

## 論文の内容の要旨

論文題目 Ovalbumin 誘発喘息モデルマウスにおける  
経口トレランスの誘導に関する検討

指導教官 山本一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

永谷 勝也

抗原の経口投与は、抗原特異的末梢性トレランスを誘導する方法の一つとして確立されており、経口トレランスと呼ばれる。疾患モデルに対する経口トレランスを用いた治療は、これまでは EAE（実験的自己免疫性脳脊髄炎）、CIA（コラーゲン誘発関節炎）などの、主に Th1 タイプの自己免疫疾患モデルにおいて様々な報告がなされている。しかし、気管支喘息などの Th2 タイプのアレルギー性疾患モデルにおいては、病態抑制の手段としての経口トレランスの応用とそのメカニズムの検討は十分になされていない。経口トレランスは抗原の経口投与量や投与方法によりその誘導が修飾されると考えられている。経口トレランスの誘導に際しこれらの最も効果的な条件を検討することは、経口トレランスの治療への応用という点からも重要である。とりわけ抗原の経口投与量は、経口トレランス誘導のメカニズムにおいて重要な要素であると考えられている。これまでの報告では、低用量の抗原の経口投与では、抗原特異的な抑制性 T 細胞が誘導され、その T 細胞の移入により経口トレランスも移入されると報告されてきた。一方で、高用量の抗原の経口投与では、抗原特異的 T 細胞のクローナルアナジーやクローン除去が起こり、細胞移入によるトレランスの移入はできないとされている。Th2 依存性の疾患においては、高用量の抗原の経口投与により気道内好酸球増多や気道過敏性を抑制したとの報告があるが、経口投与する抗原量や時期の違いにより、トレランス誘導に差がみられるかどうか比

比較検討した報告はほとんどない。今回我々は、Ovalbumin(OVA)誘発喘息モデルマウスで経口トレランスが誘導されることを確認し、経口投与する抗原量や時期の違いにより、トレランス誘導に差がみられるかどうか比較検討した。一方、経口トレランスで誘導される抑制性細胞の本態については、これまでの報告ではその見解は大きく分かれている。今回我々は、マウスのOVA誘発喘息モデルで、OVAを経口投与したマウスの全脾細胞の移入により経口トレランスが移入されるかどうかを確認し、さらにこれらより特定の細胞群を除去して細胞移入を行うという手法を用いて、トレランスを移入させうる抑制性細胞について検討した。

気管支喘息は、気道内好酸球増多および気道過敏性の亢進がその特徴である。我々は、まずはじめに、OVA誘発喘息モデルマウスにおいて、OVAの経口投与により気道内好酸球増多のみならず気道過敏性をも抑制しうるか、また、OVAの投与量が経口トレランスの誘導にどのように影響するのかについて検討した。雄BALB/cマウスに、1回目の腹腔内感作の前に、低用量または高用量のOVAを、隔日に計5回経口投与した。OVA/Alumを10日間隔で2回腹腔内投与し、さらにOVAを3日間連続ネブライザー吸入して感作した。吸入終了より24時間後にメサコリン誘発気道過敏性を測定し、その後、BALFの好酸球分画、血清総IgEを測定した。対照群と比較し、低用量および高用量OVAを経口投与した群で、BALF中の好酸球分画および血清総IgEが抑制された。またOVAを経口投与した群で、喘息モデルにおいて気道過敏性を反映するPC<sub>200</sub>Mchが有意に高く、経口トレランスによる気道過敏性の抑制が確認された。また同時に摘出した肺の病理組織像でも、対照群と比較し、低用量および高用量のOVA投与群では、傍気管支および傍血管領域の炎症性細胞浸潤の著明な抑制を認めた。抑制の程度は、気道内好酸球増多、気道過敏性、病理組織像の全てにおいてOVAの低用量投与群に比べ、高用量投与群で強く、このモデルでの経口トレランスが投与量依存性であることが示された。

喘息の感作が進行中の状態でも経口トレランスによる治療効果が認められるかどうかは臨床的にも重要な問題である。経口投与時期によって経口トレランスの誘導がどのように影響されるかについて調べるため、我々は、OVAを投与する群を、投与時期により初回腹腔内感作前、2回目の腹腔内感作後および2回の腹腔内感作の中間とに分け、それぞれ隔日に計5回投与した。その後OVAで感作し、BALF中の好酸球分画、血清総IgEおよびメサコリン誘発気道過敏性を測定した。さらに摘出した肺から総RNAを抽出し、RT-PCR法により、喘息の病態に関与するTh2サイトカイン、好酸球の走化性に重要なケモカインであるEotaxin、またTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ や、抑制性サイトカインであるIL-10およびTGF- $\beta$ 遺伝子の肺組織での発現を解析した。初回腹腔内感作前の経口投与ではBALF中の好酸球分画、血清総IgE、および気道過敏性のいずれも、非経口投与群と比べ、著明に抑制されたが、2回目の腹腔内感作後の経口投与ではいずれも抑制されなかった。また、肺組織におけるIL-4、IL-5、IL-13、

Eotaxin 遺伝子発現はいずれも、初回腹腔内感作前の経口投与群で抑制されたが、2回目腹腔内感作後の経口投与群では抑制されなかった。IFN- $\gamma$ 、IL-10 および TGF- $\beta$ については各グループ間で特に差を認めなかった。また、2回の腹腔内感作の中間の時期のみに OVA を経口投与した場合にも、気道内好酸球増多、血清総 IgE、気道過敏性のいずれも抑制が見られた。これらの結果は、感作が完全に成立した時期では、経口トレランスの誘導はできないものの、感作がまだ進行中の状態であれば、十分に経口トレランスを誘導することが可能であることを示している。

経口トレランス誘導のメカニズムについては不明な点が多く、抗原の経口投与により何らかの過程を経て抗原特異的な抑制性細胞が誘導され、その抑制性細胞を移入することにより経口トレランスも移入されると考えられているが、その抗原特異的な抑制性細胞の本態については、現在もなお一定の見解は得られていない。次に我々は、この OVA 誘発喘息モデルマウスにおいても、経口投与したマウスの脾細胞の移入で、経口トレランスが移入されるかどうかを調べた。OVA を経口投与した雄 BALB/c マウスの脾細胞をナイーブな BALB/c マウスに経静脈的に移入した直後から OVA/alum による感作を行ない、OVA 吸入感作後に BALF 中の好酸球分画、血清総 IgE を測定した。OVA を経口投与したマウスの脾細胞を移入した群では対照群と比べて、BALF 中の好酸球数の著明な抑制を認めたものの、血清総 IgE の抑制は認められなかった。さらに我々は、腹腔内感作後においても、経口トレランスが移入されるかどうかについて検討した。OVA を経口投与した雄 BALB/c マウスの脾細胞を、別の BALB/c マウスに2回の腹腔内感作後に経静脈的に移入した。OVA 吸入感作後に BALF 中の好酸球分画、血清総 IgE を測定した。OVA を経口投与したマウスの脾細胞を移入した群では、対照群と比べて、BALF 中の好酸球数の抑制を認めたものの、血清総 IgE の抑制は認められなかった。これらの結果は、細胞移入によって気管支局所の炎症は抑制されるものの、OVA による感作そのものは抑制されていないことを示唆している。

最後に我々は、OVA を経口投与したマウスの全脾細胞から特定の細胞群を除去して移入する手法により、経口トレランスの移入における抑制性細胞について検討した。OVA を経口投与した BALB/c マウスの脾細胞を全脾細胞または脾細胞より CD4、CD8、および抗原提示細胞群 (Antigen presenting cells: APCs) を磁気ビーズを用いて、ネガティブセレクションした。これらの細胞をナイーブな BALB/c マウスに経静脈的に移入したのち、OVA で感作し、BALF 中の好酸球分画を計数した。OVA を経口投与したマウスの全脾細胞を移入した群では、対照群と比べて BALF 中の好酸球数の抑制を認め、全脾細胞より APC を除去すると著明に抑制が解除された。CD4、CD8 陽性細胞を除去した群でも部分的に抑制の低下を認めた。その程度は CD8 陽性細胞に比べて CD4 陽性細胞の方が大きかった。この結果より、脾細胞の養子

移入による、経口トレランスの移入に関与する抑制性細胞は、T細胞のみならずAPCも重要であることが示唆された。次に、APCを構成する樹状細胞、B細胞、マクロファージのうち、どの細胞群が最も重要であるかを調べるため、OVAを経口投与したマウスの全脾細胞よりCD11c、CD11b、CD19陽性細胞をそれぞれネガティブセレクションにより除去した。対照群と比べ、BALF中の好酸球数は、CD11c陽性細胞を除去した群では有意な増悪を認め、CD11b陽性細胞を除去した群でも著明な抑制の解除が見られたが、CD19陽性細胞を除去した群では抑制への影響は見られなかった。CD11cおよびCD11b陽性細胞のネガティブセレクションで経口トレランスの移入が妨げられたことより、経口トレランスの移入において、脾細胞のうち特にCD11b陽性のミエロイド系樹状細胞が重要である可能性が示唆された。