

食物アレルギーの予防等に関する研究

目次

アレルギー部門

食物アレルギーの予防等に関する研究	東北大学大学院医学系研究科病理学講座 教授	名倉 宏	(25)
粘膜免疫のアレルギーへの応用に関する研究	大阪大学微生物病研究所 教授	清野 宏	(28)
T細胞抗原レセプタートランスジェニックマウスを用いた経口摂取アレルギーに対する腸管免疫応答の解析	東京大学大学院農学生命科学研究科教授	上野川 修一	(31)
新生児消化管の免疫学的発達に関する研究	北海道大学医学部小児科 教授	小林 邦彦	(35)
アレルギー反応性臍帯血T細胞の機能	千葉大学医学部小児科 教授	河野 陽一	(38)
消化管粘膜機能の成熟 — 粘膜免疫機能の神経内分泌による制御と水代謝 —	東北大学大学院医学系研究科病理学講座 教授	名倉 宏	(41)
ストレス・消化管運動とアレルギー・消化管免疫に関する研究	東北大学大学院医学系研究科人間行動学 教授	福土 審	(44)
鶏卵アレルギー患者末梢血単核球IL-4産生のペプシン処理オボムコイドによる修飾	藤田医科大学医学部小児科助教授	宇理須 厚雄	(47)
食物アレルギー用血清保存システムの構築に関する調査研究	国立医薬品食品衛生研究所食品部長	豊田 正武	(51)
食物アレルギー対策検討委員会報告	昭和大学医学部小児科 教授	飯倉 洋治	(54)

食物アレルギーの予防等に関する研究

主任研究者 名倉 宏
東北大学大学院医学系研究科病理学講座教授

研究要旨

本研究班では食物アレルギーの実態を把握するとともに、食物アレルギーの病因病態の解明とその予知・予防ならびに治療法の確立を目的に、平成11年度も平成10年度に引き続き研究計画にのっとり、研究の概要に記載した研究課題に関して、分担研究者とその研究協力者が密接な連携の許で研究を推進した。

食物アレルギーの発症機序と病態に関する研究が粘膜免疫機構からすすめられ、ヒトの症例に近い実験動物系が確立しつつあり、アレルギー学会にも報告され高い評価を受けた。また、その発症に重要な役割を果している消化管粘膜 T 細胞の研究が進んだ。臍帯血中の T 細胞の検索から新生児期において食物アレルギーの発症リスクの予知が可能となり、また、乳児期の母乳を介した感作機序の解明もすすみ、予防への手がかりが得られつつある。一方、臨床面では、心身医療と神経内分泌からの研究から食物アレルギーの主要な症状である消化管運動異常の一部が消化管粘膜のアレルギー反応に起因し、またそれらと視床下部ホルモン(CRH)との関連が明らかになり、またそれによって分泌が制御されているステロイドホルモンによる水代謝と消化管マクロファージ機能の修飾機序の解明が進んだ。本研究班のもう一つの柱である血清バンクの構築に関しては拠点施設を確保でき、国立医薬品食品衛生研究所および協力施設の倫理委員会の承諾を得て血清収集が始まった。それを受け行政および国民への食物アレルギー情報提供システムの検討が開始された。

分担研究者

清野 宏	大阪微生物研究所 免疫・生体防御研究分野教授
上野川修一	東京大学大学院 農学生命科学研究科教授
小林 邦彦	北海道大学医学部小児科
河野 陽一	千葉大学医学部小児科教授
福土 審	東北大学大学院医学系研究科 人間行動学教授
宇理須厚雄	藤田保健衛生大学医学部 小児科助教授
飯倉 洋治	昭和大学医学部小児科教授
豊田 正武	国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究協力者

柳原 行義	国立相模原病院臨床研究部 室長
加藤 晴一	東北大学医学部附属病院 小児科講師
近藤 康人	藤田保健衛生大学医学部
中山 俊憲	千葉大学大学院医学系研究科 免疫発生学助教授
三浦総一郎	防衛医科大学第二内科教授
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科 病理学教授

A. 研究目的

本研究班では食物アレルギーの実態を把握するとともに、食物アレルギーの病因病態の解明とその予知・予防ならびに治療法の確立を目的に、平成11年度も平成10年度に引き続き研究計画にのっとり、研究の概要

に記載した研究課題に関して、分担研究者とその研究協力者が密接な連携の許で研究を推進した。食物アレルギーは、刻々と状況が変化し、かつ全国的課題であるだけに、研究・教育機関と行政との、これまで以上の有機的な密な連携が望まれていることを痛感するとともに、特に食物アレルギー発症の予知と将来新たに国民が口にしなければならない食品の検定用食物アレルギー用血清バンクの実現と運用開始ならびに国民への食物アレルギー関連情報システムの構築は緊急課題であった。

B. 研究の概要と組織

本研究班の食物アレルギー克服と予防のための研究は、その実態調査とともに、①食物アレルギーを惹起させるアレルゲン構造と、それらに対する生体の反応機構の解明のための実験動物の確立、それをういた食物アレルギー発症機序の解明と食品アレルゲン性の評価法の確立、②粘膜免疫機構と消化吸収機構の成熟過程の解明とそれに基づいた粘膜バリア機構の強化法の提言、③食物アレルギーの根本的な制御のための、粘膜免疫機構の主要な機能である経口免疫寛容を利用した経口粘膜ワクチン開発のための理論的構築と全国規模の予防政策確立のための食物アレルギー用血清バンク構築を、3本の柱として研究組織を構築し、研究が遂行されてきた。

それぞれ所定の成果をあげ学術論文として公表されつつあるが、平成11年度はこれらの研究課題を継続するとともに、新たに①アナフィラキシー症状を呈した患者ならびに原因食品の調査研究とその解析、食品表示へ

の情報提供、②近年社会的関心の高い、内分泌攪乱物質の主役をなすステロイドホルモンの影響の解明と、心身医療からの原因の解明と対策に関する研究、③遺伝子組換え食品によるアレルギー発生の有無を予知すること、及び食物アレルギー等の患者について新規蛋白質との交差反応性の有無を検知することを目的とした、食物アレルギー用の血清バンク実現へのプロコールを作製と血清の収集組織の確立、および国民への食物アレルギー関連情報の提供システムの構築の為のパイロット組織を国立食品衛生研究所に作ることを目指した。

研究組織は、小児科領域のアレルギー専門医と心身医療の専門医のほか、粘膜免疫の基礎研究、食物アレルギーの動物モデル系の開発、および経口粘膜ワクチン開発を担う基礎医学研究者、アレルゲンの分子構造の解析ならびにそれらに対する免疫反応機構を専門とする農芸化学者、栄養学者で構成した。

C. 研究成果

研究の概要に記載し研究課題に関して、分担研究者とその研究協力者、および班長が指名した研究協力者と密接な連携の許で研究を推進した。また、重篤なアレルギー反応を惹起させる食品の調査研究、国民が新たに口にしなければならぬ食品の検定の為の血清バンクの構築等、食物アレルギーが刻々と状況が変化し、かつ全国課題であるだけに、研究・教育機関と行政との、これまで以上の有機的なかつ密な連携が望まれていることを痛感した。

食物アレルギーの発生機序と病態に関する研究が、粘膜免疫機構からすすめられ、ヒトの症例に近い実験動物系が確立しつつあり、アレルギー学会にも報告され高い評価を受けた。また、その発症に重要な役割を果たしている消化管粘膜 T 細胞の研究が進んだ。臍帯血中の T 細胞の検索から新生児期において食物アレルギーの発症リスクの予知が可能となり、また、乳児期の母乳を介した感作機序の解明もすすみ、予防への手がかりが得られつつある。一方、臨床面では、心身医療と神経内分泌からの研究から食物アレルギーの主要な症状である消化管運動異常の一部が消化管粘膜のアレルギー反応に起因し、またそれらと視床下部ホルモン (CRH) との関連が明らかになり、またそれによって分泌が制御されているステロイドホルモンによる水代謝と消化管マクロファージ機能の修飾機序の解明が進んだ。

本研究班のもう一つの柱である血清バンクの構築に関しては拠点施設を確保でき、国立医薬品食品衛生研究所および協力施設の倫理委員会の承諾を得て血清収集が始まった。それを受け行政および国民への食物アレルギー情報提供システムの検討が開始された。

I. 食物アレルギー受験動物の確立と、それを用いた粘膜機構の基礎研究からの食物アレルギー発症機序

1) BACB/C マウス、STAT6^{-/-}マウス、TCR γ ^{-/-}マウスを用い、経口投与された食物抗原(OVA)に対して抗原特異的に大腸に局限したアレルギー反応とそれに引き続く下痢症状が誘導されるという新しい実験モデルが開発された。(清野分担研究者)。

2) OVA-TCR-Tg の経口摂取アレルゲンに対する消化管アレルギーモデルとしての有用性が確認され、粘膜固有層における T 細胞応答が腸管炎症に関与する可能性が示された。(上野川分担研究者)。

II. 食物アレルゲン反応性 T 細胞の解析と食物アレルギーの予知と予防、治療

1) 臍帯血中 T 細胞を牛乳蛋白で刺激した際の T 細胞上の α E γ 7 インテグリン発現の有無と非特異的的刺激 T 細胞による IL-5 産生が、哺乳開始後の牛乳蛋白による腸管アレルギーの予知として有用であることを明らかにした(河野分担研究者)。

2) 腸粘膜由来のリンパ球は、卵白アルブミン抗原特異的に刺激された、いわゆる clonal anergy の状況下ではこの絨毛粘膜への接着も抑制されており、食物アレルギーでのリンパ球ホーミングの変化が想定された(三浦研究協力者)。

3) 未処理のオボムコイドと比べると鶏卵アレルギー患者末梢血単核球からのペプシン処理によって低分子化したオボムコイド(pepsin-OM)が、寛解導入に有効であることが示唆された。(宇理須分担研究者)。

4) 乳児期に母乳を介して卵白、牛乳、小麦および大豆など多くの食物抗原に感作された患児では、IL-4 レセプター α 鎖遺伝子の 501-V 多型は V タイブが多く、食物アレルギーで出現頻度が高い 50V タイブは γ c 鎖との相互作用を介して IgE 抗体の多様性の獲得に関与していると考えられた(柳原研究協力者)。

5) カルシニューリンの活性化阻害剤である FK506 には抗 I 型アレルギー作用があり、その作用メカニズムも明らかになった(中山研究協力者)。

III. 粘膜免疫機構の発達と食物アレルギー

1) 乳幼児期に多い食物アレルギーの予防や治療を考えるにあたり、新生児に適切な質と量の食物抗原を負荷することが重要であり、中心静脈栄養を余儀なくされるような新生児においても、なるべく消化管から栄養することが必要であることを明らかにした。(小林研究分担者)。

2) *Helicobacter pylori* は胃疾患だけでなく、慢性蕁麻疹や食物アレルギーとの関連が示唆されており、乳幼児期からのスクリーニング検査が必要と思われる。尿中 ELISA 法は有用で、今後の臨床応用が期待された

(加藤研究協力者)。

IV. 食物アレルギーの心身医学からのアプローチ、粘膜免疫機構の神経内分泌制御

1) ストレス関連疾患である過敏性腸症候群 (IBS) の大腸粘膜において、macrophage barrier が破綻し、好酸球が増加していた。食物アレルギーは消化管免疫異常であり、ストレスが脳腸相関により消化管運動と知覚に影響する IBS と食物アレルギーの関連が明らかとなった。(福土分担研究者)。

2) 水分吸収や粘膜免疫といった消化管の重要な機能が、 11β HSD2 や urocortin 等の内分泌的制御を受けている可能性が今回の実験から示された。ステロイド治療の意義を含め、新たな手がかりになるものと考えられた(笹野研究協力者、名倉主任研究者)。

V. 食物アレルギーの実態調査と対策のための食物アレルギー用血清保存システムの構築

1) 食物アレルギー実態調査から即時型の多くが小児で、3歳までに 64.2%の症例が集まっていた。その後加齢に伴い頻度は急激に減少するが、20歳以降で総計 11.8%の症例が認められ、成人でも注意が必要な病気といえる(飯倉研究分担者)。

2) 発症平均が 19歳と高齢であった口腔アレルギー症候群(OAS)について検討を行った。OAS は女性に多く、鼻炎の合併率が高かったが、トマトとスギの共通抗原性につき RAST-inhibition で証明し、経気道感作を示唆する食物アレルギーのモデルとして報告した(近藤研究協力者)。

3) 本研究課題である食物アレルギー用血清収集事業に関して、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会、平成 11 年 11 月に承認が得られており、協力医療機関 6 機関の倫理委員会でも、すぐに1箇所承認が得られており、近いうちに、他の機関でも承認が得られる見通しで、血清収集に関する準備は、順調に進んでいる。新規食品抗原の調製も、大腸菌を用いた遺伝子操作により一部の高原で大量調製できる見込みが得られており、近いうちにモデルトライアルに着手する予定である(豊田分担研究者)。

D. 今後の課題

食物アレルギーの発生機序ならびにその治療法の為の基礎研究は、粘膜免疫機構を軸に飛躍的な成果があげられた。また食物アレルギーの総合的かつ科学的な実態調査が初めて行われ、今後の研究ならびに対策の指針を提供することができた。今後、患者の遺伝子背景や生活実態の疫学調査とそれに基づいた指導体制の確立が待たれる。さらに、ヒトの症例に近い実験動物

系が確立したことから、それを用いた食物アレルギーの遺伝レベルでの病態解明、検査法、ならびに抗アレルギー剤や粘膜ワクチンの開発の具体的な推進が次の重要課題として浮き上がった。臨床面では、心身医療および神経内分泌からの研究成果もあげられたが、さらに生活習慣の関与についての検討が望まれる。本研究班のもう一つの柱である血清バンクの構築に関しては拠点施設を確保でき、具体的な血清収集が開始されたが、今後この拠点からの食物アレルギー情報をいかに行政や国民に発信するか、そのシステムの構築が必要となった。

粘膜免疫のアレルギーへの応用に関する研究

分担研究者： 清野 宏

所属・職名： 大阪大学微生物病研究所・教授

研究協力者： 権 美那

大阪大学微生物病研究所・研究員

研究要旨

粘膜免疫システムは激しく変化する体外環境から体内環境を守り、コントロールする免疫機構の根幹と言っても過言ではない。しかしながら、アレルギーと粘膜免疫の関わりについては多くの課題が残っている。そこで、我々の研究グループは食物タンパク特異的にアレルギー性下痢が誘導されるモデルを作成し、免疫学的病態の解明を試みた。その結果、全身系免疫担当組織由来の Th2 型 CD4⁺T 細胞が大腸に局限してホーミングし IL-4、IL-13 産生などを介してアレルギー反応を惹起して下痢などのアレルギー症状を引き起こすことが強く示唆された。

A. 研究目的

食べる、飲む、吸うという生理的行為を介して様々なアレルゲンなどの異物に最初に出会い、その取り込みの是非を判断し実効しているのが体内・体外環境の接点として働く粘膜免疫システムと呼ばれる巧妙かつダイナミックな体表面での免疫機構である。外部環境から取り込む異種抗原に対して人間はこの粘膜免疫システムを介して、あるときは反応し、それを排除する。また必要に応じて無応答・無視をして外界とのバランスをとり、体内・体外環境間の調和・共存をはかっている。粘膜免疫システムは激しく変化する体外環境から体内環境を守り、コントロールする免疫機構の根幹と言っても過言ではない。しかしながら、アレルギーと粘膜免疫の関わりについては多くの課題が残っている。そこで、我々の研究グループは食物タンパク特異的にアレルギー性下痢が誘導されるモデルを作成し、免疫学的病態の解明を試みている。

B. 方法

BALB/C、SJL/J、C57BL/6、C3H/HeJ などの系統の異なるマウスや特定遺伝子を欠損させた STAT6^{-/-}マウス、TCR α 欠マウスなどを卵白アルブミン(OVA)と CFA アジュバントで全身感作する。その後、OVA を連続的に経口投与し、腸管における粘膜免疫応答とアレルギー反応を組織、細胞、タンパク、遺伝子レベルで検討する。

C. 結果:

全身感作後に OVA を経口投与した実験群(例 BALB/C、SJL/J)では下痢症状が起きた。逆に OVA 経口単独投与群では全く下痢が誘導されなかった。下痢発症群では大腸に局限して好酸球、マスト細胞、IgE 産生細胞の上昇が認められた。さらに脾臓や大腸における抗原特異的 CD4⁺Th 細胞群を解析してみると顕著な Th2 型、特に IL-4 と IL-13 の産生が認められた。しかしながら、細胞内の IL-4/IL-13 発現カスケードが欠損している STAT6^{-/-}マウスでは全く下痢の誘導が起きなかった。

D. 考察:

全身感作された個体では経口投与された食物抗原(OVA)に対して抗原特異的に大腸に局限したアレルギー反応とそれに引続く下痢症状が誘導されるという新しい実験モデルが開発された。このユニークなモデルを使用する事で全身感作された IL-4、IL-13 産生 CD4⁺Th2 型細胞群が選択的に大腸にホーミングして局所におけるアレルギー反応の誘導に深く関与するメカニズムの解明を進めている。例えば、全身感作した GFP 発現マウスから脾臓由来の CD4⁺T 細胞を分離して CSID マウスに移入し、OVA を経口投与すると選択的に大腸へのホーミングが認められた。さらに、STAT-6 遺伝子欠損マウスの結果は IL-4、IL-13 産生 Th2 型細胞の重要性をさらに強く示唆している。

E. 結論:

全身系免疫担当組織由来の Th2 型 CD4⁺T 細胞が大腸に局限してホーミングし IL-4、IL-13 産生などを介してアレルギー反応を惹起して下痢などのアレルギー症状を引き起こすことが強く示唆された。

F. 研究発表

1. Kweon, M-N., Fujihashi, K., Wakatsuki, Y., Koga, T., Yamamoto, M., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 1999. Mucosally-induced systemic T cell unresponsiveness to ovalbumin requires CD40L-CD40 interactions. *J. Immunol.* **162** : 1904-1909.
2. Fujihashi, K., Doi, T., Kweon, M-N., McGhee, J.R., Cooper, M.D., Tonegawa, S. and Kiyono, H. 1999. γ δ T cells are not essential for oral tolerance induced by large dose of ovalbumin, while regulate IL-10-mediated small dose systemic unresponsiveness. *Int. Immunol.* **11** : 1907-1916.
3. Takahashi, I., Iijima, H., Katashima, R., Itakura, M. and Kiyono, H. 1999. Clonal expansion of β β T cells intestinal inflammatory regions of T cell receptor α -chain deficient mice. *J. Immunol.* **162** : 1843-1850.
4. Iijima, H., Takahashi, I., Kishi, D., Kim, J-K., Kawano, S., Hori, M. and Kiyono, H. 1999. Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of Th2 dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor α -deficient mice. *J. Exp. Med.* **190** : 607-616.
5. Dohi, T., Fujihashi, K., Rennert, P.D., Iwatani, K., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 1999. Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and Th2 helper-type responses. *J. Exp. Med.* **189** : 1169-1179.
6. Hiroi, T., Yanagita, M., Iijima, H., Iwatani, K., Yoshida, T., Takatsu, K. and Kiyono, H. 1999. Deficiency of IL-5 receptor α chain selectively influences on the development of the communitary mucosal immune system independent IgA producing B-1 cells in mucosal-associated tissues. *J. Immunol.* **162** : 821-828.
7. van Ginkel, F.W., Wahl, S.M., Kearney, J.F., Kweon, M-N., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 1999. IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF- β 1 knockout mice. *J. Immunol.* **163** : 1951-1957.
8. Boyaka, P.N., Marinaro, M., Jackson, R.J., Menon, S., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 1999. Interleukin 12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J. Immunol.* **162** : 122-128.
9. Yanagita, M., Hiroi, T., Kitagaki, N., Hamada, S., Ito, H., Shimauchi, H., Murakami, S., Okada, H. and Kiyono, H. 1999. Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity : fimbriae-specific Th1 and Th2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. *J. Immunol.* **162** : 3559-3565.
10. Marinaro, M., Boyaka, P.N., Jackson, R.J., Finkelman, F.D., Kiyono, H., Jirillo, E. and McGhee, J.R. 1999. Use of intranasal IL-12 to target predominantly Th1 responses to nasal and Th2 responses to oral vaccines given with cholera toxin. *J. Immunol.* **162** : 114-121.
11. Kurono, Y., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Kodama, S., Suzuki, M., Mogi, G., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 1999. Nasal

- immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J. Infect. Dis.* **180** : 122-132.
12. McGhee, J.R., Kiyono, H., Kubota, M., Kawabata, S., Miller, C.J., Lehner, T., Imaoka, K. and Fujihashi, K. 1999. Mucosal Th1-versus Th2-type responses for antibody or cell mediated immunity to SIV rhesus macaques. *J. Infect. Dis.* **179** : 5480-5484.
 13. Mbawuike, I.N., Fujihashi, K., DiFavio, S., Kawabata, S., McGhee, J.R., Couch, R.B., and Kiyono, H. 1999. IL-12 modulate IFN- γ synthesis and influenza-specific cytotoxic activity by human CD45RO⁺ but not CD45RA, CD8⁺ T cells. *J. Infect. Dis.* **180** : 1477-1486.
 14. Yamamoto, M., Kiyono, H., Yamamoto, S., Batanero, E., Kweon, M-N., Otake, S., Azuma, M., Takeda, Y. and McGhee, J.R. 1999. Direct effects on antigen-presenting cells and T lymphocytes explain the adjuvanticity of a nontoxic cholera toxin mutant. *J. Immunol.* **162** : 7015-7021.
 15. Pascual, D.W., Hall, S., Hone, D.M., van Ginkel, F.W., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Powell, R.J., Wu, S., VanCott, J.L., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 1999. Extracellular expression of recombinant enterotoxigenic colonization factor antigen I by *Salmonella* elicits distinct T helper 2 followed by T helper 1 cell responses. *Infect. Immun.* **67** : 6249-6256.
 16. Host, D.F., Kemp, E.B., Marinaro, M., Cruz, O., Kiyono, H., McGhee, J.R., Belisle, J.T., Milligan, T.W., Miller, J.P. and Belshe, R.B. 1999. A double-blind, placebo-controlled study of Mycobacterium-specific human immune responses induced by intradermal bacille Calmette-Guerin vaccination. *J. Lab. Clin. Med.* **134** : 244-252.
 17. Sugimoto, M., Shimaoka, M., Taenaka, N., Kiyono, H. and Yoshiya, I. 1999. Lymphocyte activation is attenuated by stellate ganglion block. *Regional Anesthesia and Pain Medicine.* **24** : 30-35.
 18. Tori, M., Ito, T., Yumiba, T., Maeda, A., Sawai, T., Miyasaka, M., Kiyono, H., Matsuda, H., Nozawa, M. and Shirakura, R. 1999. Significant role of intragaft lymphoid tissues in preventing insulin-dependent diabetes mellitus recurrence in whole pancreaticoduodenal transplantation. *Micro Surgery.* **19** : 338-343.
 19. Tori, M., Ito, T., Uchikoshi, F., Yumiba, T., Sakakida, T., Miyasaka, M., Kiyono, H., Matsuda, H., Nozawa, M. and Shirakura, R. 1999. IL-4 production in IDDM-nonrecurrent pancreas-transplanted BB rats with donor-derived NKR-P1⁺ TCR α β ⁺(NKT) cells but not in IDDM-recurrent BB rats. *Transplantation Proceedings.* **31** : 1940-1941.
 20. Saitoh-Inagawa, W., Hiroi, T., Yanagita, M., Iijima, H., Uchio, E., Ohno, S., Aoki, K. and Kiyono, H. 2000. Immunological characterization of lacrimal glands as a part of mucosal immune network. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **41** : 138-144.
 21. Higuchi, K., Fujihashi, K., Kweon, M-N., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2000. Comparison of inhibitory effects of intranasal and oral administration of bovine type II collagen on collagen induced arthritis in DBA1/J mice. *J. Rheumatol.* (in press)

T細胞抗原レセプタートランスジェニックマウスを用いた
経口摂取アレルゲンに対する腸管免疫応答の解析

分担研究者 上野川修一 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

これまでの研究で卵白アルブミン特異的T細胞抗原レセプターを発現するトランスジェニックマウス(OVA-TCR-Tg)に卵白飼料を長期間摂取させると血中 IgE 応答が誘導され、腸管においてもゴブレット細胞、クリプトの過形成等の組織変化が観察されることを明らかにした。本研究では卵白飼料を摂取させた OVA-TCR-Tg の小腸において、好酸球、好中球、マクロファージなどの炎症細胞の絨毛への浸潤を認め、本実験系の消化管アレルギーモデルとしての有用性が確認された。卵白飼料を摂取したマウスにおいては小腸粘膜固有層リンパ球(LPL)の IL-4、大腸 LPL の IL-5、IL-6 分泌能が更新しており、IgE 応答や炎症との関係が示唆された。一方食物アレルギーの発症機構を明らかにするためには腸管免疫応答の誘導機構を明らかにすることが重要であるが、これまでの研究で OVA-TCR-Tg 細胞の *in vitro* 培養系を用いてパイエル板 (PP) におけるサイトカイン分泌応答について解析し、抗原刺激に対する IL-5、IL-6 分泌応答が脾臓と比較して高いことが観察された。本研究では、PP における高 IL-5 分泌は B 細胞以外の抗原提示細胞により誘導されることが示され、この応答に IL-2 が関与することが示唆された。一方、IL-6 分泌に関しては、PP 樹状細胞を抗原提示細胞として T 細胞を刺激した場合、脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした場合と比較して高く、また、未感作型 (CD62L 高発現) PPCD4⁺T 細胞は脾臓未感作型 CD4⁺T 細胞と比較して高い IL-6 分泌を示した。

A. 研究目的

これまでの研究で卵白アルブミン特異的 T 細胞抗原レセプターを発現するトランスジェニックマウス(OVA-TCR-Tg)に卵白飼料を長期間摂取させると血中 IgE 応答が誘導され、腸管においてもゴブレット細胞、クリプトの過形成等の消化管アレルギー様変化が観察されることが明らかにした。また、卵白飼料摂取によりパイエル板 (PP)や小腸上皮において T 細胞応答が誘導されることも示した。本年度はこのマウスにおける卵白感作による腸管の変化について組織学的検討をさらに進め、粘膜固有層リンパ球(LPL)の応答性について検討した。

一方食物アレルギーの発症機構を明らかにするためには腸管免疫応答の誘導機構を明らかにすることが重要である。これまでの研究で OVA-TCR-Tg 細胞の *in vitro* 培養系を用い

て PP におけるサイトカイン分泌応答について解析し、抗原刺激に対する IL-5、IL-6 分泌応答が脾臓と比較して高いことが観察された。そこでこれらの応答について詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 卵白飼料を摂取した OVA-TCR-Tg の腸管における組織学的検討および LPL 応答の解析：OVA-TCR-Tg に 20%卵白タンパク質を含む飼料を摂取させ、小腸切片の染色を行った。また、LPL を分離し、*in vitro* 抗原刺激に対するサイトカイン分泌を測定した。

2. PP の IL-5、IL-6 分泌能の解析：OVA-TCR-Tg マウス由来 T 細胞を BALB/c 由来の PP 細胞を抗原提示細胞として抗原刺激し、IL-5 分泌を調べた。その際、抗原提示細胞としては B 細胞を除去した PP 細胞 (B220 陽性細胞を MACS で除去)、あるいはセルソータ

ーを用いて B 細胞 (B220 陽性細胞) または樹状細胞 (B220 陰性, CD11c 陽性細胞) を分離した場合について検討した。さらに樹状細胞の抗原提示による IL-6 分泌誘導についても検討した。また, OVA-TCR-Tg マウスパイエル板細胞から CD62L 高発現 PPCD4⁺T 細胞を分離し, 抗原刺激に対する, または抗 CD3 抗体刺激に対する IL-6 分泌能を調べた

C. 研究結果

1. 卵白飼料摂取による OVA-TCR-Tg 小腸の組織学的変化および LPL の応答

卵白飼料を摂取させた OVA-TCR-Tg の小腸において, 好酸球, 好中球, マクロファージなどの炎症細胞の絨毛への浸潤を認め, 炎症が確認された。一方, 卵白飼料を摂取させたマウスにおいて小腸 LPL の抗原刺激に対する IL-4 分泌能が亢進しており, 大腸 LPL の IL-5, IL-6 分泌能が大きく亢進した (図 1)。

2. PP のサイトカイン分泌応答の解析

(1) IL-5 分泌応答: IL-5 分泌は PP 細胞を抗原提示細胞として用いた場合の方が, 脾臓細胞を抗原提示細胞に用いた場合と比較して高かった (表 1)。また, B 細胞を除去した PP 細胞を抗原提示細胞とした場合に認められた (表 1) が B 細胞, 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合は認められなかった (図 2)。一方, PP 細胞の IL-5 分泌は IL-2 の添加で亢進, 抗 IL-2 抗体の添加で阻害され, PP の IL-5 分泌には IL-2 が関与することが示唆された (図 3)。

(2) IL-6 分泌応答: PP 樹状細胞を抗原提示細胞として T 細胞を刺激した場合, 脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした場合と比較して IL-6 分泌が高かった (図 2)。また, 未感作型 (CD62L 高発現) PPCD4⁺T 細胞は脾臓未感作型 CD4⁺T 細胞と比較して, 抗原で刺激した場合も (図 4) 抗 CD3 抗体で刺激した場合も (データ省略) 高い IL-6 分泌を示した。

D. 考察

卵白飼料を摂取させた OVA-TCR-Tg において強い抗原特異的 IgE 応答が認められ, またこのマウスの小腸において, ゴブレット細胞の過形成, 絨毛の短縮, 変形, クリプトの過

形成が観察されることを昨年度の本研究で明らかにした。本年度の研究では, さらに好酸球, 好中球, マクロファージなどの炎症細胞の絨毛への浸潤を認め, 炎症が確認された。このマウスの食物アレルギーモデルとしての有用性が再確認された。

この実験系において PP や腸管上皮において T 細胞応答が誘導されることを昨年度までの本研究で明らかにしている。本年度はさらに小腸 LPL の抗原刺激に対する IL-4 分泌能が亢進しており, IgE 応答や炎症との関連が示唆された。また, 卵白飼料摂取により大腸 LPL の IL-5, IL-6 分泌能が大きく亢進した。今後大腸においても組織変化を解析することが興味深いと思われる。

本実験系は, 食物アレルギーにおいて腸管におけるアレルゲン特異的 T 細胞応答が大きく関与していることを示唆するものであるが, 腸管における T 細胞誘導機構については未だ不明な点が多い。前年度までの本研究より PP 細胞による抗原提示を受けた T 細胞は, IFN- γ を強く産生し IL-4 IL-10 はほとんど産生しない細胞に分化することを見出した。本年度はさらに PP における高 IL-5 分泌は B 細胞以外の抗原提示細胞により誘導され, この応答に IL-2 が関与することが示された。一方, PP 樹状細胞を抗原提示細胞として T 細胞を刺激した場合, IL-6 分泌が脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした場合と比較して高かった。さらに未感作型 (CD62L 高発現) PPCD4⁺T 細胞は脾臓未感作型 CD4⁺T 細胞と比較して, 抗原刺激をした場合も抗 CD3 抗体で刺激した場合も, 高い IL-6 分泌を示し, PPCD4⁺T 細胞は抗原未感作の状態でも IL-6 分泌能が高い性質を有することが示された。これらの結果より PP における高 IL-6 分泌には樹状細胞の IL-6 誘導能, 未感作型 CD4⁺T 細胞の高い IL-6 分泌能が関与することが示された。

E. 結論

OVA-TCR-Tg の経口摂取アレルゲンに対する消化管アレルギーモデルとしての有用性が確認され, 粘膜固有層における T 細胞応答が腸管炎症に関与する可能性が示された。また,

PP における高 IL-5 分泌は B 細胞以外の抗原提示細胞により誘導され、この応答に IL-2 が関与することが示された。一方、PP における高 IL-6 分泌には樹状細胞の IL-6 誘導能、未感作型 CD4⁺T 細胞の高い IL-6 分泌能が関与することが示された。

F. 発表論文

- 1) Ise, W. et al. Primary response of naive CD4⁺T cells to amino-acid-substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns in terms of cytokine secretion and helper activity for antibody production. *FEBS letters* 465, 28-33 (2000).
- 2) Toda, M. et al. Down-regulation of antigen-specific antibody production by TCR antagonist peptides in vivo. *Eur. J. Immunol.* 30, 403-414. (2000)
- 3) Shida, K. et al. Serum IgE response to orally ingested antigen: A novel IgE^r response model using allergen-specific T cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* in press.
- 4) Hashiguchi, M. et al. Th2 polarization enhanced by oral administration of higher doses of antigen. *Cytotechnology* in press.

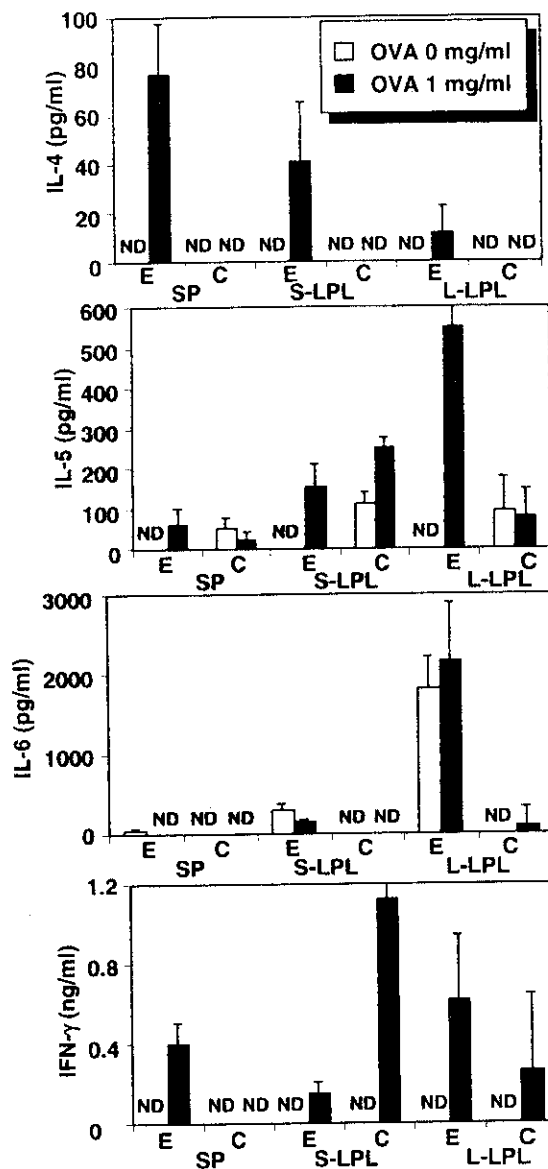


図1. 卵白飼料またはコントロール飼料摂取のOVA-TCR-Tg由来脾臓、小腸LPLおよび大腸LPLにおけるサイトカイン産生パターンSPL, 脾臓細胞; S-LPL, 小腸LPL; L-LPL, 大腸LPL; C, コントロール飼料; E, 卵白飼料. ND, 検出限界以下.

表1. 脾臓, パイエル板細胞による抗原提示による IL-5 産生誘導

抗原提示細胞	抗原刺激なし (pg/ml)	抗原刺激あり (pg/ml)
脾臓細胞	<125	258.6
パイエル板細胞	222.6	532.3
パイエル板 B 細胞	<125	<125
パイエル板非 B 細胞	<125	289.5

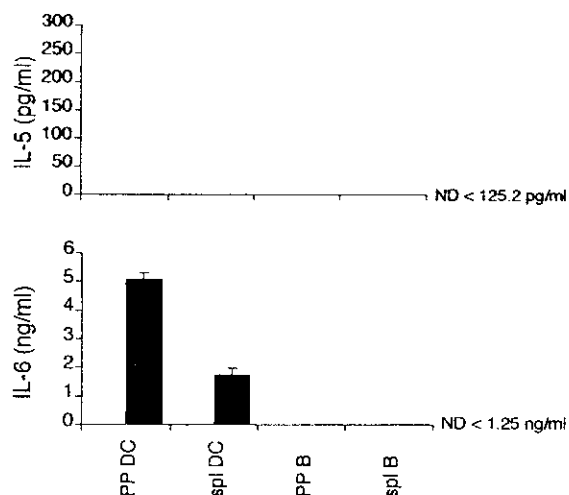


図2. PP 樹状細胞または脾臓樹状細胞の抗原提示によるサイトカイン産生

spl: 脾臓、DC: 樹状細胞

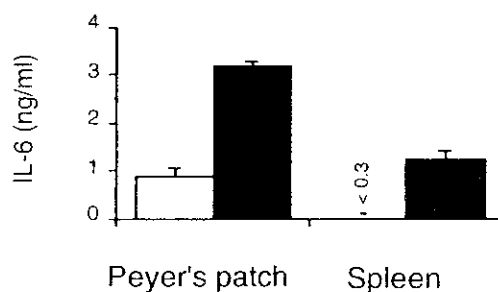


図4. PP または脾臓由来未感作型 CD4⁺T 細胞の IL-6 分泌

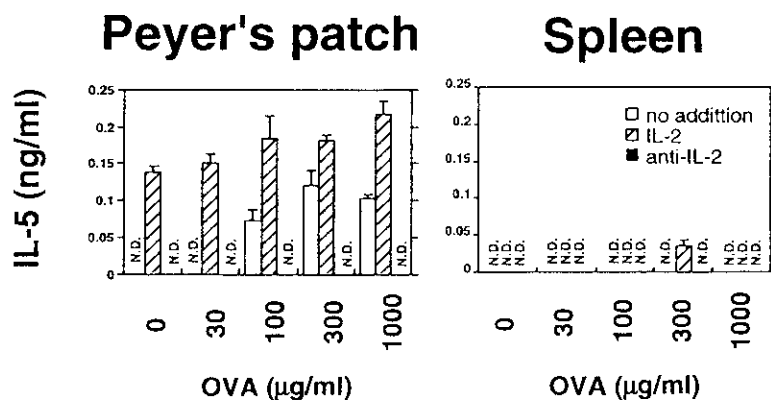


図3. PP 細胞の IL-5 分泌に対する IL-2 の影響

新生児消化管の免疫学的発達に関する研究

分担研究者 小林 邦彦¹⁾

研究協力者 窪田 満²⁾

¹⁾北海道大学医学部小児科学教室教授

²⁾北海道大学医学部小児科学教室医員

研究要旨

我々は小児外科領域で手術的に採取された新生児消化管の検体を用い、消化管免疫の発達について検討した。出生直後の消化管粘膜とそれ以降の消化管粘膜を比較すると、生後2ヶ月までの間に絨毛が伸び、粘膜固有層の浮腫がとれ、成人レベルのIgA₁⁺およびIgA₂⁺形質細胞の局在が認められた。IgA産生前はCD80 (B7-1)もCD86 (B7-2)もその発現は弱いものだったが、IgA⁺形質細胞が増加するにつれて、B7 family 陽性細胞が増加する傾向があった。次に同様の方法で、人工肛門の口側と肛側の腸管とを比較した。人工肛門造設後2ヶ月経過した時点でも、肛側の腸粘膜は絨毛の丈も低く粘膜固有層もやや浮腫状で、粘膜が萎縮していた。さらに、肛側の粘膜固有層にはIgA⁺形質細胞はほとんど認められず、B7 familyも発現が減少していた。同一の個体であっても、使用されていない腸管の抗原提示細胞は活性化しておらず、さらに興味深いことには、そのような腸管でのIgAの産生は行われていなかった。

A. 研究目的

ヒトの消化管は、感染症やアレルギーなどの様々な事件の舞台となっている。食物アレルギーの予防や治療を考えるにあたり、ヒトの消化管の免疫学的な発達に対する理解が重要な位置を占めている。しかしながら、例えば、生後人工乳をどの時期から与えるべきであるかという問題に対しても科学的な根拠はまだ存在していない。我々は小児外科領域で手術的に採取された新生児消化管の検体を用い、科学的な消化管免疫の発達の指標を示すことをこの研究の目的とした。

我々は2年前に新生児の便中のIgAをELISAで測定した結果を報告した。栄養法に関係なく、今までの血清IgAの報告よりもかなり早期（生後1ヶ月）に既に消化管ではIgAが産生されていた。牛乳特異的便中IgAの抗体価は、人工乳で栄養されていた児の方が高いtiterの抗体価を示しており、これは生後1ヶ月で、消化管において抗原特異的な免疫反応、特にIgAを産生する系が働いていることを意味する。では、いったいどのようなメカニズムで消化管の分泌型IgAの産生が始まるのか。今回我々は、その疑問に答えるべく研究を進めた。

B. 研究方法

IgA産生のメカニズムを調べるために、我々は2種類のモデルを用いた。

まず、当院小児外科にて先天性小腸閉鎖症や胆道閉鎖症で小腸の一部を切除する手術を受けた、生後1日から2ヶ月までの6例の検体を用い、免疫組織化学的に日齢による免疫担当細胞の局在の変化を検討した。次に、同一個体での未使用の腸管と抗原刺激に晒されている腸管を比較検討するために、出生直後に人工肛門（回腸瘻）を造設された2例の患児らがそれを閉じる際に、その人工肛門の口側、即ち刺激を受けている腸管と、肛側、即ち刺激を受けていない腸管を採取し、それぞれを免疫組織化学的に比較した。以上より、外界からの抗原刺激を受ける前と後、そして出生後も抗原の刺激を受けない腸管と受け続けている腸管を比較することで、抗原刺激の重要性とその際に重要な分子について検討した。

組織は迅速に4%PLP固定液にて固定した後、凍結切片を作製し、HE染色で形態学的な比較を行った。さらに酵素抗体法で免疫組織化学的に検討した。抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD20、抗CD68、抗HLA-DR、抗IgA₁、IgA₂抗体を使用し、さらに

Co-stimulatory molecule として知られている B7 family、即ち抗 CD80 (B7-1)及びCD86 (B7-2)抗体も使用した。それらによって、T細胞、B細胞、抗原提示細胞(活性化あるいは不活性化)、IgA陽性形質細胞の局在を検討した。尚、IgA₁、IgA₂抗体はビオチン化した抗体を使用した。他の抗体は精製モノクローナル抗体を使用し、酵素抗体間接法でその局在を観察した。

C. 研究結果

出生直後の消化管粘膜とそれ以降の消化管粘膜を比較すると、生後2ヶ月までの間に絨毛が伸び、粘膜固有層の浮腫がとれて免疫担当細胞が増加していた。IgA産生形質細胞は、出生後1日の小腸粘膜ではほとんど認められなかったが、生後23日以降の消化管粘膜すべてで、成人レベルのIgA₁⁺およびIgA₂⁺形質細胞を粘膜固有層に認めた。さらに、このIgA産生の前後で、他の免疫担当細胞がどのように変化しているのかを調べた。CD3⁺T細胞に関しては出生直後から粘膜固有層及び上皮間に認められており、特に抗原刺激前に少ないということではなかった。CD20⁺B細胞も同様で、出生直後でも生後2ヶ月児と同様の局在を粘膜固有層に示していた。CD68⁺マクロファージやHLA-DR⁺細胞も、生後1日で既に粘膜固有層に広く分布していた。そこで、マクロファージの活性化の指標である B7 family の局在を、IgA 産生前後で比較検討した。IgA産生前は CD80 (B7-1) も CD86 (B7-2) もその発現は弱いものだったが、生後2ヶ月ではかなりの陽性細胞を認めた。各日齢毎に検討しても、IgA⁺形質細胞の出現と CD80 (B7-1) 陽性細胞の出現とは相関する傾向があった。一方、CD86 (B7-2)は年長児でも発現の弱いことがあった。

次に同様の方法で、人工肛門の口側、即ち刺激を受けている腸管と、肛側、即ち刺激を受けていない腸管とを比較した。人工肛門造設は出生直後に行われているので、肛側の消化管粘膜は出生後一回も食物抗原が通過していないことになる。人工肛門造設後2ヶ月経過した時点でも、肛側の小腸粘膜は絨毛の丈が低く粘膜固有層もやや浮腫状で、粘膜の萎縮を示していた。さらに、肛側の粘膜固有層には IgA⁺形質細胞はほとんど認められず、まさに出生直後の消化管粘膜の様相を呈していた。B7 family に関しても IgA と同様に、肛側の腸管での発現が減少していた。同一の個体であっても、使用されていない腸管の抗原提示細胞は活性化しておらず、さらに興味深いことには、そのような腸管でのIgAの産生は

行われていなかった。

D. 考察

最近、消化管を含めた局所免疫系が脾臓やリンパ節を中心とした全身免疫系とは異なる働きを示していることが注目されている。血清中のIgAは主に骨髄や脾臓の形質細胞由来であり、それらは粘膜下に局在する形質細胞によって産生される分泌型IgAを直接に反映しているものではないことがわかってきた。2年前に我々は新生児の便中のIgAをELISAで測定し、血清ではまだIgAが検出できない時期である生後1ヶ月で、既に消化管ではIgAが産生されていることを証明した。今回は、免疫組織学的方法で生後23日以降の新生児の消化管粘膜固有層におけるIgA₁⁺およびIgA₂⁺形質細胞の局在を証明した。

この分泌型IgAを誘導するsystemとしてcommon mucosal immune system という概念がある。ある粘膜で刺激を受けた免疫担当細胞が別の粘膜組織でもIgAを産生する、例えば回腸で抗原刺激を受けた細胞が、唾液腺や生殖器で抗原特異的IgAを産生するというsystemである。今回の結果から、刺激を受けていない消化管では common mucosal immune systemの存在もかかわらず、IgAの産生も減少していることがわかった。これはこのsystemが働く前に、消化管の免疫学的成熟が必要なことを示していると思われる。

では、消化管の免疫学的成熟とはどういう現象であろうか。CD3⁺T細胞やCD20⁺B細胞、そしてCD68⁺マクロファージやHLA-DR⁺細胞も生後1日の粘膜固有層に広く分布していた。つまり、免疫担当細胞そのものは、抗原刺激を受ける前から消化管に用意されていることになり、いつ抗原に晒されてもいいようになっていると考えられる。そして消化管への抗原刺激が始まると、そこに待機していた抗原提示細胞に B7 family が発現し、IgAの産生がスタートするということが示唆された。つまり免疫学的成熟とは、消化管への抗原刺激が始まり、消化管に用意されていた抗原提示細胞が活性化し、リンパ球に対してIgAを産生するように誘導するということであると考えられた。このことが消化管の免疫学的な発達において最初の大切な因子であり、common mucosal immune system はその成熟を前提として構築されているということが示唆された。但し、CD86 (B7-2) に関しては年長児でも発現の弱いことがあり、腸管の炎症状態と密接に関係していると思われ、今後の検討が必要と考えられた。

E. 結論

今回の結果は、新生児に適切な質と量の食物抗原を負荷することの重要性を示している。中心静脈栄養を余儀なくされるような新生児においても、なるべく消化管から栄養することが重要であり、人工肛門を閉鎖する場合も、未使用の肛側の消化管の未熟性を十分に理解した上で、食事の投与を開始するべきであると思われる。今後は消化管の発達の際に使用されるTh1/Th2サイトカインの変化に焦点をおいて研究を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Mitsuru Kubota, Christopher J. Miller, Koichi Imaoka, Kohtaro Fujihashi, Jerry R. McGhee, Hiroshi Kiyono: Oral Simian Immunodeficiency Virus Vaccine Induces Simultaneous Th1- and Th2-Type Cytokine Production in Mucosa-Associated Tissues of Nonhuman Primates. Clin. Immunol., in print (2000)

(2) 窪田 満、菊田 英明、小林 邦彦、清野 宏：食物アレルギーの成因を考える—粘膜の免疫構造—。小児科臨床, 第51巻, 1923-1930 (1998)

(3) Mitsuru Kubota, Christopher J. Miller, Koichi Imaoka, Shigetada Kawabata, Kohtaro Fujihashi, Jerry R. McGhee and Hiroshi Kiyono: Oral Immunization with Simian Immunodeficiency Virus p558^{ag} and Cholera Toxin Elicits Both Mucosal IgA and Systemic IgG Immune Responses in Nonhuman Primates. J. Immunol., 158 (11), 5321-5329 (1997)

(4) 窪田 満、藤橋 浩太郎、清野 宏：粘膜免疫と感染症予防—経粘膜ワクチンの開発—。化学と生物, 第35巻, 第6号, 415-420 (1997)

(5) 窪田 満、大谷 明夫、木村 伯子、松本 脩三、名倉 宏：小児消化管のリンパ装置における神経ペプチドの局在と産生・結合。消化器と免疫, 第29巻, 67-72 (1994)

(6) 窪田 満、木村 伯子、名倉 宏：神経内分泌と免疫機能調節。G.I. Research, 第2巻, 第4号: 440-445 (1994)

(7) 窪田 満、名倉 宏：神経—内分泌—免疫系の相関からみた粘膜免疫—神経内分泌による消化管免疫の制御。医学のあゆみ, 第170巻, 第3号: 206-207 (1994)

(8) Mitsuru Kubota, Haruo Ohtani, Noriko Kimura, Hiroshi Nagura: VIP-receptor on follicular dendritic cells in Peyer's patches of human neonates. Current Topics in Mucosal Immunology 1993: 267-270 (1994)

2. 学会発表

(1) 窪田 満、岡村 暁子、吉岡 幹朗、菊田 英明、小林 邦彦：抗原特異的分泌型IgAは乳児期早期から消化管粘膜で産生される。第35回日本消化器免疫病学会, 高松 (1998.7.3~4)

(2) 窪田 満、岡村 暁子、吉岡 幹朗、菊田 英明、名倉 宏、小林 邦彦：小児難治性下痢症における粘膜免疫学的な検討。第28回日本免疫学会, 神戸 (1998.11.30~12.4)

(3) Mitsuru Kubota, Akiko Okamura, Mikio Yoshioka, Hideaki Kikuta, Hiroshi Nagura, Kunihiro Kobayashi: A role for mucosal immunity in intractable diarrhea. 10th International Congress of Mucosal Immunology, Amsterdam (1999. 6.27~7.1)

(4) 窪田 満、小林 邦彦：小児 *H. pylori* 感染と胃粘膜局所のTh1 / Th2サイトカイン産生。第36回日本消化器免疫学会, 仙台 (1999.7.23~24)

(5) 窪田 満、岡村 暁子、吉岡 幹朗、菊田 英明、今野 武津子、小林 邦彦：小児 *H. pylori* 感染と胃粘膜局所の免疫応答。第26回日本小児栄養消化器病学会, 倉敷 (1999.9.11~12)

アレルギー反応性臍帯血T細胞の機能

分担研究者 河野陽一

千葉大学小児科教授

研究要旨

アレルギー疾患の発症にはアレルギーに反応するT細胞がきわめて重要な役割を果たしている。アレルギー反応性T細胞の機能としては、特に、アレルギー性炎症部位へのT細胞の浸潤に関与する接着分子の発現とサイトカイン産生の2つが重要と考えられる。昨年度までに、臍帯血T細胞上の $\alpha E\beta 7$ インテグリン発現が乳児期の食物アレルギーの発症予測に有用である可能性を報告した。本年度は、腸管アレルギー性炎症における重要な接着分子であると考えられる $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの臍帯血T細胞上の発現誘導を検討した。その結果、牛乳アレルギーによる腸炎または皮膚炎を発症した乳児の臍帯血T細胞上には αs -カゼイン刺激により $\alpha E\beta 7$ インテグリンの発現が強く誘導されたのに対し、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの有意な増強は認められなかった。すなわち、接着因子としては $\alpha E\beta 7$ インテグリンが現在のところもっとも有用なマーカーであると考えられる。一方、臍帯血T細胞のサイトカイン産生能については、アレルギーと抗CD28抗体ではサイトカイン産生細胞は検出されなかった。しかしながら、牛乳アレルギーを発症した患者の一部に非特異的刺激であるカルシウムイオノフォアとホルボール酸刺激によるIL-5産生細胞が同定された。以上から、食物アレルギー刺激による臍帯血T細胞上 $\alpha E\beta 7$ インテグリン発現と非特異的刺激によるIL-5産生細胞の検出の組み合わせが、食物アレルギー発症の予知に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

アレルギー疾患の発症にはアレルギーに反応するT細胞がきわめて重要な役割を果たしている。アレルギー反応性T細胞の機能としては、特に、アレルギー性炎症部位へのT細胞の浸潤に関与する接着分子の発現とサイトカイン産生の2つが重要と考えられる。我々は、本研究班において、①臍帯血中T細胞を牛乳蛋白で刺激した際のT細胞上の $\alpha E\beta 7$ インテグリン発現の有無が、哺乳開始後の牛乳蛋白による腸管アレルギーの予知として有用である、②アレルギー刺激による臍帯血T細胞上の $\alpha E\beta 7$ インテグリン発現の誘導の有無は、腸管アレルギーのみでなくアトピー性皮膚炎の発症の予知にも有用であることを明かしてきた。以上の結果は、アレルギー刺激臍帯血T細胞上の接着分子発現の検討が、食物アレルギー発症の予防に有用であることを示している。今年度は、アレルギー刺激臍帯血T細胞の他の接着分子発現とサイトカイン産生能について解析した。

B. 方法

インフォームドコンセントをとった妊婦の出産時に採取したヘパリン加臍帯血から単核球を分離し、凍結保存した。生後3カ月時に、乳児の皮疹や下痢の有無を電話で問い合わせた。このような症状の認められた乳児については、牛乳の除去・負荷試験を行って牛乳アレルギーの有無を確認した。この時点で、凍結保存しておいた臍帯血単核球を解凍し、主要牛乳蛋白である αs -カゼインとともに7日間培養し、フローサイトメトリー法によって、CD3陽性T細胞における $\alpha E\beta 7$ および $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの発現を解析した。同時に、臍帯血T細胞中のサイトカイン産生を細胞内サイトカイン染色法によって解析した。また、カルシウムイオノフォアとホルボール酸刺激による細胞内サイトカイン産生も解析した。

C. 研究結果

牛乳アレルギーによる腸炎または皮膚炎を発症した乳児の臍帯血T細胞上には αs -カゼイン刺激により $\alpha E\beta 7$ インテグリンの発現が強く

誘導されたのに対し、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの有意な増強は認められなかった(図1)。また、臍帯血T細胞をアレルゲンと抗CD28抗体で6時間刺激後にT細胞中のサイトカインを染色したが、牛乳アレルギー発症の有無に関わらず、サイトカイン産生細胞は検出されなかった(図2)。しかしながら、牛乳アレルギーを発症した患者の一部にカルシウムイオノフォアとホルボール酸刺激によるIL-5産生細胞が同定された(図3)。

D. 考察

$\alpha 4\beta 7$ インテグリンは腸管へのホーミングレセプターとして重要な接着分子であり、我々は、以前に腸管アレルギーを発症している食物アレルギー患者においては、アレルゲン刺激によって末梢血CD4陽性T細胞上の $\alpha 4\beta 7$ インテグリン発現が増強することを明らかにしている。しかしながら、今回の臍帯血T細胞の解析では、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリン発現増強は $\alpha E\beta 7$ インテグリンと同様の動態をとらなかった。また、フローサイトメトリーを用いた高感度のサイトカイン産生細胞検出法によっても、食物抗原刺激ではサイトカイン産生は認められなかった。本法によりウイルス抗原特異的サイトカイン産生細胞は検出可能であることから、今回、アレルゲン特異的臍帯血T細胞サイトカイン産生が観察されなかった理由として、対象が臍帯血T細胞であることや食物抗原の抗原性の低さなどが考えられる。しかしながら、非特異的刺激によつては食物アレルギーを発症した患者の臍帯血T細胞でのみIL-5産生細胞が検出されたことから、食物アレルゲン刺激によるT細胞上 $\alpha E\beta 7$ インテグリン発現と非特異的刺激によるIL-5産生細胞の検出の組み合わせが、食物アレルギー発症の予知に有用であることが示唆された。

E. 結論

アレルゲン刺激臍帯血T細胞上の $\alpha E\beta 7$ インテグリン発現と非特異的刺激によるIL-5産生の有無は、食物アレルギー発症の予知に有用な検査であると考えられる。

F. 研究業績

学会発表

小島博之、下条直樹、勝木利行、青柳正彦、西牟田敏之、河野陽一：ミルクアレルギーによる皮膚炎患者における抗原特異的T細胞上 $\alpha E\beta 7$ インテグリンおよびcutaneous lymphocyte antigen発現の時間的経過 第36回日本小児アレルギー学会総会 平成11年10月14日 幕張

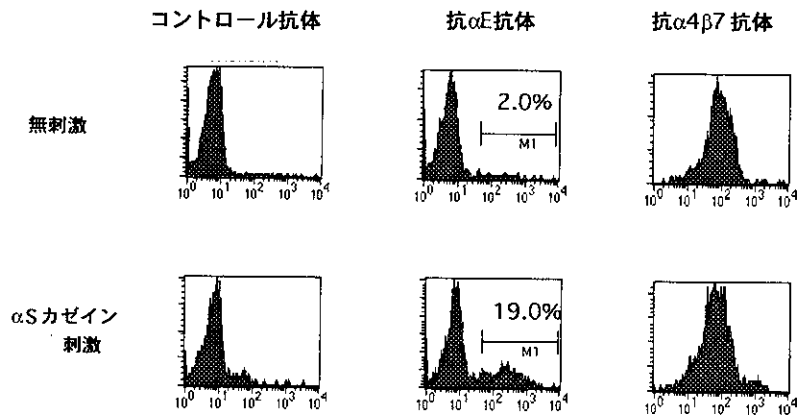


図1 食物アレルギー刺激による脾臓T細胞上のホーミングレセプター発現

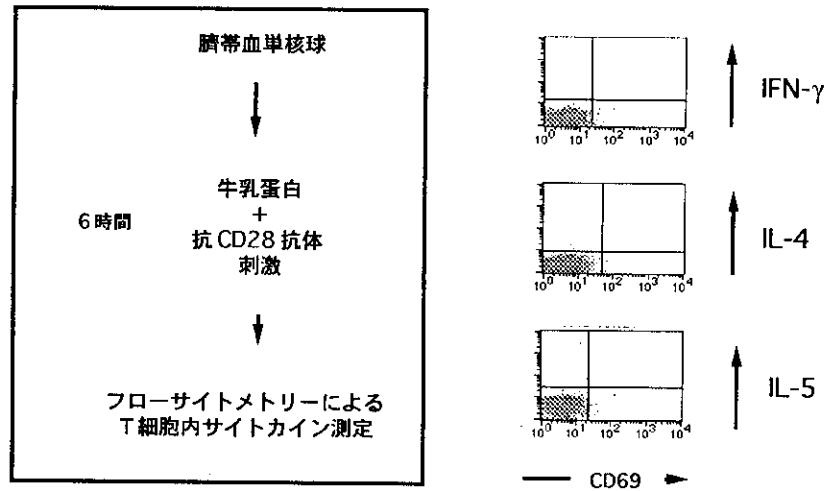


図2 抗原刺激によるT細胞内サイトカインの解析

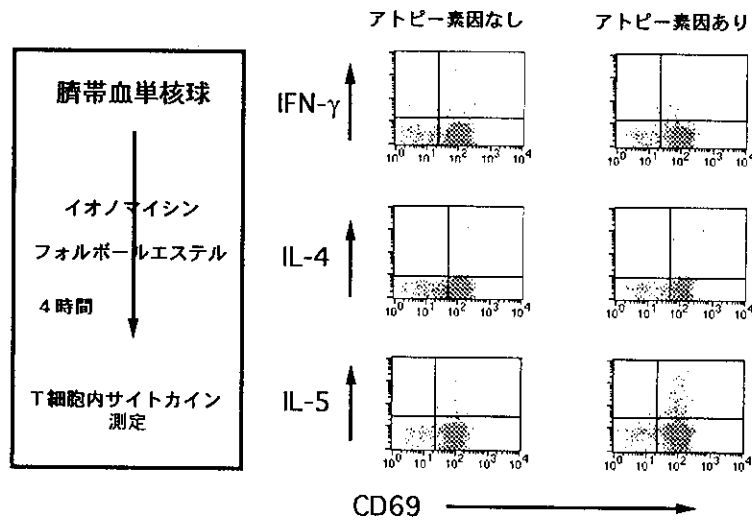


図3 非特異的刺激による脾臓T細胞のサイトカイン産生

消化管粘膜機能の成熟—粘膜免疫機能の神経内分泌による制御と水代謝

主任研究者：名倉 宏

東北大学大学院医学系研究科病理学講座教授

研究協力者：鈴木 貴、平澤 元、高橋賢一、村松康成、笹野公伸

研究要旨

食物アレルギーならびにそれに随伴する消化管粘膜障害が、粘膜免疫機構によって司られている生体防御機構の破綻により引き起こされる事が、本研究班によって明らかにされつつあるが、その病因病態に直接かかわりのある粘膜上皮細胞の水代謝機能の成熟および免疫反応の神経内分泌系による制御機構の発育については、十分解明されていない。本年度は、それに関連した内分泌代謝酵素とペプチドホルモンの消化管粘膜上皮細胞における発現を免疫組織化学的に観察した。

11 β HSD は胎生期には、嚥下した羊水の吸収を司り、出生後は大腸で水分吸収に関与している事が明らかになった。潰瘍性大腸炎等の粘膜免疫機構の破綻した状態では、その発現が減弱しており、それが下痢症の一因と思われた。

視床下部ホルモンである CRF 関連ペプチドである urocortin に炎症反応の抑制作用が知られているが、この発現は腸管粘膜固有層のマクロファージに、そのレセプターが粘膜上皮細胞と固有層のリンパ球等の単核球に認められ、粘膜免疫機構が視床下部—下垂体—副腎系によって制御されている事が示唆された。また、その発現は粘膜免疫機構の成熟と時期が一致していた。

このように、消化管粘膜の生理機能や免疫機能制御機能の成熟の遅延や異常が食物アレルギーの病因や病態に深く関わっている事が明らかになりつつある。

A. 研究目的

消化管は内分泌関連臓器としての認識は必ずしも高くなく、その方面からの研究は十分にはなされていない。しかし近年、様々な内分泌関連物質の発現が消化管において報告されてきており、消化管の免疫機能を含めた諸機能の内分泌的制御が注目されつつある。そこで今回は、ヒト消化管における 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2) 及び urocortin の発現について検討した。

(研究1):ヒト消化管における 11 β HSD2 の発現背景

11 β HSD2 は cortisol を cortisone に不活化する酵素であるが、腎臓において mineralocorticoid receptor (MR) とともに発現することも知られている。これは 11 β HSD2 が cortisol を cortisone に変換することで cortisol の MR への非特異的結合を抑制し、その結果 aldosterone 作用を選択的に高めていると考えられている。大腸は活発に水分吸収を行い、mineralocorticoid target organ の一つと考えられている。

B. 研究方法

各発育段階の健常のヒト消化管粘膜(胎生 11 週-76 才; n=36)および潰瘍性大腸炎患者大腸粘膜(10~48 才)における 11 β HSD2 及び MR の局在を

streptavidin-biotin 法を用いた免疫組織化学で検討した。また炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎; n=21, クローン病; n=16)及び対照健常粘膜(n=15)における 11 β HSD2 mRNA の発現を Northern blotting 法で、酵素蛋白の発現を免疫組織化学で検討した。これらの実験は東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

ヒト消化管では 11 β HSD2 の発現部位は MR と完全に一致していた。食道や胃では胎生期のみ上皮で 11 β HSD2 が発現していたが、大腸では出生直前より表層円柱上皮で発現し始め、出生後その強度は著明に増加した。また 11 β HSD2 の発現は、潰瘍性大腸炎の大腸粘膜において著明に減弱していたがクローン病では、その発現はほぼ維持されていた。

D. 考察

ヒト食道、胃において 11 β HSD2 は胎生期のみ発現し、嚥下した羊水の水分吸収に関与していると考えられた。一方大腸では出生直前より発現しはじめ、出生後の大腸における水分吸収に重要な役割を担っていると考えられた。また粘膜炎がその主要な病変である潰瘍性大腸炎粘膜では 11 β HSD2 の発現が著明に減弱しており、下痢症状の一因となっている可能性が示唆された。

(研究2):ヒト大腸における urocortin の発現

背景

urocortin は、1995 年に新たに同定された corticotropin-releasing factor (CRF) 関連ペプチドである。その生理作用については、rat では降圧作用や食欲抑制作用の他、炎症反応の抑制作用があること、下垂体や精巣と並び胃や大腸で高い発現を示すこと等が報告されている。

B. 研究方法

大腸癌手術標本の正常組織部分(48-89 歳; n=11)の標本を用いて、urocortin に対する免疫染色 (Streptavidin-biotin 法) 及び in situ hybridization (manual capillary action system)を行った。また、大腸の発育過程(胎生 11 週-生後 6 歳; n=35)における urocortin の発現を免疫染色で検討した。これらの実験は、東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

成人大腸組織では、免疫染色、in situ hybridization いずれにおいても urocortin は大腸上皮直下の単核球において主に陽性像を示した。次にヒト結腸粘膜より lamina propria mononuclear cells (LPMC) を分離後、urocortin と CD14 (monocyte / macrophage)あるいは leucocyte common antigen に対する flow cytometry を施行した。その結果 urocortin 陽性細胞は、LPMC のマクロファージ大の CD14 陽性細胞に主に一致し、リンパ球大の LCA 陽性細胞では陰性であった。

粘膜内の urocortin 陽性細胞は生後3ヶ月頃より発現し、成長に伴ってその数は著明に増加した。生後3ヶ月以降では、ほとんど 100%のマクロファージが urocortin 陽性を示した。更に大腸粘膜上皮細胞及び LPMC における urocortin の receptor (CRF receptor type 1 及び type 2)の発現を RT-PCR で検索した結果、CRF receptor type 1 及び 2β がいずれも LPMC で主に発現していた。

D. 考察

urocortin はヒト腸管粘膜のマクロファージにおいて生後3ヶ月より発現しはじめ、成長に伴って発現は増加し粘膜免疫機構の成熟時期に一致して完成した。urocortin のレセプターは粘膜固有層の単核細胞に発現が認められることから、urocortin は生後の消化管粘膜において上皮細胞と免疫担当細胞に

autocrine ないし paracrine 的に作用し、局所的な粘膜免疫系の制御に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

消化管は内分泌関連臓器としての認識は必ずしも高くない。しかし、水分吸収や粘膜免疫といった消化管の重要な機能が、11β HSD2 や urocortin 等の内分泌的制御を受けている可能性が今回の実験から示された。今後このような調節機構の詳細が明らかになれば、種々の消化管の炎症性ならびにアレルギー性疾患において、ステロイド治療の意義を含め、新たな手がかりになるものと考えられる。

F. 論文発表

- 1) Hirasawa G, Sasano H, Takahashi K, Fukushima K, Suzuki T, Hiwatashi N, Toyota T, Krozowski ZS, Nagura H. Colocalization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 3859-3863, 1997
- 2) Takahashi K, Sasano H, Fukushima K, Hirasawa G, Miura H, Sasaki I, Matsuno S, Krozowski ZS, Nagura H. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human colon: a new marker of fetal development and differentiation in neoplasms. *Anticancer Research* 18:3381-3388, 1998
- 3) Takahashi KI, Fukushima K, Sasano H, Sasaki I, Matsuno S, Krozowski ZS, Nagura H. Type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human colonic epithelial cells of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 44:2516-22 1999
- 4) Hirasawa G, Sasano H, Suzuki T, Takeyama J, Muramatsu Y, Fukushima K, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H, Krozowski ZS. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*