母体や児を傷つけることなく分娩後の胎盤から非侵襲的に採取できる臍帯血を新生児・乳児の代替血液として用いた研究手法を用いて研究を進め、新生児・乳児の TLR を介した自然免疫システムの幼若性を明らかにしてきた¹⁵⁻¹⁷⁾。本研究では、我々の臍帯血解析技術を用い、大豆由来のイソフラボンやサポニンが乳児期の自然免疫機構に与える作用について焦点をおいて探索を行った。

実験方法

<対象と血液採取>

健康な母体で帝王切開による正期出産例からヘパリン加臍帯血（30～50mL）を採取した（n=6）。対照群として、健康成人からヘパリン加末梢血液（約 50mL）を採取した（n=6）。単核球は血液採取後 2 時間以内に、臍帯血または成人末梢血から分離した¹⁵⁻¹⁷⁾。本実験プロトコールは、大阪市立大学大学院医学研究科における倫理委員会の承認を得て、対象者から書面によるインフォームドコンセントを得て行われた（承認番号 3598 および 4345）。

<単核球分離>

単核球はプロトコールに従って以下のように血液から分離した¹⁵⁻¹⁷⁾。採取した臍帯血および成人末梢血は PBS で希釈後、リンパ球分離液（126-04871; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）に静かに重層し、遠心分離（400g、室温、40分）した後、単核球を含む中間層を回収した。単核球は PBS で 2 回洗浄した後、細胞数を計測し、 1×10^7 個あたり磁気分離溶液（0.5% BSA, 2mM EDTA, PBS）を 90 μ L 加え懸濁した。さらに、CD14 マイクロビーズ（130-050-201; Miltenyi Biotec Inc., Auburn, California）を 10 μ L を加え懸濁し、4 \square 、15分静置した。その後、細胞液に磁気分離液を 10mL 加え、遠心分離（300g、10分、4 \square ）した後、上清を捨て磁気分離液で懸濁した。LS カラム（130-042-401; Miltenyi Biotec Inc., Auburn, California）を MACS 細胞分離装置（MACS separator; 130-092-168; Miltenyi Biotec Inc.）にセットし磁気分離液で洗浄し

た後、CD14マイクロビーズで標識された細胞懸濁液をLSカラムにのせ、ポジティブセクションによりCD14マイクロビーズで標識された細胞を回収し、RPMI培地（RPMI 1640, 10% ウシ血清, 1% ペニシリン/ストレプトマイシン, 1%ピルビン酸, 0.1% 2-メルカプトエタノール）に懸濁した¹⁵⁻¹⁷。

<樹状細胞分離>

臍帯血および成人末梢血から単核球を分離後、blood DC isolation kit (130-091-379, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてプロトコールに従って DC を以下のように分離した¹⁷。1 x 10⁷個あたり磁気分離溶液（0.5% BSA, 2mM EDTA, PBS）を 90μL 加え懸濁した。単核球に CD19 および CD14 に対する特異抗体を結合したマイクロビーズを加えてインキュベーション後、MACS 細胞分離装置を用いて CD19 陽性細胞（B 細胞）と CD14 陽性細胞（単球）を取り除き、樹状細胞の表面分子である CD303、CD1c、CD141 に対する特異抗体を結合したマイクロビーズを加え、MACS 細胞分離装置を用いて CD303、CD1c、あるいは CD141 陽性細胞、すなわち樹状細胞を回収し、RPMI 培地に懸濁した。

<単球および樹状細胞の刺激>

臍帯血または成人血から分離した単球を 1 ウェルあたり 1 x 10⁵ 個/100 μL の濃度で 96 ウェルプレートにのせ、TLR4 刺激薬としてリポポリサッカライド（LPS; 100ng/ml; Escherichia coli serotype O111 B4 由来 ; Sigma）を加え、一部のウェルには LPS とともに大豆イソフラボンとしてゲニステイン（100 μM, LKT LABS, Product ID; G1652）、あるいは大豆サポニン（Soyasaponin I: 100 μM, 常盤植物化学 Code No. P2505）を加え、あるいは LPS の代わりにゲニステインあるいはサポニンを加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターにて 6 時間培養を行なった。LPS、ゲニステイン、サポニンの対照群として PBS を用いた。DC は 1 ウェルあたり 5 x 10⁴/100 μL 個の濃度に調整して加え、TLR4 作動薬として LPS、ゲニステイン、サポニン、PBS を単球と同様に加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターにて 6 時間培養を行なった。

<サイトカイン測定>

6 時間の細胞培養後、プレートを遠心し、上清を回収し、Human inflammatory cytokine cytometric bead assay kit (BD Pharminogen, catalog No: 551811) を用いて上清中のサイトカイン（IL-8, IL-6, TNF-α, IL-10, IL-1β）をプロトコールに従って以下のとおりに測定した¹⁵⁻¹⁷。培養上清に抗体ビーズと PE 標識抗体を加え、室温で 3 時間静置した後、洗浄を行い、懸濁液をフローサイトメトリー（LSR II, BD Biosciences）で測定し、専用解析用ソフト（FCAP ArrayTM v3.0）で検量線を作成し、検体中のサイトカイン濃度の定量解析を行った。

<細胞表面分子の発現解析>

6 時間の細胞培養後、プレートを遠心し、上清をサイトカイン測定用に取り除いた。残った細胞塊を回収し、PBS で洗浄後、FITC 標識抗ヒト HLA-DP,DQ,DR 抗体（BD Pharminogen, catalog No: 555558）、PE 標識抗ヒト CD11b 抗体（BD Pharminogen, catalog No: 555388）、APC 標識抗ヒト CD11c 抗体（BD Pharminogen, catalog No:559877）あるいは PE 標識抗ヒト CD80 抗体（BD Pharminogen, catalog No:555388）、APC 標識抗ヒト CD86 抗体（BD Pharminogen, catalog No:555660）を

加え、氷上で30分間静置した後、洗浄を行い、細胞懸濁液をフローサイトメトリー (LSR II, BD Biosciences) で解析した。各細胞表面分子の平均蛍光強度 (MFI; Mean fluorescent intensity) を発現量として測定した¹⁵⁾。

<統計解析>

臍帯血由来細胞と成人血由来細胞の2群間におけるサイトカイン濃度の比較ならびに細胞表面分子の発現 (MFI) の比較、および各2刺激群 (例: LPS 投与群と LPS + サポニン投与群) 間のサイトカイン濃度ならびに細胞表面分子の発現 (MFI) の比較は、Mann-whitney U 検定を用いて分析し、P 値が 0.05 未満を統計学的に有意と判断した。

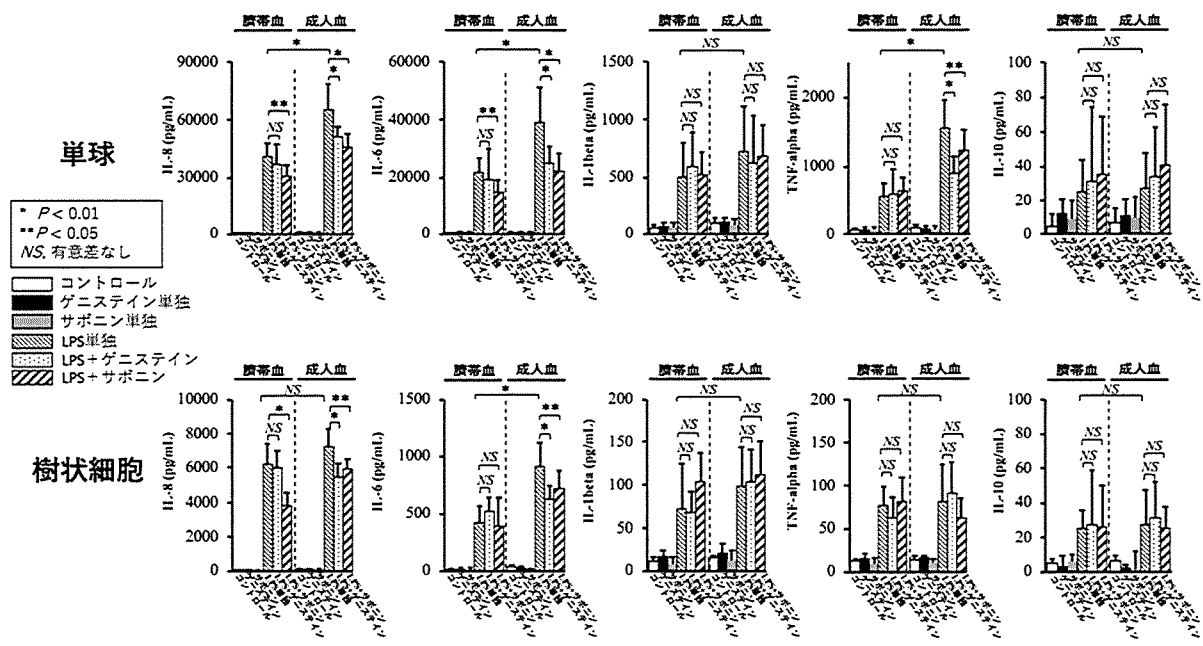
実験結果

結果 1 : 単球および樹状細胞のサイトカイン産生におけるイソフラボン (ゲニステイン) ならびにサポニンの作用

図 1 に示すように、LPS の単独刺激によって、臍帯血群と成人血群の両群の単球に IL-8、IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカインの顕著な産生が誘導され、成人血由来単球では臍帯血由来単球よりも炎症性サイトカイン濃度が有意に高値であった。イソフラボンあるいはサポニン単独投与群では、臍帯血群と成人血群の両群の単球に有意なサイトカイン産生は認めなかった。LPS とイソフラボンの両者を投与した場合、成人血由来単球における炎症性サイトカイン (IL-8、IL-6、TNF- α) の産生は LPS 単独投与群よりも有意に低下したが、IL-1 β ならびに抑制性サイトカインである IL-10 は有意な変化はなかった。また、LPS とイソフラボン併用投与による臍帯血由来単球における炎症性サイトカインの産生は LPS 単独投与群と比較して有意な差を認めなかった。一方、LPS とサポニンの両者を投与した場合、成人血由来単球における炎症性サイトカイン (IL-8、IL-6、TNF- α) の産生は LPS 単独投与群よりも有意に低下し、臍帯血由来単球では IL-8 と IL-6 の有意な低下が認められた。

樹状細胞に関しては、LPS の単独刺激によって臍帯血群と成人血群の両群の樹状細胞に IL-8 と IL-6 の顕著な産生が誘導され、成人血由来樹状細胞では臍帯血由来樹状細胞よりも IL-6 濃度が有意に高値を示し、IL-8、TNF- α 、IL-10、IL-1 β に関しては有意な差を認めなかった。イソフラボンあるいはサポニン単独投与群では、臍帯血群と成人血群の両群の樹状細胞に有意なサイトカイン産生は認めなかった。LPS とイソフラボンの両者を投与した場合、成人血由来樹状細胞における炎症性サイトカイン (IL-8、IL-6) の産生は LPS 単独投与群よりも有意に低下したが、TNF- α に関しては差はなかった。一方、臍帯血由来樹状細胞における炎症性サイトカインの産生は LPS 単独投与群と比較して有意な差がみられなかった。一方、LPS とサポニンの両者を投与した場合、成人血由来樹状細胞における炎症性サイトカイン (IL-8、IL-6) の産生は LPS 単独投与群よりも有意に低下し、臍帯血由来樹状細胞では IL-8 の有意な低下が認められたが、IL-6・IL-1 β ・TNF- α ならびに抑制性サイトカインである IL-10 に関して有意な変化はなかった。

図 1. 単球・樹状細胞におけるサイトカイン産生

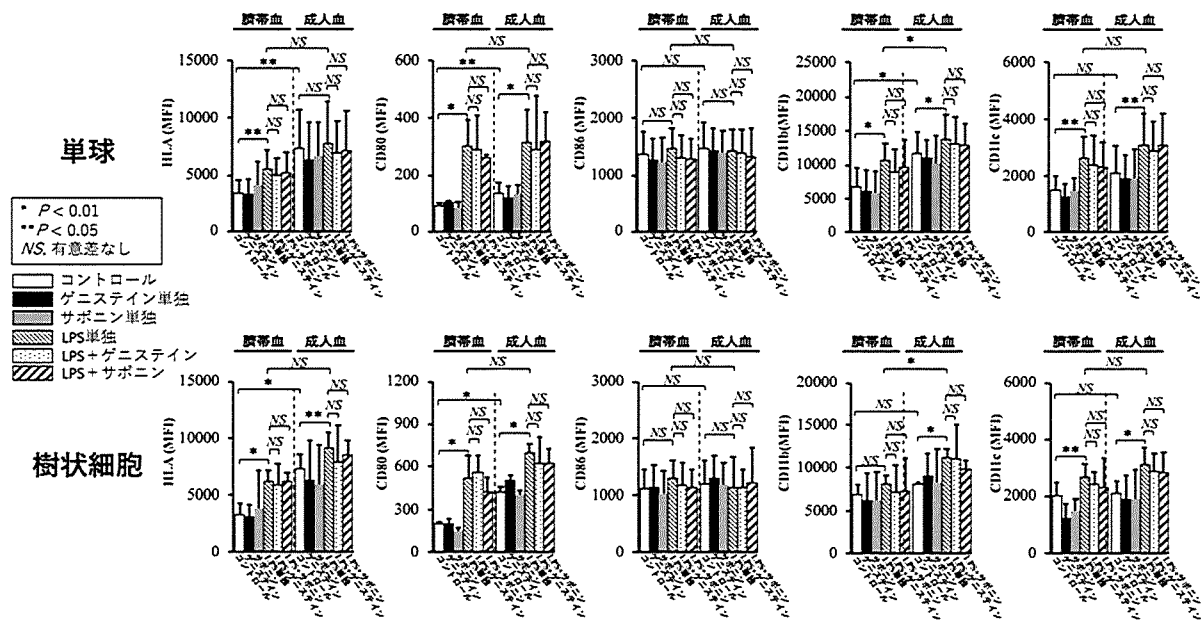


結果 2 : 単球および樹状細胞の表面分子の発現におけるイソフラボンならびにサポニンの作用

図 2 に示すように、LPS の単独刺激によって、臍帯血由来単球では HLA、CD80、CD11b、CD11c の発現の増強がみられ、成人血由来単球では CD80、CD11b、CD11c の発現の増強がみられた。イソフラボンあるいはサポニン単独投与群では、臍帯血群と成人血群の両群の単球の表面分子発現に有意な変化を認めなかった。LPS とイソフラボンの両者を投与した場合、成人血由来単球ならびに臍帯血由来単球における表面分子の発現は LPS 単独投与群と比較して変化はなかった。同様に、LPS とサポニンの両者を投与した場合、成人血由来単球ならびに臍帯血由来単球における表面分子の発現は LPS 単独投与群と比較して変化はなかった。

樹状細胞に関しては、LPS の単独刺激によって、臍帯血由来樹状細胞では HLA、CD80、CD11c の発現の増強がみられ、成人血由来樹状細胞では HLA、CD80、CD11b、CD11c の発現の増強がみられた。イソフラボンあるいはサポニン単独投与群では、臍帯血群と成人血群の両群の樹状細胞の表面分子発現に有意な変化を認めなかった。LPS とイソフラボンの両者を投与した場合、成人血由来樹状細胞ならびに臍帯血由来樹状細胞における表面分子の発現は LPS 単独投与群と比較して変化はなかった。同様に、LPS とサポニンの両者を投与した場合、成人血由来樹状細胞ならびに臍帯血由来樹状細胞における表面分子の発現は LPS 単独投与群と比較して変化を認めなかった。

図 2. 単球・樹状細胞における表面分子発現



考察

今回の我々の検討から、大豆イソフラボン（ゲニステイン）と大豆サポニンともに臍帯血あるいは成人血由来の単球・樹状細胞の自然免疫応答、特に炎症性サイトカインの産生を抑制する機能を持つことが示唆された。LPSはTLR4を介し自然免疫を賦活化し、炎症を誘導することが知られているが、大豆由来のイソフラボンとサポニンはLPS誘導性のサイトカイン産生の抑制にはたらく、イソフラボン・サポニンともに臍帯血由来の免疫細胞よりは成人血由来の免疫細胞の活性化を強く抑制することが示された。臍帯血由来免疫細胞における自然免疫機構は成人のそれよりも本来幼若で低下しているとする研究が多く認められ、我々も同様の知見を報告している¹⁷⁾。今回の結果から、自然免疫応答が成人よりも抑制されている新生児・乳児では、イソフラボン・サポニンの免疫制御作用は限定的であることが示唆される。

イソフラボンとサポニンのそれぞれのLPSに対する免疫抑制作用に関して具体的にみると、成人血由来単球においてはイソフラボン・サポニンともにLPS刺激によるIL-8、IL-6、TNF- α の産生誘導を抑制したが、臍帯血由来単球においては、イソフラボンが有意な抑制効果を認めなかったのに対して、サポニンはLPS刺激によるIL-8とIL-6の産生誘導を有意に抑制している。表面分子発現に関しては、単球に対するイソフラボンとサポニンの免疫制御は確認できなかった。樹状細胞においては、イソフラボンによるLPS誘導性免疫応答（サイトカイン産生・表面分子発現）の抑制は成人血群においてのみ認められ、一方、サポニンは臍帯血由来樹状細胞においてもLPS誘導性免疫応答の抑制を認めた。これらのことから、イソフラボンとサポニンを比較した場合、サポニンが新生児・乳児期の炎症性サイトカイン誘導に関わる自然免疫応答の制御に強く働く可能性が示唆された。

本研究成果によって、乳幼児期の大豆の摂取は、重要なタンパク源としてだけでなく、サポニンを介した免疫抑制効果をもたらす可能性が示唆される。成人と乳児に対するサポニンの免疫抑制効果は本研究では成人のほうが高度であったが、大豆乳や離乳食として大豆を摂取する量が高い乳児では、相対的にサポニンの摂取量が成人よりも多くなり、高い免疫抑制効果を受けることも考えられる。LPSは大腸菌

の構成成分であり、大腸菌は乳児期の尿路感染症や髄膜炎などの重要な病原微生物であるが、本研究の知見は乳幼児期の感染症による過剰な炎症が、大豆を介して摂取したサポニンによって軽減しうる可能性を示しており、乳幼児の食物成分としての大豆の免疫学的有効性を示唆しているのではないかと考えている。また、乳幼児期の頻度の高い免疫疾患として食物アレルギーが挙げられるが、大豆の摂取を介したサポニンの免疫抑制効果が乳幼児の食物アレルギーの予防につながる可能性も期待され、今後の臨床への応答も見据えたさらなる基礎研究の展開を検討している。

要約

乳幼児期の重要な栄養源である大豆成分（イソフラボンとサポニン）の自然免疫制御機能について、新生児・乳児の血液を反映する臍帯血を用いて解析した。その結果、臍帯血由来単球・樹状細胞におけるLPS誘導性免疫応答はイソフラボンの影響を受けず、サポニンによって抑制されることが示された。本知見はヒトの細胞を用いた研究により得られたものであり、動物実験よりもヒトへの応用性の可能性が高く、乳幼児期の感染症による過剰な炎症の抑制や食物アレルギーの予防など、大豆摂取によるサポニンを介した疾患予防効果への展開が期待される。

謝辞

本研究に多大なご支援をいただきましたタカノ農芸化学研究助成財団ならびに関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

*本研究における大豆の効果以外の結果部分は先行して論文化されました¹⁵⁾。

文献

1. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Soy protein-based formulas: recommendations for use in infant feeding. *Pediatrics*. 1998;101(1 Pt 1):148-153.
2. Quak SH, Tan SP. Use of soy-protein formulas and soyfood for feeding infants and children in Asia. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(6 Suppl):1444S-1446S. doi:10.1093/ajcn/68.6.1444S
3. Rao AV, Sung MK. Saponins as anticarcinogens. *J Nutr*. 1995;125(3 Suppl):717S-724S. doi:10.1093/jn/125.3_Suppl.717S
4. Merritt RJ, Jenks BH. Safety of soy-based infant formulas containing isoflavones: the clinical evidence. *J Nutr*. 2004;134(5):1220S-1224S. doi:10.1093/jn/134.5.1220S
5. Wei J, Bhatt S, Chang LM, Sampson HA, Masilamani M. Isoflavones, genistein and daidzein, regulate mucosal immune response by suppressing dendritic cell function. *PLoS One*. 2012;7(10):e47979. doi:10.1371/journal.pone.0047979
6. Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*. 2003;52(8):341-346. doi:10.1007/s00011-003-1182-8
7. Fußbroich D, Schubert R, Schneider P, Zielen S, Beermann C. Impact of soyasaponin I on TLR2 and TLR4 induced inflammation in the MUTZ-3-cell model. *Food Funct*. 2015;6(3):1001-1010. doi:10.1039/c4fo01065e
8. Lee HJ, Lim SM, Ko DB, Jeong JJ, Hwang YH, Kim DH. Soyasapogenol B and Genistein Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Mice by the

- Modulation of NF- κ B-Mediated BDNF Expression. *J Agric Food Chem*. 2017;65(32):6877-6885. doi:10.1021/acs.jafc.7b02569
9. Lee IA, Park YJ, Yeo HK, Han MJ, Kim DH. Soyasaponin I attenuates TNBS-Induced colitis in mice by inhibiting NF- κ B pathway. *J Agric Food Chem*. 2010;58(20):10929-10934. doi:10.1021/jf102296y
 10. Chen J, Ullah H, Zheng Z, et al. Soyasaponins reduce inflammation by downregulating MyD88 expression and suppressing the recruitments of TLR4 and MyD88 into lipid rafts. *BMC Complement Med Ther*. 2020;20(1):167. Published 2020 Jun 3. doi:10.1186/s12906-020-2864-2
 11. Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*. 1997;350(9070):23-27. doi:10.1016/S0140-6736(96)09480-9
 12. Knight DC, Eden JA, Huang JL, Waring MA. Isoflavone content of infant foods and formulas. *J Paediatr Child Health*. 1998;34(2):135-138. doi:10.1046/j.1440-1754.1998.00181.x
 13. Fonseca ND, Villar MP, Donangelo CM, Perrone D. Isoflavones and soyasaponins in soy infant formulas in Brazil: profile and estimated consumption. *Food Chem*. 2014;143:492-498. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.126
 14. Tokuhara D. Challenges in developing mucosal vaccines and antibodies against infectious diarrhea in children. *Pediatr Int*. 2018;60(3):214-223. doi:10.1111/ped.13497
 15. Hikita N, Cho Y, Tachibana D, Hamazaki T, Koyama M, Tokuhara D. Cell surface antigens of neonatal monocytes are selectively impaired in basal expression, but hyperresponsive to lipopolysaccharide and zymosan. *J Reprod Immunol*. 2019;136:102614. doi:10.1016/j.jri.2019.102614
 16. Yanai S, Tokuhara D, Tachibana D, et al. Diabetic pregnancy activates the innate immune response through TLR5 or TLR1/2 on neonatal monocyte. *J Reprod Immunol*. 2016;117:17-23. doi:10.1016/j.jri.2016.06.007
 17. Nohmi K, Tokuhara D, Tachibana D, et al. Zymosan Induces Immune Responses Comparable with Those of Adults in Monocytes, Dendritic Cells, and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Cord Blood. *J Pediatr*. 2015;167(1):155-62.e622. doi:10.1016/j.jpeds.2015.03.035