

っている。経口トレランスを利用して、様々なアレルギー、自己免疫疾患、臓器移植に伴う拒絶反応を抑制する試みが行われている。

腸管に入った抗原は、消化酵素が働いてアミノ酸、単糖類に分解されて体内に吸収されるが、一部は、完全な抗原あるいはペプチドとしても吸収される。完全消化を免された抗原がトレランス発現に重要とする報告がある。また、経口する抗原の量によって、免疫寛容の主にはたらく機構が異なることが明らかとなっている。少量の抗原の場合は、アクティブサプレッションがはたらく。すなわちパイエル氏板中で抑制性の調節T細胞が誘導されて、全身のリンパ節に分布し、免疫系を抑制する。この機構は、抗原特異的な抑制であるが、調節T細胞は、TGF β を、また同様にTh2細胞もIL-4とIL-10のサイトカインを産生して、抗原に非特異的に免疫応答を抑制する事も知られている。一方多量の抗原が経口投与された時には、T細胞が不反応（アナジー）に陥いると考えられている。T細胞が活性化するには、抗原提示細胞（APC）からの抗原ペプチドと組織適合性抗原（MHC）の情報を抗原レセプターを介して受ける（一次刺激）以外に、APCとの間で接着因子を介した刺激（二次刺激）を受ける必要がある。この二次刺激が欠如する時T細胞はアネルギーとなることが知られている。しかし、経口トレランスにみられるアナジーの真の機序は判明していない。

さて、前述のように免疫系は巧妙自己寛容を維持しているが、何らかの原因により自己成分に対する免疫応答が惹起され、これが生体にとって有害となる場合がある。これが自己免疫疾患である。

自己免疫疾患には、標的抗原と組織障害が一つの臓器に限局している臓器特異的自己免疫疾患と、生体に広く分布している抗原、たとえば核内抗原に対しての反

応が全面に現れ、多臓器にわたる障害がみられる全身性自己免疫疾患とがある。もちろん、すべての自己免疫疾患がこの2群に分けられるわけではなく、中間に位置つけられるものもある。

臓器特異的自己免疫疾患は、本来免疫寛容になっているはずの、ある臓器に特有な自己の抗原に対して免疫寛容が破綻し、それに対して免疫系が積極的に反応した結果引き起こされたものであると一般に考えられている。

すなわちこの場合、抗原特異的な免疫反応が重要な役割を果たして入ることは明らかである。実際、臓器特異的な自己抗体が検出され、いくつかの疾患では障害臓器又は抹消血に臓器特異的なT細胞が存在することが確認されている。一方、全身性自己免疫疾患がこの延長線上にあるか否かはよくわかっていない。このような疾患で検出される自己抗体の標的抗原は、ほとんどが核内物質や細胞質分子なので、自己抗体自体が直接臓器障害を起こしているとは考えにくい。すなわち、全身性自己免疫疾患では、いまのところ自己抗原に対する免疫異常と種々の病態とが一元的に理解できていないことが多い。さらに全身性自己免疫疾患では、ポリクローナルなB細胞活性化、T細胞サブセットの異常、種々のサイトカインの異常、単球、マクロファージの異常など、種々の免疫担当細胞の抗原特異的でない機能異常が指摘されており、一方、抗原特異的な理解は十分に進んではいない。

しかし、このような全身性自己免疫疾患における免疫異常を詳細に検討すると、患者の体内では、一定の標的抗原に対して、特異的な免疫反応が起こっていることが判明しつつある。たとえば、全身性エリテマトーデス（SLE）混合性結合組織病（MCTD）などの標的抗原である核内のU1snRNP複合体のペプチド抗原を規定する遺伝子の解析で、一つの自己抗原分子上には複数のエピトープ

が存在し、それらが高親和性の自己抗体で認識されていることが判明している。このことは、SLEやMCTDの患者の体内でU1snRNPの自己ペプチドが外来異物と同様の抗原として、積極的に免疫応答の対象となっていること、すなわちantigen drivenの免疫反応が起こっていることを示している。さらに可溶性のリコンビナント自己抗原を作成し、患者末梢血のT細胞との反応を検討したところ、その自己抗原に対して自己抗体をもっている患者の末梢血T細胞だけが陽性の細胞増殖反応を示した。このことは全身性自己免疫疾患の患者でも、核内の特定の自己抗原に対してT細胞レベルの免疫寛容が破綻していることを示している。すなわち、全身性自己免疫疾患の場合、自己免疫の標的は一つではないかも知れないが、少なくとも限られたいくつかの自己の分子に対して免疫寛容が破れていると考えてよいであろう。すべての、もしくは無制限の自己抗原に対して免疫寛容が破綻しているのではないということは、疾患や病態の種類と自己抗体の標的抗原がよく相関する事からも理解できることである。

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) は、軟骨の破壊と骨の浸食を伴う関節の慢性炎症性疾患である。その発症と慢性炎症の持続のメカニズムは、現在まだ十分に解明されたとは、言い難いが、免疫系が深く関与し、自己免疫疾患の一つと考えられている。慢性関節リウマチの病因の解明はヒトの実験系で行うのが最良かもしれないが、当然ながらヒトでは多くの実験上の制約が存在する。そこで疾患モデルが有用と考えられ、マウスやラットにII型コラーゲン (type II collagen, CII) を免疫して誘導されるコラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis, CIA) が開発された。1977年にTrenthamらは、ラットの皮内にII型コラーゲンを不完全プロインドアジ

ュバント (IFA) とともに免疫すると、2週後位に抹消の関節炎が発症することを最初に報告した。熱で変性させたCIIやタイプIのコラーゲン出免疫しても、関節炎は発症しない。マウスでも完全プロインドアジュバント (CFA) とともに、CIIで免疫すると、同様の関節炎が発症する。組織学的には、滑膜の肥厚、関節液の貯留、パヌス(pannus)の形成及び軟骨と骨への侵食が起きる。また関節炎の発症しやすさは、遺伝的に規定されている。つまり、マウスではDBA/1、ラットではWFという系統では、高頻度に関節炎が発症する。コラーゲン関節炎では、CIIに対する強い細胞性免疫と液性免疫 (抗体) を伴っている。このコラーゲンに対する細胞性免疫と抗コラーゲン抗体が、関節炎の発症と遷延化にどのように関与しているかについては、議論が絶えない。

CIAを発症したマウスの脾細胞とリンパ節細胞を大量に、正常の同系マウスに静注すると関節炎が発症したという報告がある。またいくつかのグループは、CIA発症マウスより、CII特異的T細胞クローンを樹立しているそれらのうちある種のT細胞クローンをマウスに移入すると関節炎を発症したというが、他のクローンには、そのような活性はなかったという。一般的には、細胞性免疫のみで、関節炎を誘導させるのは、困難なようである。一方、関節炎発症マウスの血清やそれから精製した免疫グロブリンを正常マウスへ移入すると、関節炎が発症するという報告は多くある。すなわち抗コラーゲン抗体が、CIAの発症に関与していることは間違いないようである。関節炎発症DBA/1マウスより採取した抗コラーゲン抗体を移入する際に、移入される側のRecipientのマウスは、特に関節炎好発マウスでなくとも関節炎は発症する。移入された抗体は、関節の軟骨に結合し、補体と結合する。関節炎の発症

と抗体移入による関節炎発症はともに補体依存性である。しかし、抗コラーゲン抗体の移入により発症した関節炎は例外なくコラーゲンで直接免疫したマウスに発症した関節炎よりも軽度の病理学的変化しか示さない。したがって、CIAの発症には、CIIに対する液性免疫(抗体)と細胞性免疫(T細胞応答)の両方が必要であるらしいことが示唆される。

中国の漆を食べることにより、漆への接触過敏反応を予防したという言い伝えがあり、現代的のはこれが経口免疫寛容に其づいていると理解できる。このように現象経口免疫寛容は古くから認められていたが、詳細な研究が行われるようになったのは、この十数年のことである。特にこの数年経口免疫寛容自己免疫疾患や食品アレルギーの治療などに応用可能であると期待され、精力的に研究されてきた。

例えば多発性硬化症(MS)の動物モデルに実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)がある。EAEはミエリン塩基性タンパク(MBP)の投与により誘導されるが、あらかじめMBPを経口投与にすることにより免疫寛容が誘導され、EAEの発症を著しく抑制できることが示されている。この結果は自己免疫疾患に対する経口寛容の効果を強く示唆している。RAの動物実験系であるCIAにおいても経口免疫寛容の報告もある。

一方、当研究室では抗原を飼料中に含ませて投与することにより強く免疫寛容を誘導できることを示してある。そこでCIIを飼料中に含ませて経口投与してからCIIで感作してCIA発症の抑制を観察した。また、CIA抑制に十分な最低限のCII投与量を検索した。またさらに、その抑制機構を解析した。

CIA発症の機構は現在十二分に解明されたとは言い難いが、CIIに対する強い液性免疫(抗体)と細胞性免疫を伴っていることが報告されている。既に述べたよ

うに、現在までの知見から関節炎の発症にはCIIに対する抗体産生応答とT細胞応答の両方が必要であると考えられる。

一方経口免疫寛容においては抗体産生応答、T細胞応答の両者が低下する。現在までのデータでは、このように免疫応答が低下するB細胞、T細胞のうち、経口免疫寛容ではT細胞が不応答になり、B細胞の応答はT細胞の影響により低下すると考えられている。当研究室の平原もSCID、ヌードマウスを用いた細胞移入実験系でこれを示した。

T細胞による抑制機構については、ヘルパーT細胞が不活性化される機構(クローナルアナジー)と調節性T細胞による能動的抑制の機構(アクティブサプレッション)の二つが現在有力な説である。

これらの説のうち抗原によるクローナルアナジーとは、T細胞が抗原提示された抗原を認識する際に、何らかのシグナルの欠如のため活性化されず、抗原に回答できない状態に陥るというものである。一方、アクティブサプレッションに関しては、免疫反応を抑制するT細胞が存在することを示す結果はかなり以前から報告されている。経口免疫寛容の研究においても、抗原を経口投与したマウス由来のT細胞を移入されたマウスで、その抗原に対する応答性が低下する現象がOVA、ヒツジ赤血球を抗原とした場合について報告されていた。長い間この抑制機構は不明であったが、最近、自己免疫疾患モデルの一つであるEAEにおいてMBPの経口投与による免疫抑制がT細胞の産生するTGF- β 等のサイトカインにより媒介されていることが示されている。これら二つの機構は相反するものではなく、同時に起こりうると考えられているが、最近、経口投与量により主にはたらく機構が異なることが示されている。少量の場合アクティブサプレッションが主にはたらく、大量投与の場合クローナルアナジーが誘導される。

さて、CIIの経口投与によるCIAの抑制機構は全く不明である。そこで本研究ではCIIの経口投与によるCIAの抑制機構について検討した。まず、CIIを経口投与したマウスにおけるCIIに対する抗体生産応答、T細胞増応答について検討した。さらに第二節では、CIIの経口投与による免疫抑制において抑制性T細胞が関与しているかどうかを細胞移入実験を行い検討した。すなわちCIIを経口投与され免疫寛容が成立したマウスの脾臓細胞をCIIを投与していないマウスに移入したときのCIAにたいする抑制効果の有無を検討した。

B. 研究方法

1. マウス

DBA/1J マウス (6~7週齢、メス) を日本チャールズリバー社より購入した。

2. 抗原

(1) ウシ CII

・粗製ウシ CII、マウス飼料用ー

マウス飼料のタンパク質源である CII は、新鮮なウシ軟骨より精製した。ウシ軟骨は全国農業協同組合連合会、中央畜産センターより提供を受け、Trentham らの方法を参考にし、以下のような方法を用いて CII を抽出した。

前処理;ウシ大腿骨より軟骨を採取した。以下、重量約 100 g の場合について述べる。採取した軟骨を冷蒸留水を用いて洗い、ホモジナイザーを用いて細片化した。さらに 1 M NaCl/50mM Tris-HCl (pH7.6, 2 l) に懸濁して、3日間攪拌した。それを 10,000gx50 分の条件で遠心し、不溶性 CII として沈澱を回収した。

抽出;ペプシン限定分解を行い、可溶性 CII を抽出した。すなわち前処理で得られた不溶性 CII を、0.5M 酢酸 1 l にペプシン (Sigma) を 200 mg 加えた溶液に懸濁し、4°C、3日間攪拌した後、10,000g x 50 分の条件で遠心し、上清を回収した。沈澱はさらに 2 回、上記条件で抽出を繰り返した。上清に NaCl を最終濃度 0.9M になるように加え一晩攪拌し塩析させて、10,000 g x 50 分の条件で遠心し、沈澱を回収した。沈澱は脱イオン水に攪拌し、脱イオン水に浸して、透析し、凍結乾燥後 4°C で保存した。牛軟骨 100 g から約 10g 得られた。なお純度は 6% SDS-ゲル電気泳動で確認した。

・精製ウシ CII, 感作用ー

前処理を上記の飼料用ウシ CII と同じ操作により行った。

抽出;上記の通りペプシン限定分解後、NaOH を加えて pH 8.5 にすることでペプ

シンを失活させた。このときゲル化された可溶性 CII を、10,000g x 50 分の条件で遠心し、沈澱として回収した。これを 0.5 M 酢酸 (100ml) に溶かし、10,000g x 50 分の条件で遠心し、上清を回収した。この上清を脱イオン水に浸して透析し、凍結乾燥後 4°C で保存した。牛軟骨 10 g から約 50 mg 得られた。純度は 6% SDS-ゲル電気泳動で確認した。

(2) CB-ペプチド

CB-ペプチドは、CII を CNBr で分解して得られる断片であり、CB11 は CII の 124-402 残基に相当する。Miller らの方法を参考に、不溶性ウシ CII を CNBr 分解し、これを陽イオン交換体を用いて分画し得られた画分をゲル濾過により精製した。以下、詳述する。

不溶性ウシ CII を Light らの方法に基づき CNBr 分解した。すなわち、70%ギ酸中 (タンパク質濃度 1%) において不溶性 CII と等重量の CNBr を室温、暗所で 6 時間反応させた。その後 10 倍希釈し、脱イオン水に浸して透析し、凍結乾燥した。

このようにして得られたウシ CII の CNBr 分解物を陽イオン交換体、カルボキシメチルセルロース (CM-cellulose; Whatman CM-32, 2.5 x 10cm) を用いて分画した。クエン酸緩衝液 (0.02 M クエン酸ナトリウム, 0.01 M NaCl, pH 7.6) により平衡化したカラムに、CNBr 分解物 200 mg を 20 ml のクエン酸緩衝液に溶かした試料を添加した。

これを 42°C、流速 200 ml/hr の条件で 0.1~0.12 M NaCl の直線勾配をかけて溶出し、得られたピーク A を脱イオン水に浸して透析し、凍結乾燥した。

採取されたピークを 0.1 M 酢酸に溶かし、CB11 を 20°C、10 ml/hr の条件で Shphadex G-70 (1.5 x 90 cm) を用いたゲル濾過により精製した。

採取された分画は脱イオン水に対して透析し、凍結乾燥後 4°C に保存した。以上の精製の過程で得られた CII 分解物はそ

れぞれ15%ゲルのSDS-ゲル電気泳動で確認した。

マウス CII はマウス胸骨先端より剣状軟骨を採取して分離した。以下、感作用牛CIIと同様な方法でマウスCIIを精製した。マウス400匹より40gのマウスCIIが得られた。純度は電気泳動で確認した。

3. 飼料

前述のようにして精製したウシCIIをタンパク質源とする。CII食を調製した。飼料中のCIIが10%、1%、0.1%、0.01%の割合で含まれているCII食を用意した。それぞれ全タンパク中、CIIが50%、5%、0.5%、0.05%の割合で含まれ、今後50% CII食、5% CII食、0.5% CII食、0.05% CII食と呼ぶ。これらの飼料の組成を表に示した。CII食をタンパク組成はアミノ酸の栄養バランスを考え、CIIと全カゼイン(wCN)より構成した。またこの対照群として、一般的にマウスの飼料として用いられているMF食(オリエンテル酸母工業)、また補完的な対照群としてタンパク組成がwCN100%であるwCN食を用意した。wCNはSigma社、 α -スターチ、ビタミン、ミネラル混合は船橋農場、そして塩化コリンは和光純薬からそれぞれ購入した。さらにこれらを脱イオンで合わせ、固形飼料とした。

4. CIAの誘導

DBA/1マウスをエーテル麻酔のした実験机上につぶせに寝かせ、 Freund完全アジュバント(CFA: Difco)を等量加えてw/o型エマルジョンにしたCIIを、マウスを右後足、背中、尾を基部に1匹あたり300mg皮内免疫した。初感作後21日目に不完全アジュバント(CFA: Difco)を用いて1匹あたり100mgのCIIをマウス腹腔に追加免疫した。初感作後25日目頃から2、3日おきに観察した。

5. CII食の投与

CII食をマウスに自由摂取させた場合、

CIA症状が抑制されるかどうか図1に示すようなスケジュールに従って、解析を行った。すなわち、2週間または4週間CII食を自由摂取させたマウスにCIIを感作し、誘導されるCIA症状を観察し、CIIを含まない飼育した対照群と比較した。いずれのマウスの免疫を行って後はMF食で飼育した。これは、以下の全ての実験でも同様である。

6. CIAの評価

CIAの症状の評価については以下のようにして行った。各マウスの4本の足全てについて0から3までの評価を関節炎症の強弱に応じて与えた。即ち、評価0は健康な状態である。評価1は少し赤くなり、脹れて発症し始めた状態で、評価2は完全に赤くなり、脹れて発症している状態で、評価3はその脹れが最高潮に至った状態を示す。各群についてそれぞれのマウスの評価値の合計し、この値をA.I.とした。そのA.I.の数値が大きいほどCIA症状の程度が重いということになる。

7. CIIに対する経口免疫寛容の誘導(抗体産生応答)

50%CII食をマウスに自由摂食させた場合、CIIに対する免疫応答が低下するかどうかについて図2に示すようなスケジュールに従って、抗体産生応答の解析を行った。

8. 抗体産生応答の評価

ウシCIIの皮内免疫後、35日目に採血して得た抗血清中の抗体の特異性及び抗体価を、酵素免疫測定法(ELISA)によって調べた。以下、方法を記す。

ポリスチレン製マイクロタイタープレート(Nunc)のウェルに抗原の100 μ mlリン酸緩衝食塩水(PBS)溶液100 μ lを分注し、室温で2時間(あるいは4 $^{\circ}$ Cで一晩)静置して抗原を吸着させた。各ウェルをPBS-Tween(Tween 20(和光純薬))を0.5ml/l含むPBS)125 μ lで3回洗浄し、抗血清のPBS-Tween希釈液(抗マウ

ス:CII抗体産生能を測る時は100倍、その他の抗原に対する抗体産生能を測るときは400倍)100 μ lを加え、室温で2時間静置した。同様に洗浄後、アルカリホスファターゼ標識したヤギ抗マウスIg抗体(ZYMED LAB.)のPBS-Tween希釈液を100 μ l加えて、室温で2時間静置した。洗浄後、0.1%ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(和光純薬)/ジエタノールアミン-塩酸緩衝液(pH9.8)100 μ lを基質として加え、室温で反応させた。30分後に5N水酸化ナトリウム水溶液20 μ lを加え反応を停止させ、405nmの吸光値を測定した。

9. CIIに対する経口免疫寛容の誘導(T細胞応答)

50% CII食をマウスに自由摂食させたばあい、CIIまたはCB11に対する免疫寛容がT細胞増殖応答において誘導されるかどうか、図3に示すようなスケジュールに従い解析した。

10. T細胞増殖応答試験

マウスの両後足及び尾基底部に1匹当たり100 μ gのCIIをMycobacterium tuberculosis H37Ra株の死菌を含むもCFA(DIFCO)とともに投与して、1週間後に膝下部、鼠蹊部のリンパ節を取り出しリンパ球懸濁液を調製した。これを96ウェルカルチャープレート(Falcon)に抗原とともに1ウェルあたり $4.0\sim 4.5 \times 10^5$ 個/200 μ l分注した。抗原にはCII、CB11を用意した。培地には1%マウス正常血清、 5×10^{-5} M 2-メルカプトメタノールを加えたRPMI 1640(ニッスイ)を用いた。CO₂インキュベーター中で2日培養後、1ウェルあたり37 kBq ³H-チミジン(New England Nuclear)を添加し、12時間後にセルハベスター(アベ科学)で細胞フィルター上にハーベストした。この細胞中に取り込まれた³Hを、液体シンチレーションカウンターにより計測した。

1.1. 細胞移入実験

(1) 供与細胞の調製

以下の2群を用意した。すなわち50% CII食を2週間投与したマウス、対照群としてMF食を与えたマウスである。これらのマウスを解剖して脾臓を取りだし、各群ごとに抗生物質、2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640培地を用いて、脾臓細胞懸濁液を調製した。

(2) 細胞の移入

受容マウスは、移入マウスと同系統のDBA/1マウスを用いた。受容マウスは2群に分け、各群に前項の2種類の細胞のいずれかを静脈注射により移入した。また細胞移入実験全体の対照群として上述の培地のみを静脈注射した群も設けた。

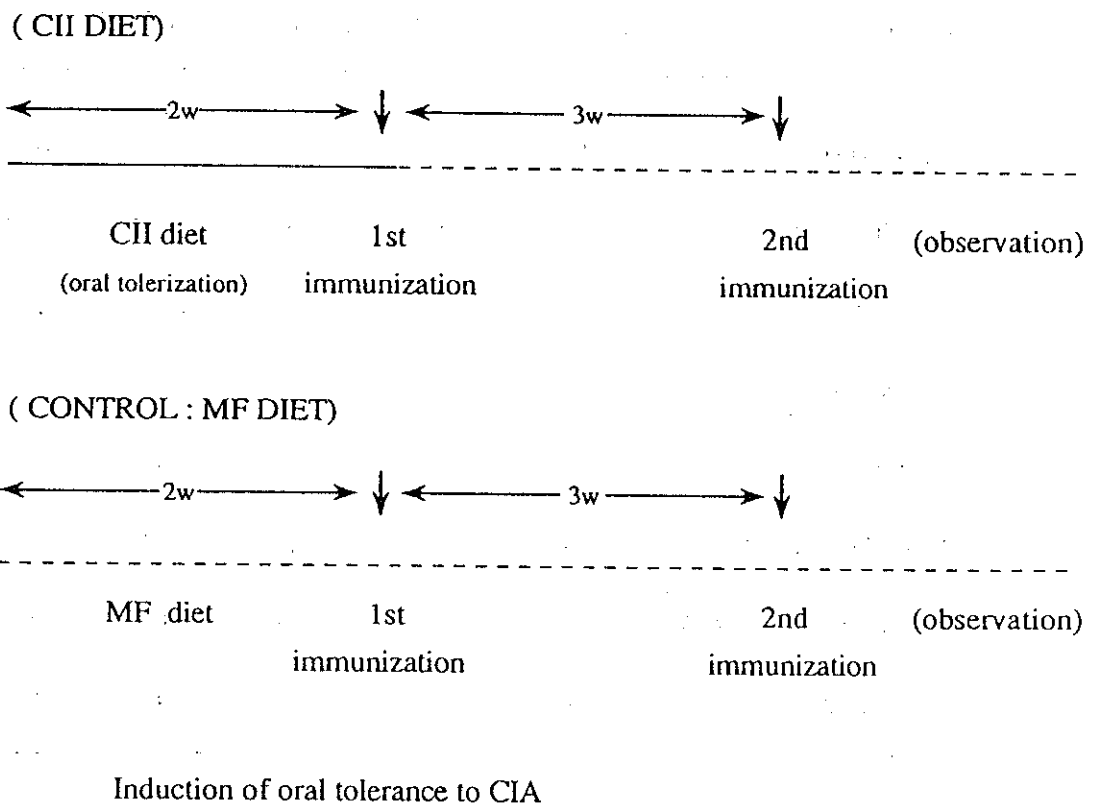
(3) 受容マウスのCIA症状と抗体産生応答

細胞移入の3日後、CIAの誘導及び症状の評価をそれぞれ上記した通りの方法で行った。また抗体産生応答の評価も既に記載した通りの方法で行った。細胞移入実験の概略を、図4に示した。

表 1

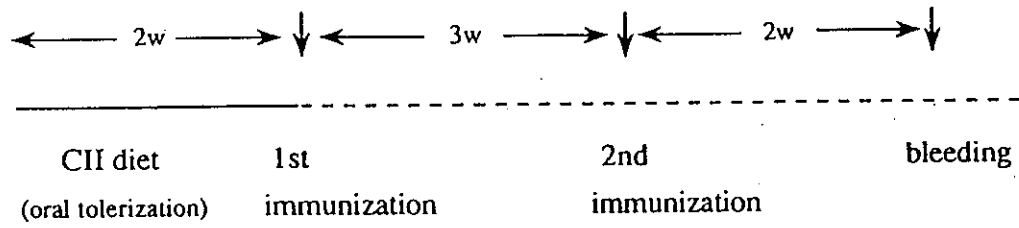
Composition of the diets(%)

D i e t	50% CII	5% CII	0.5% CII	0.05% CII	WCN
Alpha Starch	62.7	62.7	62.7	62.7	62.7
Type II collagen	10.0	1.0	0.1	0.01	0.0
Whole casein	10.0	19.0	19.9	19.99	20.0
Soybean oil	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
Cellulose power	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture (AIN. 76)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture (AIN. 76)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

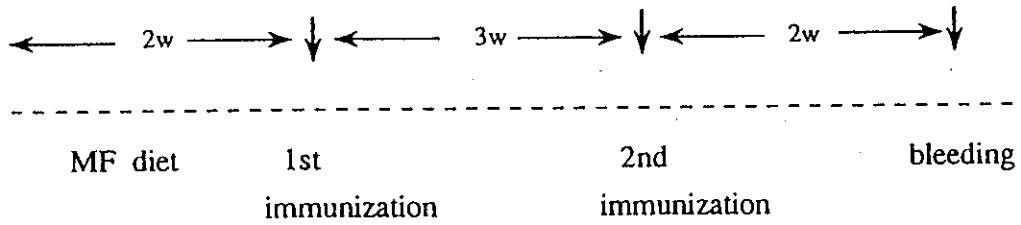


☒ 1

(50% CII DIET)



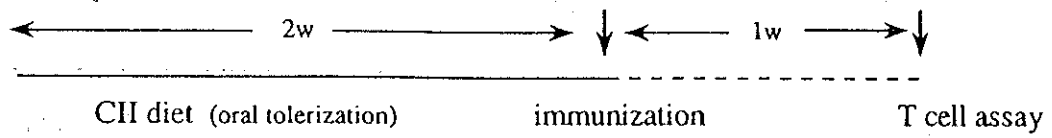
(CONTROL : MF DIET)



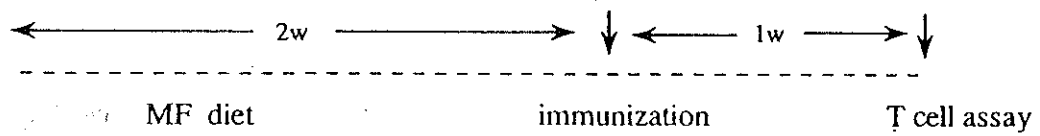
Induction of oral tolerance by CII diet

☒ 2

(50% CII DIET)



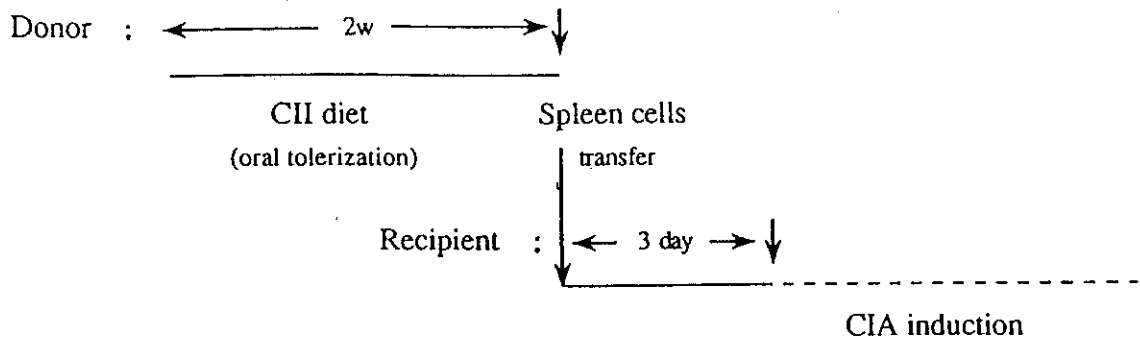
(CONTROL : MF DIET)



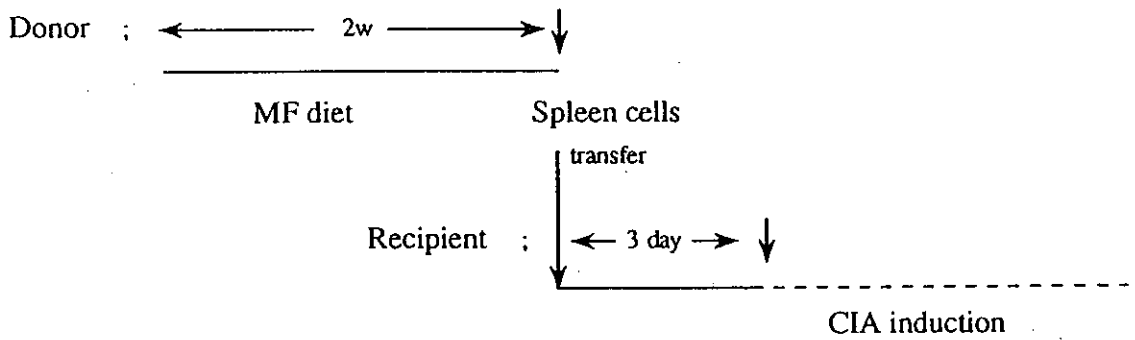
Induction of oral tolerance for T cell proliferative response by CII diet

图 3

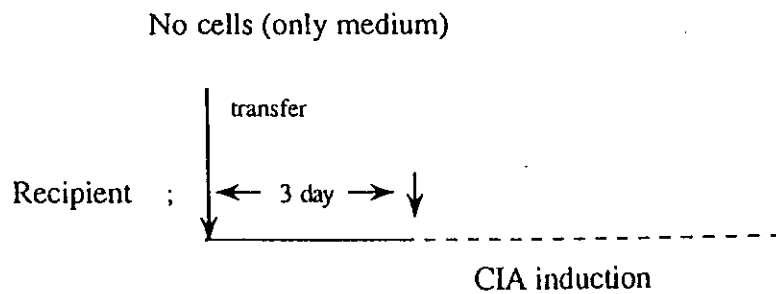
(50% CII DIET)



(CONTROL, MF DIET)



(CONTROL, NO DONOR)



☒ 4

C. 研究結果

1. CII 食の経口摂取による C I A 症状の抑制

(1) 50% CII 食の経口投与による C I A 症状の抑制

50% CII 食 (全飼料中の CII 含量は 10%) をマウスに摂食させることにより、C I A の症状が抑制されるかどうか検討した。すなわち、2 週間 50% CII 食を摂食させたマウス (50% CII 食群) にアジュバントとともに皮内に CII を免疫し、その 3 週間後追加免疫を行った。その際の C I A 症状を観察し、CII を含まない飼料で飼育した対照群と比較した。なお C I A 症状の評価はアースライテスインデックス (A. I.) により数値化した。

グラフが示すように、50% CII 食を摂食したマウスは対照群に比べて、C I A の症状がほぼ完全に抑制された (図 5)。対照群である wCN 食及び MF 食を摂食したマウスは A. I. が 3 近くになるのに対し、50% CII 食を摂食したマウスは 1 を越えない範囲で推移した。また発症時期についても wCN 食群、MF 食群は 25 日目ぐらいから始まるが、50% CII 食群は 30 日目ぐらいから遅れて発症し始めた。これらの結果、50% CII 食を摂食することにより C I A 症状が抑制されることが示された。

(2) C I A 症状の抑制に効果のある飼料中の CII 含量の検討

このように 50% CII 食摂取により C I A が抑制された。次に、より CII 含量の低い飼料の摂取にとって経口免疫寛容が誘導することを目的として実験を計画した。まず、50% CII 食と同じ 2 週間の摂食期間で飼料タンパク質中 5% が CII となる 5% CII 食 (全飼料中に CII を 1% 含む)、0.5% CII 食 (全飼料中に CII を 0.1% 含む)、0.05% CII 食 (全飼料中に CII を 0.01% 含む) を摂食したマウスにおいて C I A が抑制されるかどうか確かめた (図 6、5% CII 食の場合のみ記載)。

この結果、これらの CII 食群は対照群に比較して C I A 症状は全て抑制されなかった。すなわち 2 週間の摂食期間では 5% 以下の CII 食は C I A の抑制に対して効果を持たないことが示された。そこでさらに摂食期間を延ばすことにより、C I A を抑制できないか検討を加えた。すなわち、5% CII 食 (全飼料中に CII を 1% 含む)、0.5% CII 食 (全飼料中に CII を 0.1% 含む)、0.05% CII 食 (全飼料中に CII を 0.01% 含む) を 4 週間マウスに摂食させた。また対照群としては上記同様に MF 食群、wCN 食群を用いた。これらの飼料をマウスに摂食させた後 C I A を誘導し、症状を A. I. により評価した。

その結果 (図 6)、5% CII 食を摂食した群においては対照群に比較して C I A 症状が抑制されていることが示された。また 0.05% 食群においては症状がある程度軽減した。ただしこれより CII が高含量である 0.5% 食群は抑制がほとんどみられなかった。

2. CII の経口摂取による CIA 制御機構の解析

(1) CII の経口摂取による CII に対する免疫応答の抑制

CII の経口投与により CIA の症状が抑制されたが、CIA の発症には CII に対する T 細胞応答と抗体産生が深く関係していると考えられる。そこで、50% CII 食をマウスに摂食させることにより、CII に対するこれら免疫応答が抑制されるかどうか解析した。

まず、CIA 症状と免疫応答の関係をより直接的に調べるために CIA 症状を発症しているときの血清中の CII 特異的抗体産生量を測定した。すなわち 1. と同様に 50% CII 食を摂食したマウスに CIA 誘導の処置をし、CIA 症状がピークに達し始めた、1 次免疫 (皮内免疫) より 5 週間後に採血を行い抗血清を得た。これについてウシ CII、マウス CII、CB11 に対す

る抗体産生量を ELISA によって測定し、対照群と比較した。その結果、50% CII 食群は対照群の wCN 食、MF 食群に比べて抗ウシ CII 抗体産生に有意に抑制がみられた (図 7、T 検定; $P < 0.05$)。同様なことが抗マウス CII 抗体産生、抗 CB11 抗体産生についてもみられた。一般にマウス抗体のサブクラスは IgG₁ が最も多いが CIA の系においてはサブクラス IgG_{2a}、IgG_{2b} が最も多く産生される。この事実は CII の経口投与による CIA を抑制においてもこれらのサブクラスが重要な意味を持っていることを示唆している。そこでさらに抗ウシ CII 抗体産生応答に関しては、その特異性をサブクラス IgG_{2a}、IgG_{2b} 量を測定することにより検討した。その結果、抗ウシ CII IgG_{2a}、抗ウシ CII IgG_{2b} 産生についても 50% CII 食群における産生応答が低下していた (図 8)。これらの結果から 50% CII 食を摂食することにより抗体産生応答においても経口寛容が誘導されることが示された。

次に T 細胞応答について検討を加えた。すなわち 50% CII 食をマウスに摂食させることにより、経口寛容が誘導されるかどうかに関して、T 細胞増殖試験を行い解析した。2 週間、50% CII 食を摂食したマウスを CII で免疫し、その際の CII 及び、CB11 に対する T 細胞の応答性を T 細胞増殖試験により測定し、CII を含まない市販の飼料 MF 食で飼育した対照群と比較した。その結果、図 9 に示すように対照群においては CII に対する T 細胞応答が、弱く見られたが、50% CII 食を摂食させたマウスにおいては CII に対する T 細胞応答は全く見られなかった。また同様に CB11 に対する T 細胞応答は対照群においては認められたが、50% CII 食を摂食させたマウスにおいて全くみられなかった (図 9)。

(2) CII 食を摂食したマウスの脾臓

細胞移入による CIA 抑制の解析

において、CII の経口投与より CIA 症状が抑制される時、同時に抗体産生応答も低下することが示された。また CII の経口投与により CII に対する T 細胞応答も低下することがリンパ節増殖試験によって示された。これらの事実より CII の経口投与による CIA 症状の抑制には B 細胞、T 細胞にみられる免疫応答の低下が深く関係しているものと考えられる。

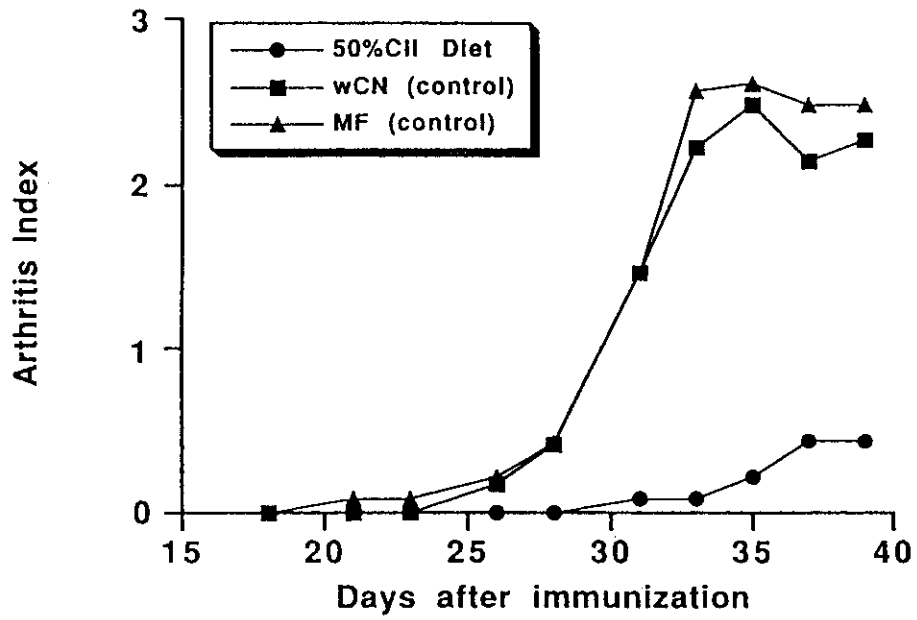
経口免疫寛容は主に T 細胞によって担われていると考えられているが、その誘導メカニズムとして、抑制 T 細胞により他の T 細胞や B 細胞の機能が抑制される可能性が示唆されている (アクティブサプレッション)。もしこのことが CIA における経口免疫寛容においても当てはまるのなら、経口免疫寛容の成立により誘導された抑制性 T 細胞を経口免疫寛容の成立していない受容マウスに移入することにより、受容マウスの CIA 発症が抑制されるはずである。

そこで、CII を摂食していないマウスに 50% CII 食を摂食したマウスの脾臓細胞を移入し、CII 皮内免疫により誘発される CIA 症状に対する影響を調べることにより、CIA における経口免疫寛容において抑制性 T 細胞がどの程度関与しているのかについて検討を進めた。対照群として MF 食群の細胞を移入した受容マウスおよび細胞を移入していないマウスについて調べた。受容マウスには X 線を照射せず、受容マウス自身に免疫系が機能している状態におき、移入した細胞の能動的な抑制作用がみられるかを検討した。

その結果、50% CII 食群の脾臓細胞を移入した受容マウスは MF 食群の脾臓細胞を移入した対照群に比較して症状が抑制されていた (図 10)。なお MF 食群の脾臓細胞を移入した受容マウスと細胞移入をしていないマウスは同様な経過、同様な重度で CIA を発症したので、脾臓細胞の移入によって、CIA 症状が影響を受

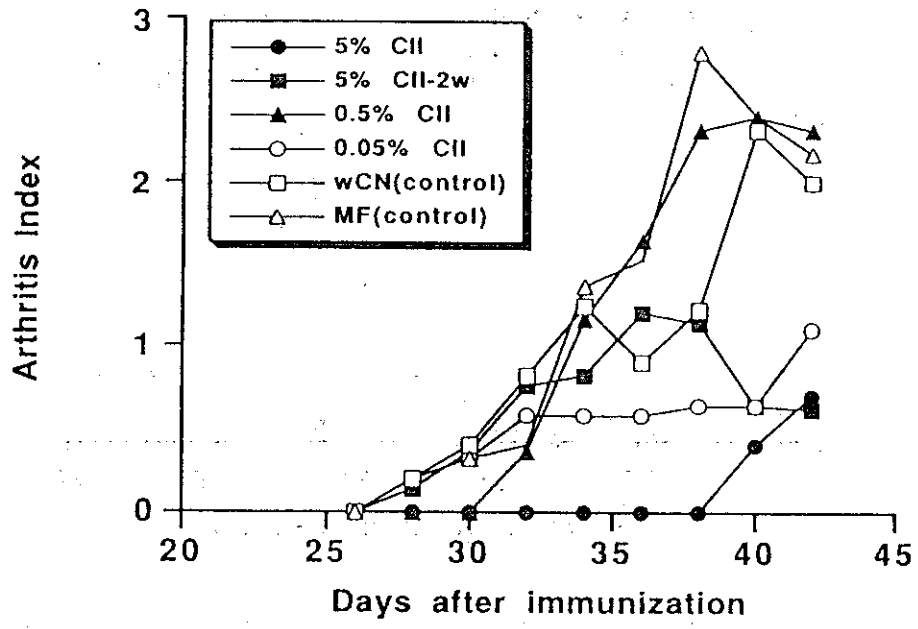
けることは無いものと考えられた。

経口免疫寛容の成立したマウスの脾臓細胞移入によって CIA 症状が抑制されることが示された。次に抗体産生応答に対して移入した脾臓細胞がどのような影響を及ぼすか検討した。すなわち、上記の CIA 誘導における際のウシ CII、マウス CII、CB11 に対する抗体産生応答について調べた(図 1-1)。これまでと同様に CII の皮内免疫より 5 週間経過した時の抗血清を用いた。その結果抗ウシ CII 抗体産生能及び抗 CB11 抗体産生能については各群間において違いがみられなかった。一方、マウス CII に対する抗体産生能については 50% CII 食摂食群の脾臓細胞を移入したマウスにおいては対照群に比較して有意に抑制されていた。つまり自己抗原であるマウス CII に対する抗体産生能が低下していた。



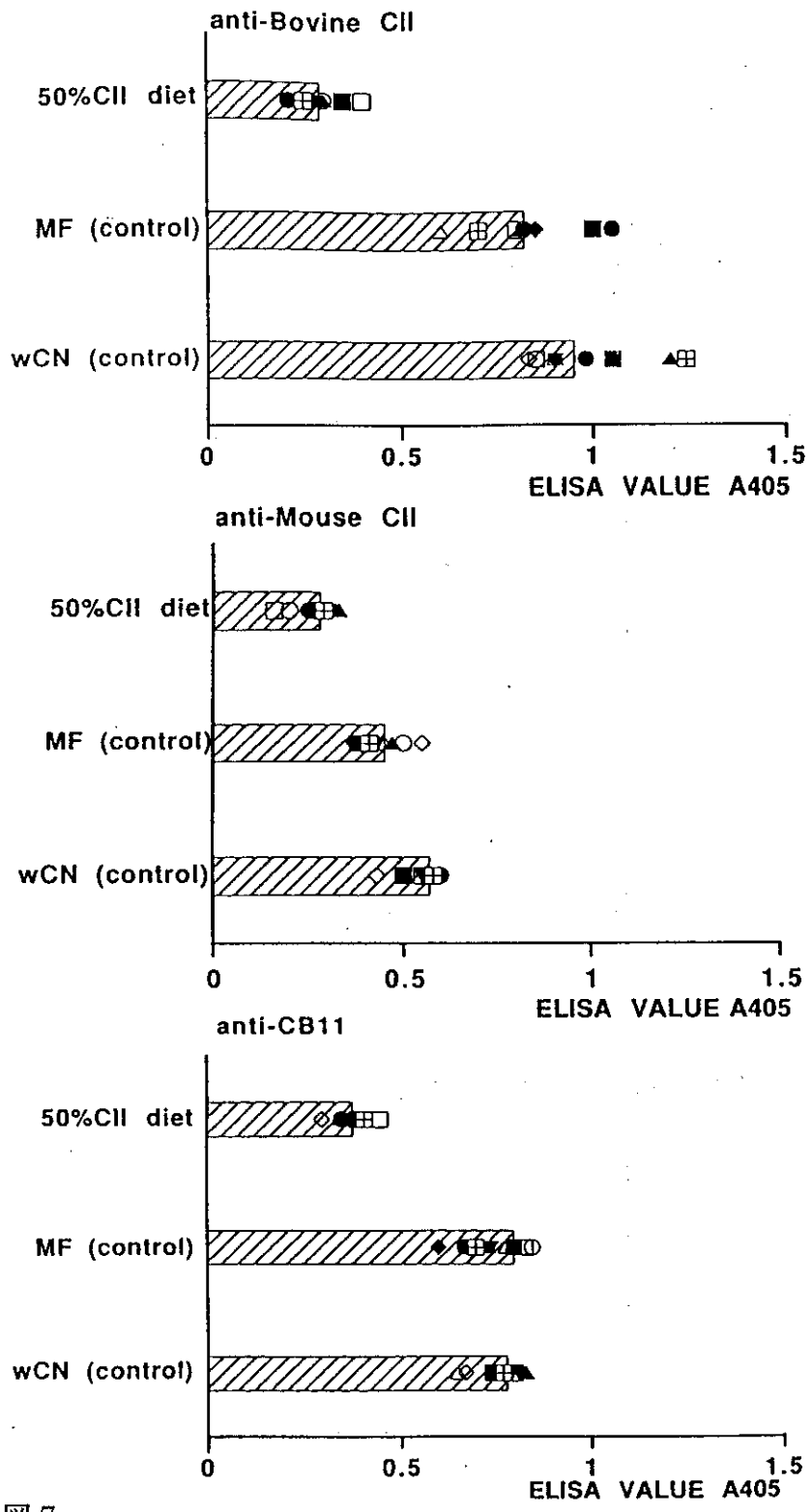
Feeding 50%CII diet suppressed induction of CIA

图 5



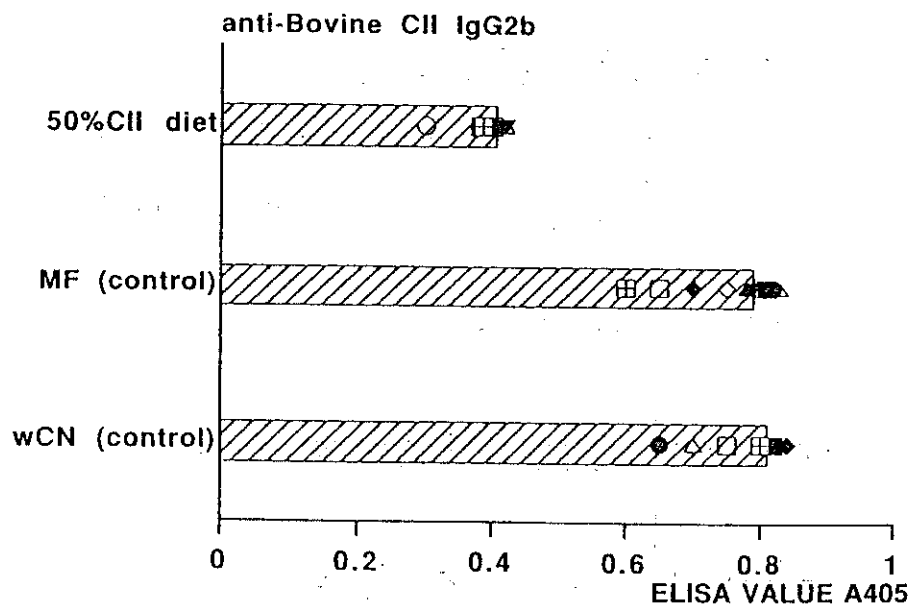
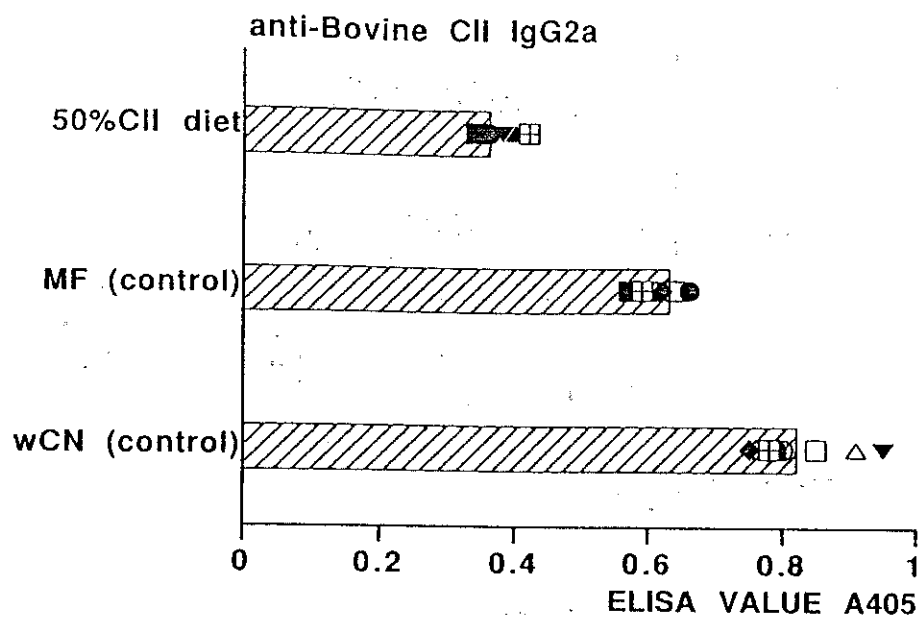
Effect of CII dose on incidence of CIA

图 6



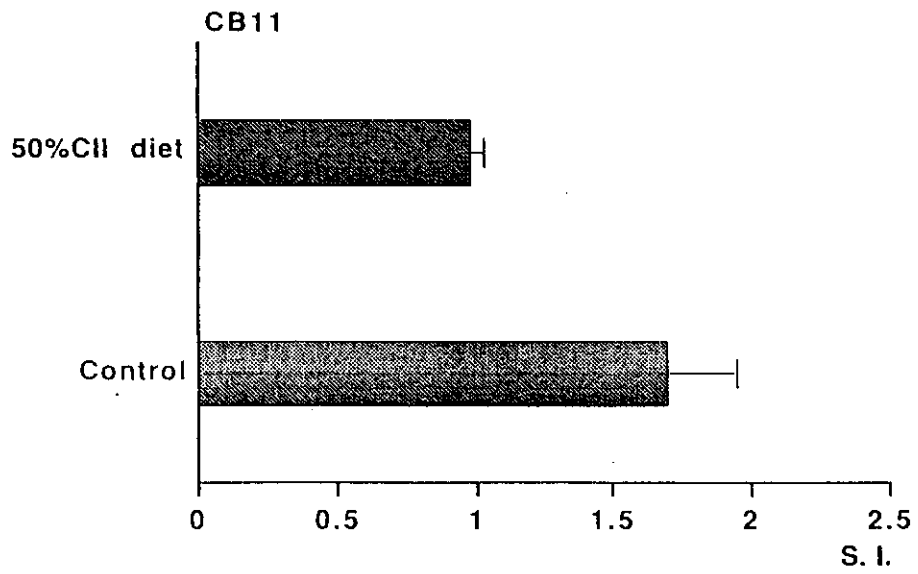
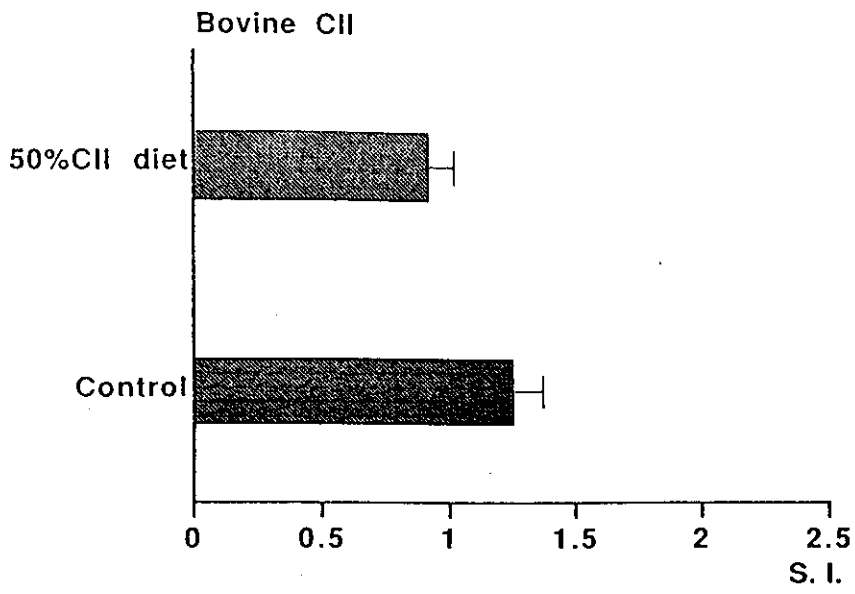
☒ 7

Antibody production in 50%CII diet fed mice and control mice



Anti-bovine CII IgG2a and IgG2b antibody production in 50%CII diet fed mice and control mice

☒ 8



... T cell proliferative response to bovine CII and CB11 in 50%CII diet fed mice and control mice

☒ 9