

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏 名 蔵田 圭吾

指導教官 辻本 元

論文題目 Immunological studies on the development of novel  
immunotherapies for allergic diseases in dogs

犬のアレルギー性疾患に対する新規免疫療法の開発に関する研究

近年、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー性呼吸器疾患の増加がヒトにおいて大きな問題となっている。アレルギー性疾患の病態において、アトピー素因は非常に重要な因子として知られている。アレルギー性呼吸器疾患の患者においては、ヒョウヒダニ、植物花粉、動物上皮およびカビなどが感作抗原として頻繁に検出され、これら吸入性抗原に対する抗原特異的 IgE の過剰産生が認められる。

IgE の産生には、CD4 陽性 T 細胞（ヘルパー T 細胞、 $T_H$  細胞）が重要な役割を果たす。 $T_H$  細胞は、サイトカイン産生パターンの違いにより、 $T_{H1}$  細胞と  $T_{H2}$  細胞に分類される。 $T_{H1}$  細胞は、インターロイキン-12 (IL-12) の刺激によって分化誘導されるインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) 産生細胞である。一方、 $T_H 2$  細胞は、主に IL-4 を産生する細胞であり、IL-4 の刺激によって分化誘導される。IFN- $\gamma$  は B 細胞からの IgE の産生を抑制し、IL-4 はその産生を促進することが明らかにされており、両者のサイトカインバランスはアレルギー性疾患の病態に非常に重要であることが知られており、実際に、アレルギー性喘息やアレルギー性鼻炎の患者においては  $T_{H1}/T_{H2}$  のバランスが  $T_{H2}$  に偏位していることが報告されている。

獣医学領域においても、犬の慢性気管支炎およびアレルギー性鼻炎は、ヒトのアレルギー性呼吸器疾患と同様に、その病態に吸入性抗原に対するアレルギー性反応が関与していることが予想されている。しかし、これらの疾患においては抗原特異的 IgE 検査や皮内反応などのアレルギー検査を用いた研究が行われていないため、吸入性抗原に対するアレルギー性反応の関与は不明である。

これまで、ヒトおよび犬のアレルギー性疾患に対して、感作抗原の抽出液を用いた免疫療法が行われてきた。過去の報告から、免疫療法は、感作抗原に対する  $T_{H2}$  主体の免疫反応から  $T_{H1}$  の免疫反応を誘導し、臨床症状を改善させることが示唆されている。しかし、従来の免疫療法

の有効性は十分ではなく、より有効な治療法の開発が望まれている。

アレルギー性疾患に対する新規治療法の開発においては、 $T_H1$  免疫反応を効果的に誘導することが重要と考えられる。近年、加熱処理を行ったリステリア菌体抗原 (Heat-killed *Listeria*, HKL) が、喘息モデルのマウスにおいて  $T_H1$  サイトカインを誘導し、アレルギー反応を抑制することが報告された。また、CpG モチーフを含む細菌 DNA や非メチル化合成オリゴ DNA (CpG-ODNs) がヒトおよびマウスの NK 細胞やマクロファージを刺激して  $IFN-\gamma$  や  $IL-12$  などの  $T_H1$  サイトカインを誘導することが明らかになった。これら  $T_H1$  誘導能を有する HKL および CpG-ODNs をアレルギー性疾患に対する新規免疫療法として臨床応用できる可能性が示唆されている。しかし、これまでに、犬においては HKL や CpG-ODNs の  $T_H1$  サイトカイン誘導能は検討されていない。

今回の研究では、第 1 章では、臨床的に慢性気管支炎およびアレルギー性鼻炎の犬において、感作抗原の同定を行い、アレルギー反応のその病態への関与を検討した。またアレルギー性鼻炎の症例に関しては末梢血単核球における  $IL-4$  および  $IFN-\gamma$  の発現を検討した。第 2 章では、犬の末梢血単核球において、HKL 処理による  $IFN-\gamma/IL-4$ 、 $IL-12$  および  $IL-18$  の発現量の変化を検討した。第 3 章では、12 種類の CpG-ODNs を合成し、犬の末梢血単核球において  $IFN-\gamma$  誘導能を示す CpG-ODN を検索した。

## 第 1 章

### 慢性気管支炎の犬における感作抗原の検討

慢性気管支炎は、発咳および喘鳴などの呼吸器症状を主訴とする呼吸器疾患であり、その病態にアレルギーの関与が疑われている。本章においては、環境中の吸入性抗原に対するアレルギー反応の病態への検討するため、慢性気管支炎と診断した 3 頭の犬において、抗原特異的 IgE 検査および皮内反応を行い、その感作抗原を検討した。また、検出された抗原を用いた末梢血単核球芽球化反応を行った。その結果、今回検討した 3 例においてコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*:DF) の感作を認め、2 例においてヤケヒョウヒダニ (*D. pteronyssinus*:DP) の感作を認めた。また、症例の DF に対する末梢血単核球芽球化反応は、5 頭のコントロールに比べて、高値を示した。

以上のことから、ハウスダストマイト (DF および DP) に対するアレルギー反応がこれら症例における慢性気管支炎の病態に関与していることが示唆された。

### アレルギー性鼻炎の犬における感作抗原の検討および末梢血単核球の

#### $IL-4$ および $IFN-\gamma$ mRNA の発現に関する検討

犬のアレルギー性鼻炎は、くしゃみおよび鼻汁を主訴とする上部気道疾患であり、副腎皮

質ステロイド剤が著効するため、その病態においてアレルギー反応の関与が疑われている。

今回、臨床的にアレルギー性鼻炎と診断した4症例に関して抗原特異的 IgE 検査および皮内反応を行い、感作抗原を検討した。また、検出された抗原を用いた末梢血単核球芽球化反応を行った。さらに、感作抗原で刺激した末梢血単核球における IL-4 および IFN- $\gamma$  mRNA の発現量を定量的リアルタイム PCR 法で検討した。

今回検討した4症例において、ハウスダストマイト (DF および DP) の感作を認め、1頭において日本スギ花粉 (*Cryptomeria japonica*, CJ) の感作も認めた。また、症例の DF 抗原に対する末梢血単核球芽球化反応は、4頭のコントロール犬に比べて高値を示した。これら症例から分離した末梢血単核球においては刺激前から IL-4 mRNA の発現が認められ、DF 抗原を用いて刺激培養した結果、全ての症例において、IL-4 mRNA の発現の増加を認めた。一方、コントロール犬では、いずれの条件下においても IL-4 mRNA の発現は認められなかった。IFN- $\gamma$  mRNA は、DF 刺激培養した場合にのみ両群で差が認められ、コントロール犬と比較して、症例群ではその発現は低値を示した。

以上のことから、ハウスダストマイト (DF および DP) に対するアレルギー反応および T<sub>H</sub>2 (IL-4) 主体の免疫反応がこれらの症例のアレルギー性鼻炎の病態に関与していることが示唆された。

## 第2章

### 犬の末梢血単核球における加熱処理リステリア菌体抗原 (HKL) の免疫刺激能の検討

HKL は、グラム陽性菌である *Listeria monocytogenes* を加熱殺菌したものである。マウスの脾臓細胞およびヒトの末梢血単核球において IFN- $\gamma$  を誘導することが知られている。本章においては、犬のアレルギー性疾患における HKL を用いた新規治療法の有用性を検討するための基礎研究を行った。まず、HKL が犬の末梢血単核球において IFN- $\gamma$  を誘導するか検討を行った。また、定量的リアルタイム PCR 法を用い、IL-4、IL-12 p35、IL-12 p40 および IL-18 の mRNA の発現についても検討した。

HKL ( $10^7$ — $10^9$  菌体数/ml) で刺激培養した末梢血単核球の培養上清中の IFN- $\gamma$  は、陰性コントロール (無刺激群) と比較して有意に高いことが明らかとなった。また、HKL は IL-12 p35 および IL-12 p40 mRNA の発現を有意に増強することも明らかとなった。しかし、7頭中3頭においては IL-4 mRNA の発現増強も認められた。HKL の刺激においては IL-18 mRNA 発現量の変化は認められなかった。には影響しないことも解った。

以上の結果より、HKL は犬の末梢血単核球において、T<sub>H</sub>1 サイトカインを誘導することが明らかとなった。しかし、一部の犬で IL-4 mRNA の発現も認めたことから、感作犬において、HKL のアレルギー抑制効果を検討する必要があるものと考えられた。

### 第3章

#### 犬の末梢血単核球において IFN- $\gamma$ を有する CpG-ODNs の検索

CpG モチーフ (5'--ATCGAT--3') を含む合成オリゴヌクレオチド DNA は、マウスやヒトの NK 細胞、T 細胞、およびマクロファージにおいて IFN- $\gamma$  および IL-12 を誘導することが知られている。また、抗原を結合させた CpG-ODNs は喘息モデルマウスにおいて、抗原特異的 T<sub>H</sub>1 反応を誘導し、アレルギー性炎症および気道過敏性を抑制すると報告されている。しかし、CpG-ODNs の反応性には種差があることが知られており、犬において T<sub>H</sub>1 サイトカインを誘導する配列は明らかとなっていない。

そこで、本章では、12 種類の CpG-ODNs を合成し、犬の末梢血単核球における IFN- $\gamma$  の誘導能をタンパクレベルおよび mRNA レベルで検討した。

その結果、No.2 の CpG-ODN (5'-GG tgc atcgat gcag GGGGG-3') は、CpG モチーフ依存性に、有意に高い IFN- $\gamma$  を誘導することが明らかとなった。さらに、この CpG-ODN は IL-12 p40 の mRNA の発現を有意に増強することが明らかとなった。またこの CpG-ODN を用いた場合には IL-4 mRNA 発現増強は認められなかった。

以上の結果から、犬において T<sub>H</sub>1 サイトカインを誘導する CpG-ODN の配列が明らかとなり、この CpG-ODN はアレルギー性疾患に対する新規治療法に有用であることが期待される。

#### 結論

第1章においては、犬の慢性気管支炎およびアレルギー性鼻炎において、環境中アレルゲンのその病態への関与を明らかにした。さらに、アレルギー性鼻炎は、T<sub>H</sub>2 免疫応答主体の疾患であることが明らかとなった。本章の結果は、犬におけるこれら疾患の病態解明に有用であるばかりでなく、ヒトのアレルギー性呼吸器疾患のモデルとなる可能性を示唆している。今後、感作抗原を用いた吸入暴露試験を行い、感作抗原と症状発症との直接的な関連を検討する必要があると思われる。

第2章においては、HKL が犬において、T<sub>H</sub>1 サイトカインを誘導することを証明した。しかしながら、IL-4 の誘導の可能性も示唆されたことから、感作犬において、HKL の T<sub>H</sub>1 誘導能を検討する必要があるもの考えられた。

第3章では、犬において IFN- $\gamma$  産生を誘導する CpG-ODN の配列を決定した。さらに、この配列は IL-4 誘導能を示さないことも明らかになった。今後、この CpG-ODN のアレルギー抑制効果有感作犬を用いて検討する必要がある。

本研究の結果は、犬のアレルギー性疾患における病態解明に進歩をもたらすととも新規免疫療法開発のための基礎的知見を提供するものである。これらが臨床的重要性が高まっているアレルギー性疾患の診断および治療の進歩に貢献することが期待される。