

図2-3. WC, SWC, SF, IF 画分のマイトージェン活性

WC (全菌体), SWC (破碎菌体), SF (水溶性画分), およびIF (非水溶性画分) の各画分 (10 μ g/ml) をそれぞれ脾臓細胞の培養系に添加して、マイトージェン活性を $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み値の平均値 \pm 標準偏差として示した。

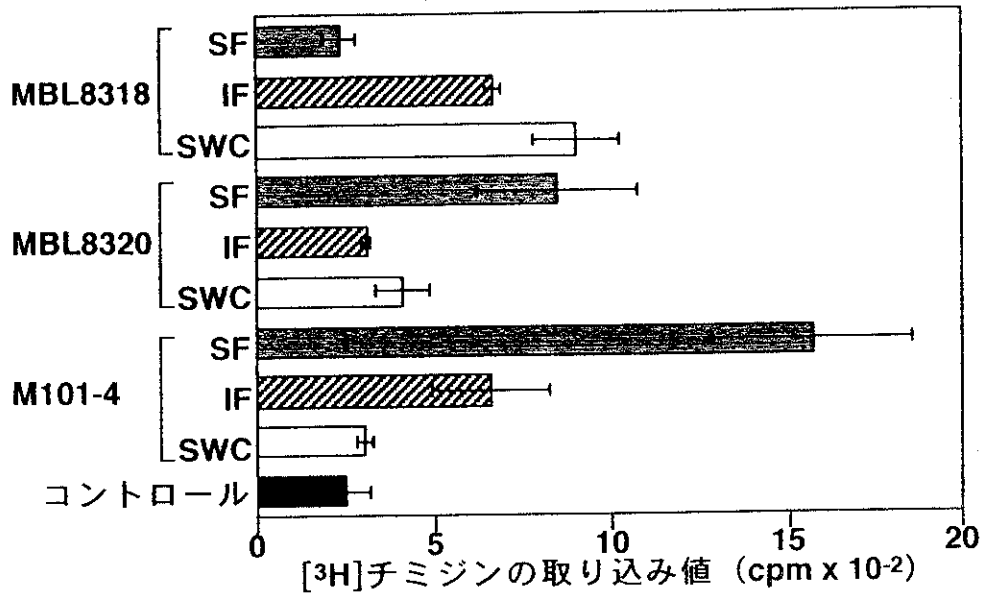


図2-4 . *Bifidobacterium* 菌体成分によるIEL増殖活性

マウスIEL培養系 (2×10^5 cells/ウェル) にそれぞれの菌体画分 (20 μ g/ml) を添加して48時間培養後, [³H]チミジンをパルスし, 20時間後の[³H]チミジンの取り込み値を測定.
SF, 水溶性画分; IF, 非水溶性画分; SWC, 破碎菌体.

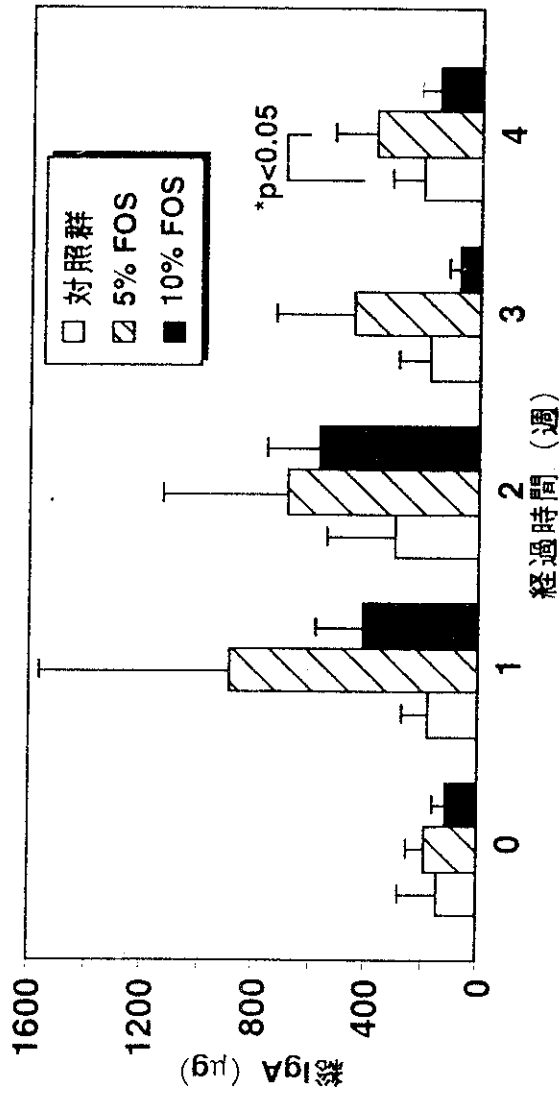


図 2-5 FOS摂取による糞便中の総IgA量

各糞便サンプルは毎週7:00 p.m.-9:00 a.m. の14時間を採取したものを使用。
 各群n=6における平均値±標準偏差。
 *有意差あり (p<0.05)。

表 2-2 試験30日目の腸内容物中の総IgA濃度

	平均値 ± 標準偏差 (μg/ml)
対照群	206.0 ± 54.3
FOS 5%	387.2 ± 295.1
FOS 10%	339.6 ± 175.8

各群ともn=6における平均値 ± 標準偏差.

比べて少なく、総糞便量中の IgA 量としては低値を示したが、糞便中の IgA 濃度はコントロール食群 (164±93 µg/ml) に対して低値にはならなかった (180±91 µg/ml) . この FOS 10%食群の総 IgA 量の低下は、FOS の緩下作用による影響と考えられる。30 日後の腸内容物総 IgA 量は、コントロール食群に比べて FOS 5%, FOS 10%食群の順で高値を示したが、有意差は認められなかった。

3) マウス脾臓細胞およびパイエル板細胞の in vitro 培養系における総 IgA 産生量

脾臓細胞では Con A, LPS および SWC の添加によって 10% FOS 食群が高い IgA 産生がみられ、Con A 刺激では FOS の摂取量に依存した IgA 産生の応答がみられた。パイエル板細胞についても、Con A および SWC 刺激時に、10% FOS 食群において高い IgA 産生の応答を示す傾向がみられた。LPS 刺激においてはパイエル板細胞での各群間の差は認められなかった (図 2-6) .

4) 血中 Ig 量

試験期間中の血中 IgG のサブクラス (IgG₁ および IgG_{2a}) は図 2-7 のようになり、IgG₁ は 4 週目に FOS の投与量に依存して高まる傾向がみられた。逆に IgG_{2a} の 4 週目の値は FOS の投与量に依存して低下傾向がみられた。しかし、いずれも群間の有意差は認められなかった。また、血中 IgA は試験期間中の群間での差は認められなかった。

D. 考察

1. *Bifidobacterium* 属菌由来水溶性多糖の

免疫賦活効果

M101-4 における菌体由来免疫賦活物質の分布を調べるために、菌体、および超音波破碎処理後、超遠心分離により分離された細胞壁および細胞質画分についてパイエル板細胞を用いたリンパ球幼若化試験により比較した結果、細胞質、細胞壁画分とも同等な強い活性を示した。これらが腸管内で実際に免疫賦活作用を有することが強く示唆された。一方、石川らの方法に従って、マウス小腸上皮間リンパ球 (IEL) を調製し、in vitro 培養系において抗原提示細胞存在下、M101-4, MBL8320 および MBL8318 由来の WC, SF, IF を添加してリンパ球増殖活性を測定したところ、M101-4 および MBL8320 由来の SF には IEL に対する高い増殖活性がある結果が得られた。IEL はその細胞構成のほとんどが T 細胞であり、すなわち *Bifidobacterium* 属菌由来の水溶性多糖には、T 細胞系を活性化させる特徴をもつことが示唆されている。ただし、李は脾臓細胞を用いた試験に基づき、*Bifidobacterium* 属菌体由来菌体成分の標的細胞は B 細胞であると示唆しているが、腸管においては B 細胞だけではなく、T 細胞に対しても効果を有することが示唆された。

2. FOS 摂取によるマウス腸管免疫系への影響の検討

難消化性糖類である FOS には、ヒトの腸内フローラの *Bifidobacterium* を増加させることや、また、増えた *Bifidobacterium* 属菌の中には、その菌体成分が腸管免疫系の細胞に対して強いマイトージェン活性や抗体産生を亢進する活性をもつ特徴があ

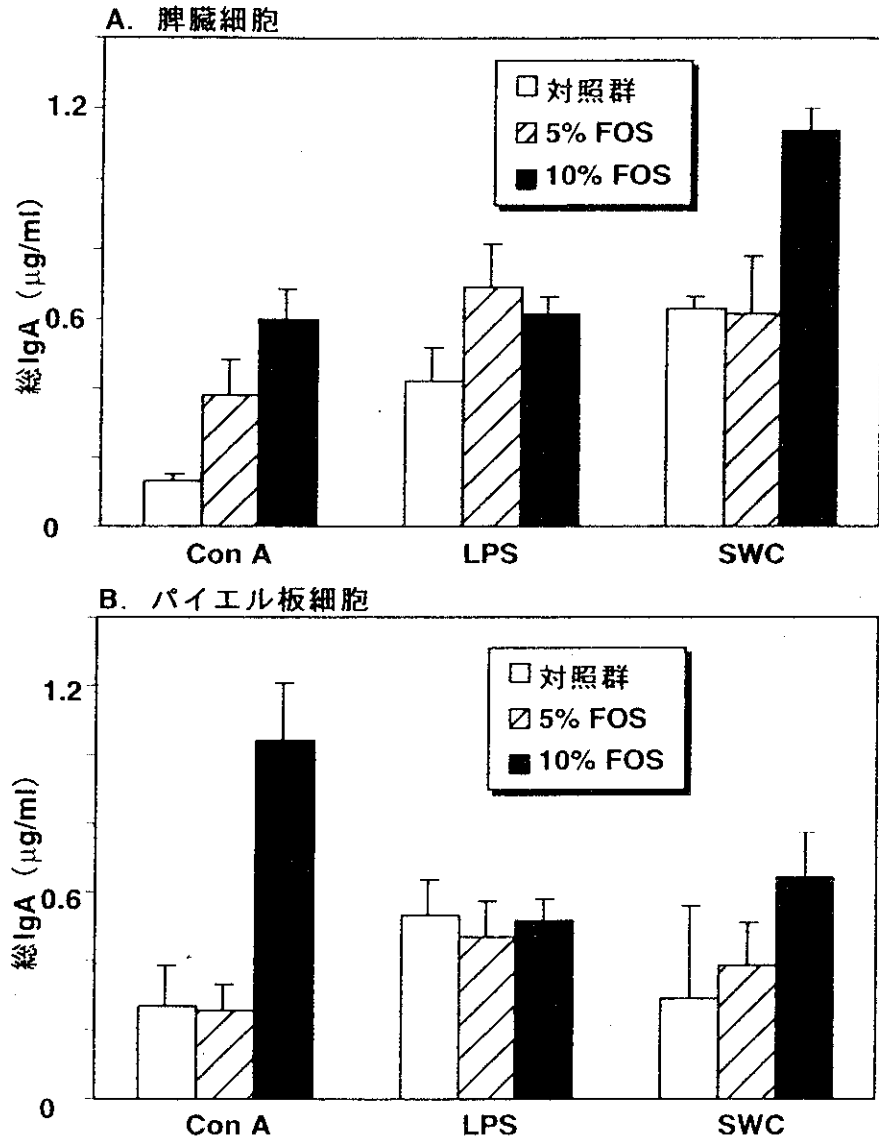


図2-6 各群のマウスより調製した脾臓細胞およびパイエル板細胞培養系における総IgA産生能

Con A (2 $\mu\text{g/ml}$), LPS (20 $\mu\text{g/ml}$), M101-4由来SWC (20 $\mu\text{g/ml}$)をそれぞれ添加して、4日間培養した培養上清中の総IgA量を定量した。各群n=6における細胞をプールして3ウェルずつまき、測定値は各3ウェルの平均値 \pm 標準偏差として表した。

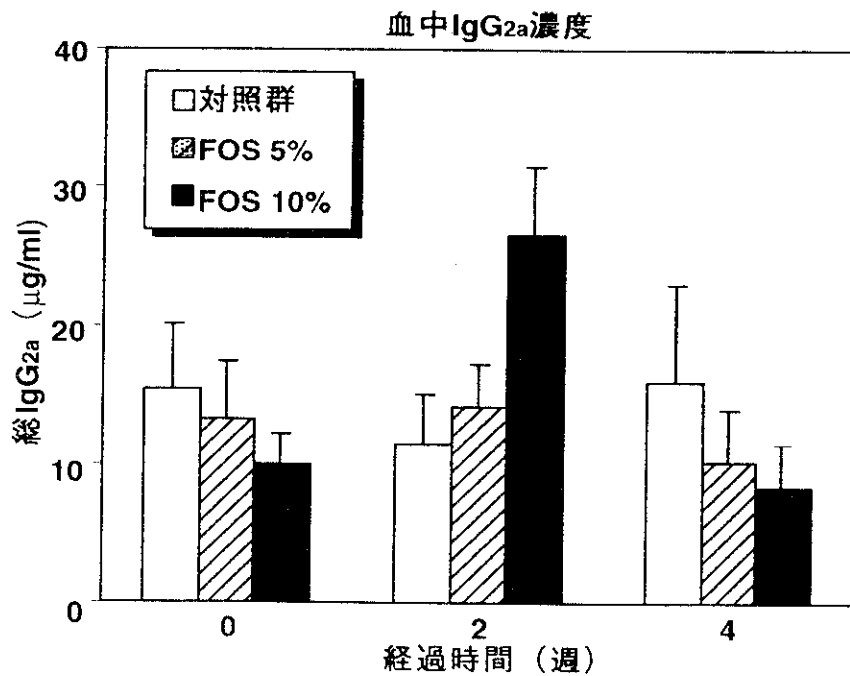
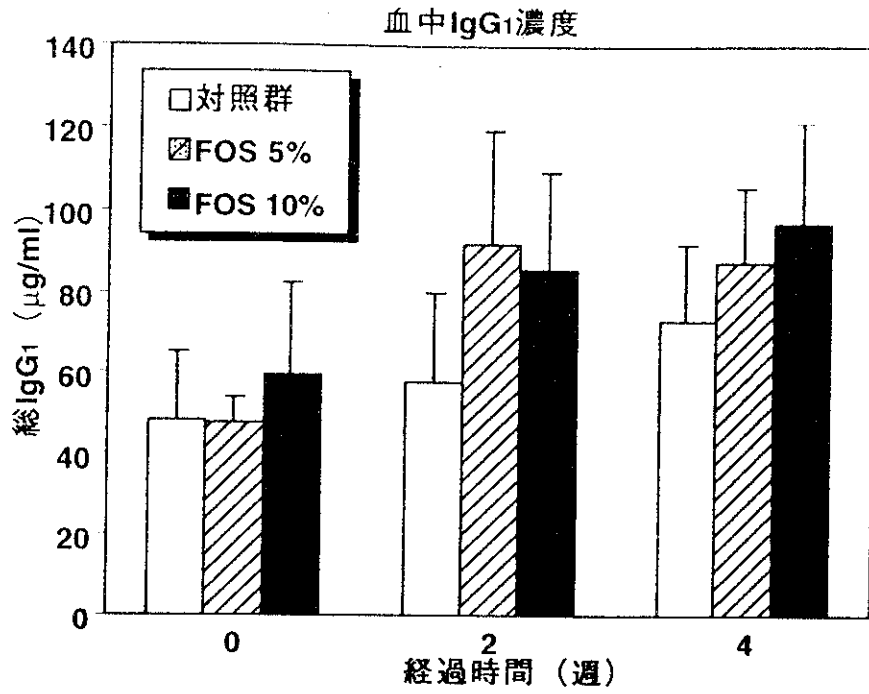


図 2-7 FOS摂取マウスの血中IgG₁, IgG_{2a}濃度
各群n=6における平均値±標準偏差.

ることが明らかとなっている。さらに、食物繊維の摂取によって、腸内発酵による SCFA の産生が起こっているが、この SCFA による腸管免疫系に対する修飾作用の可能性についても近年注目が集まっている。そこで、我々は FOS の摂取が腸管内の *Bifidobacterium* を増加させ、その結果、*Bifidobacterium* の菌体構成成分中の免疫賦活作用のある多糖成分が腸管免疫系の細胞に直接はたらきかけ、それによって腸管免疫系の主要な応答である IgA 産生が亢進するのではないかと仮説を立てた。さらに、それは *Bifidobacterium* によって産生される代謝産物の SCFA が腸管の上皮細胞や上皮間リンパ球 (IEL) に作用することにより、腸管免疫系の細胞の増殖活性などに影響を与えることも加味される可能性がある。

本研究においては、マウスに FOS を 30 日間投与したが、*Bifidobacterium* は糞便中から検出できなかつたことから、腸管内での *Bifidobacterium* は元来このマウスに定着していなかつたと考えられた。しかしながら、*Bifidobacterium* と同様に乳酸発酵する *Lactobacillus* が増加したことで、その菌体成分である多糖やペプチドグリカンによる作用、または代謝産物である SCFA による腸管免疫系への影響は無視できないと考えられた。実際、FOS 5%食群において糞中総 IgA 量が4週目にコントロール食群よりも有意に高値であったこと、FOS 摂食群においていずれも腸内容物中 IgA 量がコントロール食群よりも高い傾向が認められた。

本実験において、糞中の総 IgA を定量することは、腸管の粘膜中に分泌されてい

る IgA 量を反映させていると考えている。それは、腸管において分泌される IgA のほとんどは S-IgA であり、secretory component (分泌小片; SC) と呼ばれる分子量 80 kDa の糖タンパク質が主に 2 量体の IgA に結合することによって存在している。これは IgA 単体が消化酵素や腸内細菌が産生するプロテアーゼによって破壊されやすいのに対し、SC で結合している S-IgA はダイマー (ポリマー) で存在することが知られ、これによって IgA の破壊がおきにくい仕組みになっているからである。一方、FOS 10%食群は、FOS の緩下作用の影響を最も強く受けたために、下痢症状を呈したこと、さらに回収できた糞便サンプルが他の 2 群に比べて少なかったことから、糞中の総 IgA 量が予想以上に低値を示す結果となった。しかし、試験終了時の腸内容物中の総 IgA 量は、コントロール食群よりも高い傾向がみられ、さらに腸管免疫系の誘導組織であるパイエル板細胞の in vitro 培養系での、Con A および SWC 刺激時の IgA 産生はコントロール食群に比べて高い傾向がみられた。このことから、FOS 摂取によって、腸管粘膜の誘導組織においては IgA 産生能が高まっており、一方で、試験食開始初期の下痢症を発症したケースでは、実効組織にある粘膜固有層は炎症によって十分な IgA 産生が誘導されにくかつた可能性が推察される。FOS 5%食群では、下痢様症状が起こらずに、糞中の総 IgA 量は 4 週目においてコントロール食群よりも有意に高値であった。

脾臓細胞およびパイエル板の in vitro 培養系での FOS 10%食群において IgA 産生が高い結果となったのは、Con A 刺激と

Bifidobacterium 属菌体由来の SWC 刺激のケースであり, LPS 刺激時にはコントロール群との差は認められなかった. T細胞マイトージェンの Con A に強く応答したことは, FOS 摂食によって活性化を受ける際に T細胞系が関与している可能性が考えられる. M101-4 および MBL8320 由来の SF には IEL に対する高い増殖活性がある結果が得られたが, IEL はその細胞構成のほとんどが T細胞であり, このことから *Bifidobacterium* 属菌由来の水溶性多糖には, 腸管内で T細胞系を活性化させる特徴をもつことが示唆される.

血中 IgG のサブクラスについて, 本実験では FOS 食群が IgG₁ 産生を誘導する傾向がみられたことについて, FOS 摂取によって, Th2 タイプの T細胞が活性化された可能性が考えられる. 腸管免疫系における IgA 産生を亢進するという意味では, Th2 タイプの活性化は, これによって産生される IL-5 や IL-6 によって B細胞の分化が誘導され, IgA 産生には有利な環境であると考えられる. さらに, Kiyono, H. et al. は経口摂取された, もしくは腸粘膜において直接作用する抗原刺激(腸管粘膜で直接作用する抗原の存在)はヘルパー T細胞のうち特に Th2 タイプを介して抗体産生応答が誘導されるとしている. しかしながら, 腸内細菌のような抗原物質の特徴を考えた場合, Th1 タイプのヘルパー T細胞が活性化され, IFN- γ の産生が亢進されるという報告がある. これらより, 本実験で FOS の摂取によってまず腸管免疫系に作用したのは, 菌体成分であるよりも菌体の代謝産物である SCFA であるかもしれない. しかしながら, SCFA が Th2 タイプを特に誘

導しやすいかどうかについてはまだ検討の余地がある.

以上, 難消化性糖類である FOS は, 腸管免疫系においても作用して IgA 産生を誘導することが示唆された.

3. 総合的考察

本研究では, 難消化性糖類であるフラクトオリゴ糖 (FOS), もしくはこの FOS によって腸管内で活性化を受ける *Bifidobacterium* 由来水溶性多糖に注目し, これらの糖類と腸管免疫系との関わりについて解析を試みた.

宿主にとって有益な作用が期待される, 腸管に存在する微生物を選択的に増やしたり活性化したりすることのできる物質は, プレバイオティックスとしてその応用が期待されている. 本研究で用いた FOS には, 経口摂取したときに用量依存的に健常人腸内フローラの *Bifidobacterium* を増やす効果が知られている. そして, 腸管内で選択的に増加した *Bifidobacterium* によって, 腸管内の有害菌が減少し, 経口摂取したミネラルの吸収が促進され, 生体の免疫系が活性化される. しかし, 個々の現象は未だそのメカニズムが十分に明らかになってはおらず, 腸管の生理作用とあわせてその機能の解明が期待されている. この腸管の生理作用の中で, 本研究で注目したのは腸管免疫系のはたらきである. これらの機能には FOS という難消化性糖質と, *Bifidobacterium* 由来の多糖がその活性化に関与すると考えた.

FOS 摂取によって腸管内で選択的にグラム陽性菌 *Bifidobacterium* が増加するが, この菌体成分である水溶性高分子画分に

は強い免疫賦活活性がある。しかも、脾臓細胞と腸管免疫系のパイエル板細胞において同様なマイトージェン活性を示した。なお、この水溶性多糖の活性はグラム陰性菌細胞壁成分の LPS とは異なるものであると考えられている。その理由として、SHF は LPS 刺激に対する阻害因子として知られる polymyxin B で処理したときのマイトージェン活性の低下が認められなかったことがあげられる。さらに、LPS は B 細胞にはたらくマイトージェンとして知られているが、SF は IEL に対する増殖活性をもっていることが明らかとなっている。ただし、李は *Bifidobacterium* 属菌体由来菌体成分の標的細胞は B 細胞であると示唆しているが、腸管内では T 細胞に対しても作用することが示唆された。近年、グラム陰性菌由来の LPS に対する受容体が明らかとなった。LPS に B 細胞増殖活性などその他の細胞刺激活性があることが古くから知られ、そのレセプター分子の検索が長い間行われきた。LPS 結合性のある分子として CD14 が報告されていたが、これは細胞内にシグナルを伝達できないため別の分子の存在が指摘されてきた。ようやく近年になって Toll 様レセプターが細菌やカビなどの侵入を検知する分子として発見され、自然免疫の中核をなす分子として俄然注目を集めている。このファミリーに属する分子は、ショウジョウバエやヒトのみならず、植物にもみつかっており感染防御に働くと考えられている。LPS レセプターは、ロイシンリッチリピートを細胞外ドメインに、IL-1 レセプターと類似した構造をもつ細胞質内ドメインとをもつ Toll 様レセプター (Toll-like receptor, TLR) であ

る TLR4 と MD-2 分子が細胞膜上で会合した構造をとっており、細胞外ドメインが LPS を認識し、そのシグナルが B 細胞を活性化していると考えられている。さらに、TLR2 という Toll 様レセプターはグラム陽性菌由来のペプチドグリカンやリポペプチド酸に対して応答することが明らかとなり、グラム陰性菌の細胞壁成分の認識には TLR4、グラム陽性菌細胞壁成分に対する認識 TLR2 というように、徐々に菌体の認識に対するレセプターの特異性について特徴が明らかになりつつある。しかしながら、LPS をはじめとする病原体由来の抗原は、上記のような課程で自然免疫を獲得しているが、本研究で精製された SHF などのグラム陽性菌由来水溶性多糖の免疫系細胞における認識については、抗原構造と抗原受容のメカニズムが未だ十分に明らかになっていない。今後この分野の研究が進み自然免疫系の分子機構が解明されると期待できる。本研究で調べたグラム陽性細菌由来の免疫賦活物質もこのような自然免疫系に関与する分子群と何らかの関わりをもって作用するものと想像できる。しかし、LPS が病原性の有害な反応を引き起こす一方で、本研究で調べた免疫賦活物質は B 細胞を活性化するにもかかわらず顕著な有害反応を誘導しない。本研究によって *Bifidobacterium* 由来免疫賦活物質の化学的性質が明らかになったので、今後レセプターを明らかにするうえでの端緒を開くことができた。今後これらのレセプターを明らかにすることは感染防御系の解明にも有効であろう。

FOS 摂取によってもマウス腸管免疫系が刺激されるかどうかを、IgA 産生を指標

に検討したところ、FOS を摂取しても下痢症状によって腸粘膜が炎症を起こさなかった群（FOS 5%食群）において、糞便中の総 IgA 量がコントロール食群に比べて有意な増加が認められた。Inductive site のパイエル板細胞の IgA 産生能についても、FOS の摂取によって上昇する傾向がみられ、さらに血中 IgG サブクラスは FOS 食群において Th2 タイプの IgG₁ が高まる傾向をみせた。これらは、IgA 形質細胞への分化を誘導する上で、Th2 タイプのヘルパー T 細胞が活性化されている可能性を示している。すなわち、FOS の摂取はミネラル吸収促進作用のみならず、腸管免疫系を活性化するという効果も示唆するものである。なお、この活性化機構については、プロバイオティクスとしての腸管内での *Bifidobacterium* 活性化による結果、菌体中の活性化成分が腸管免疫系の IgA 産生を誘導していること、および腸内発酵によって産生した SCFA が、直接免疫系の細胞に作用して IgA 形質細胞の発現が誘導されたことの 2 つの可能性が考えられる。

近年、プロバイオティクスやプレバイオティクスという考え方から、腸管免疫系に作用する腸内微生物や、それを活性化する因子について研究が広まっている。腸内細菌は宿主と共存関係にあることから、比較的物質レベルでの生体に対する安全性がある程度確保されていることもその理由の一つであろう。Bukowski, J. F. et al. は細菌や可食性植物、および茶に含まれるアルキルアミンが、IEL に多くみられる $\gamma\delta$ T 細胞によって認識され、活性化するという報告をしている。さらに、腸内細菌の存在は、腸管免疫系の正常な発達に必

要であり、免疫寛容の誘導、自己免疫疾患・アレルギーの抑制効果などに深く関与していると推察されている。すなわち、腸管の粘膜面が常に感作を受けている腸内細菌や食餌抗原には、腸管免疫系の生理的 normalisation のために作用しているものがあり、この腸管免疫系の修飾作用について化学的構造と作用機序を明らかにすることによって、病者用食品としての臨床面での応用が可能になるであろう。それが高齢者の健康維持にも、最も有効な手段の一つとなるはずである。腸管粘膜という感染防御の最前線における免疫系を正常化し続けることが、高齢者の生体防御系の調節に必要となるのである。そして、このような機能の評価には、腸管免疫系、およびその細胞を用いた評価系が必要不可欠である。今後の研究の発展に大いに期待したい。

E. 結論

FOS の摂取によりマウス腸管免疫系において IgA 産生が誘導された。また、FOS 摂取により *Bifidobacterium* が増加するが、この菌体成分は腸管免疫系のパイエル板細胞、IEL に対して免疫賦活活性を示した。以上の結果は、免疫機能向上病者用食品の開発と評価の基礎となるものである。

F. 研究発表

1. 発表論文

Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi T. and Kaminogawa, S., Comparison of the immunopotentiating activity with structural characteristics among water-soluble polysaccharides isolated from the genus

Bifidobacterium. *Bioscience Microflora* 17,
97-104 (1998)

3. T細胞抗原レセプター (TCR) トランスジェニックマウスを用いた腸管免疫応答の解析

A. 研究目的

1. 経口投与された抗原に対する免疫応答の解析

抗原の経口投与により、末梢ではその抗原特異的に免疫応答が抑制され、局所免疫応答を示す腸管では、その抗原特異的に IgA 産生応答が誘起される。

抗原の経口投与により誘導される低応答性は T 細胞の応答が低下することにより説明されており、投与する量によりその機構が異なることが示唆されている (Fig. 3-1)。高投与量の場合は T 細胞のクローン消去およびクローン不応答が主たる機構であると考えられ、また、低投与量の場合は調節性 T 細胞による制御により保たれていると考えられている。Weiner らは TCR トランスジェニックマウス (TCR-tg) を用い、高投与量の抗原を投与した場合、その抗原特異的な CD4⁺ T 細胞のクローン消去がパイエル板で誘導されることを示した。クローン消去が誘導される機構についてはまだ不明瞭な部分が多いものの、*in vitro* では活性化後に誘導される場合が多く、活性化誘導細胞死 (activation-induced cell death; AICD) に寄与する部分が多いと考えられている。Friedman らは、クローン不応答が経口免疫寛容でも誘導されていることを示した。クローン不応答は、*in vitro* においては、アナジーと呼ばれる現象でよく解析され、それによると T 細胞が副刺激がない状態で抗原刺激を受けた場合、次に適切な抗原提示を受けても応答しない現象であり、その不応答は IL-2 の非産生性、

IL-2R の発現の低下などにより代表される。これら不応答に陥った細胞は IL-2 を加えることで応答性を回復し、不応答な状態から脱することも知られている。*in vivo* での不応答な状態はアナジー状態と類似し、低増殖性、および IL-2 の非産生性などが認められる。しかしながら、*in vivo* においては *in vitro* と異なり、副刺激因子の存在しない状態で刺激を受ける状態があるかどうか不明であり、アナジーと同様な機構で不応答が誘導されているかどうかは明らかでない。一方、低投与量の抗原を投与した際の低応答性における調節性細胞による制御は TGF- β により担われてると考えられている。TGF- β を産生する細胞がそれを通じ他の細胞に働きかけ増殖やサイトカイン分泌を抑制する機構である。Friedman らは低投与量の抗原を投与したマウスより調製した脾臓細胞は抗 TGF- β 1 抗体の添加により増殖応答が回復することを示している。また、Weiner らは抗原を投与したマウスの腸管膜リンパ節より T 細胞クローンを樹立したところ TGF- β を多量に産生するクローンを多数得、TGF- β を産生する CD4⁺ T 細胞を Th3 と呼ぶことを提唱している。また、抗原の経口投与により、Th2 型応答が優位になることが知られている。それは、Th1 細胞は不応答に陥りやすく、Th2 細胞が不応答に陥りにくいことにより説明されている。しかしながら、未感作な細胞が刺激を受けて分化する際 Th2 細胞が優先的に誘導されている可能性もあり、これからの解析が待たれる。この Th2 型応答の優位は食品アレルギーと関連している可能性がある。食品アレルギーは経口免疫寛容の破綻により引き起

こされとも考えられている。しかしながら、実験動物モデルで有効な系がこれまで存在せず、解析が進んでないこともあり、食品アレルギーとの関連は不明瞭な部分が多い。

これらに見られるように、抗原の経口投与において *in vivo* において投与しない場合とは異なる応答が知られており、それは、さらに投与量によって機構が異なっている。それらに、脾臓細胞およびパイエル板細胞がどのように関わっているかは明らかにされていない。経口免疫寛容においては、抗原の経口投与により、パイエル板に TGF- β を産生する T 細胞が誘導されること、および、多量の経口抗原により、パイエル板において、T 細胞において細胞死が誘導されることなどより考えられている。しかしながら、それ以外の場合、細胞死を免れる細胞も高頻度で存在することが明らかとなっており、異なる量の経口抗原がパイエル板の T 細胞のエフェクター機能に与える影響については明らかとなっていない。末梢成熟 T 細胞は抗原刺激を受け、エフェクター機能を有する細胞へ分化する。CD4⁺ T 細胞の場合、前述したように、Th1, Th2, Th3, Tr1 などに分類された細胞へと分化を遂げる。CD4⁺ T 細胞がどのようなエフェクター細胞へ分化するかにより、それにより引き起こされる免疫応答が大きく影響を受ける。経口抗原の量により異なる応答が誘導されるのは、T 細胞が異なる応答を示すことで説明できる部分が多い。この異なる T 細胞の応答は分化により誘導されたものであると考えられ、抗原感作時の状況、すなわち、経口抗原の投与量によりエフェクター細胞への分化が

決定される可能性がある。

そこで、本研究では、TCR tg マウスを用いて、異なる量の抗原の経口投与が *in vivo* での免疫応答に与える影響について観察した。また、同時に、経口抗原が、パイエル板 T 細胞および脾臓 T 細胞の機能に与える影響を観察し、それらの相関を検討した。

2. パイエル板細胞と脾臓細胞のサイトカイン分泌応答の比較

抗原を経口投与することにより腸管において IgA 産生応答が誘導される。パイエル板はその IgA 産生細胞の誘導部位と考えられており、B 細胞は α^+ であるものがすでに多く存在することが明らかとなっており、パイエル板においてアイソタイプスイッチをうけ、ホーミングにおいて成熟し、IgA 産生細胞へと分化することが考えられている。それには、同様に T 細胞の応答の変化によるものである可能性が高く、先述の TGF- β 産生細胞の誘導に加え、ヒツジ赤血球の経口投与により IL-5 を発現する CD4⁺ T 細胞が増加することなどにより考えられている。

腸管には独特な T 細胞が存在することが知られており、iIEL や腸管 LP リンパ球では、それらの発達分化が異なるとされている。パイエル板にも同様に抗原に感作される前に他の末梢組織とは異なる発達を遂げた T 細胞が存在する可能性も考えられる。また、それらの細胞は抗原刺激に対し、脾臓細胞とは異なる分化を遂げるようプログラムされている可能性もある。

しかしながら、これらのサイトカイン分泌誘導機構についてはほとんど明らかと

なっていない。そこで、in vitro においてパイエル板細胞、脾臓細胞のサイトカイン分泌を観察した。

これらの実験系により食品、食品成分の腸管免疫応答に対する影響を観察することが可能となり、免疫関連病者用食品の評価系の開発につながると期待できる。

B. 研究方法

1. 経口投与された抗原に対する免疫応答の解析

1) 動物

BALB/c マウスは日本クレア (東京) より購入した。オバルブミン (OVA)³²³⁻³³⁹ 特異的 I-A^d 拘束性 T 細胞クローン 7-3-7 の TCR α 鎖、 β 鎖両方の遺伝子を導入した tg マウス (7-3-7 TCR tg マウス) は、東海大学医学部免疫学教室の垣生園子博士、佐藤健人博士らによって樹立され、その子孫を供与された。7-3-7 TCR 導入遺伝子陽性で、BALB/c マウスとの交配を重ね遺伝的背景が BALB/c マウスとほぼ同一とみなされるマウス同士を交配させ、導入遺伝子ホモ接合体を作成した。実験には、導入遺伝子ホモ接合体と BALB/c マウスと交配させた仔を用いるか、標準的な方法により尾組織より抽出した DNA を用いたサザンブロッティング法による検定法、あるいは、末梢血細胞より簡易的な方法により抽出した DNA を用いた PCR による検定法により選定したものをを用いた。なお、サザンブロッティングに用いたプローブは、導入遺伝子 β 鎖の V 領域に相当する部分が挿入されたプラスミド (pBluescript KS+) を垣生園子博士、佐藤健人博士より供与され、それよ

り EcoRI と EcoT22I により切断した断片を用いた。また、PCR に用いた導入遺伝子特異的プライマーは、導入遺伝子において、 β 鎖をコードする部およびそのプロモーター部に渡って増幅されるよう設計されており、その配列は ACT GTC CTC GCT GAT TCT GC および TCC ATC CTC ATG GAA GTT CC である。マウスは滅菌水と 10 kGy 滅菌飼料 CE-2 (日本クレア) により維持した。なお、実験には雌雄両方のマウスを用い、抗原提示細胞は性別の一致したマウスより調製した。

2) 抗原の経口投与

0.1, 5, 250 mg の OVA (生化学工業, 東京) を 0.5 ml のリン酸緩衝液 (PBS) に溶解し、経口ゾンデを用いて 7-3-7 TCR tg マウスに様々な回数、胃内投与した。コントロール群には OVA を含まない PBS のみを投与した。

3) 培地

RPMI1640 (日水製薬, 東京) に 100 U/ml のペニシリン, 100 μ g/ml のストレプトマイシン, 5×10^{-5} M の 2-メルカプトエタノールを加え、これを cRPMI とした。また、培養の際は、特に注釈を付けない限り、これに 5% ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS, Cansera, Roxdale, Canada, あるいは Life Technologies, Gaithersburg, MD) を加えたものを使用した。

4) 脾臓細胞の調製

マウスより無菌的に脾臓を摘出し、すりつぶした後、塩化アンモニウム溶液を用い赤血球を除去し、洗浄後、cRPMI に浮遊した細胞懸濁液を得た。

5) パイエル板細胞の調製

マウス小腸より無菌的にパイエル板を

抽出し 1.5 mg/ml の Dispase (grade II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を含む RPMI1640 溶液中, 37°C で 30-45 分間攪拌し, 上部懸濁液を得た. 下部懸濁液にはあらたに同様の溶液を加え, この操作を計 3-4 回行った. 回収した懸濁液は RPMI1640 で洗浄し, cRPMI に浮遊した細胞懸濁液を得た.

6) 血中抗体価の測定

抗原の経口投与 7 日後, 0.1 mg の OVA を 0.1 ml の PBS/フロイントの完全アジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA, Difco, Detroit, MI) の 1:1 油中水型エマルジョンと共にマウス腹腔内に投与した. 腹腔内投与 10 日後, マウス尾より採血し, 慣習的な方法で血清を調製した. その後, 0.1 mg の OVA をフロイントの不完全アジュバント (incomplete Freund's adjuvant, IFA, Difco) と共に同様に投与し, その 7 日後, 同様に採血し, 血清を調製した. 血中抗原特異的抗体価は ELISA により測定した. なお, 各ステップ間は 0.05% Tween20 を含む PBS (PBS/Tween) で洗浄を行った. 96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 0.01% OVA を含む PBS を加え, OVA をウェルに吸着させた後, 1-3% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)/PBS を加え非特異的吸着を抑える操作を行った. その後, 適切な濃度に希釈した血清, あるいは段階的に希釈した標準血清を加えた後, アルカリフォスファターゼ結合アイソタイプ特異的抗体 (抗 Ig(G+M+A), Cappel, Durham, NC; 抗 IgG1, 抗 IgG2a, 抗 IgM, 抗 IgA, 以上 Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) を結合させた後, 4-ニトロフェニルリ

ン酸二ナトリウム (東京化成工業, 東京) を基質としてジエタノールアミンを含む緩衝液中で反応させ, マイクロプレートリーダー Model 450 (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて 405 nm の吸光値を測定した.

7) 糞中抗体価の測定

経口投与 1 週間後, それぞれの個体より糞を回収し, 5 倍量の 0.05 mg/ml の大豆トリプシンインヒビターと 0.1% BSA を含む PBS を加え攪拌した. 4°C, 12,000 × g で 10 分間遠心し, 上清をサンプルとした. 上清は測定まで -20°C で保存した. Ig(G+M+A), IgA は上記と同様に測定した.

8) 遅延型過敏反応 (DTH) の測定

0.5 mg の OVA を 2.5 mg の水酸化アルミニウムに標準的な方法で結合させた. 経口投与 1 週間後, 後肢掌の厚さをダイヤルゲージ (Ozaki MFG, 東京) によりそれぞれ測定した. その後 25 μl の懸濁液をマウス左後肢掌に OVA を含まない水酸化アルミニウムゲルを右後肢掌に投与した. 24 時間後再び後肢掌の厚さをそれぞれ測定し, 左の厚さの変化より右の厚さの変化を引いた値を厚さの変化とした.

9) 細胞の増殖応答

7-3-7 TCR tg マウスより調製した 5×10^5 の未分画細胞, あるいは 1×10^5 の脾臓 T 細胞と 3000-rad の放射線照射した 5×10^5 の BALB/c マウス脾臓細胞を 96 ウェル平底プレート (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) で 5% CO₂ インキュベータ中さまざまな濃度の OVA の存在下あるいは抗 CD3 モノクローナル抗体 (mAb) 145-2C11 (東大医学部免疫学, 多田富雄博士より供与) の存在下 1-5 日培養した. 最後の 24 時間はウェル当たり 0.5 μCi の ³H-

チミジン (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) の存在下培養した。チミジンを取り込んだ細胞はセルハーベスタでグラスファイバーフィルタ上に回収し、取り込まれた³H量をシンチレーションカウンタにより測定した。

10) サイトカインの定量

5×10^5 の未分画細胞を 96 ウェル平底プレートで、あるいは 2.5×10^6 の未分画細胞、もしくは 5×10^5 の脾臓 T 細胞と 3000-rad の放射線照射した 2.5×10^6 の BALB/c マウス脾臓細胞を 48 ウェルプレート (Costar, Cambridge, MA) で 0.1 あるいは 1 mg/ml の OVA 存在下 5% CO₂ インキュベータ中で培養し、24, 48 あるいは 72 時間後培養上清を回収した。培養上清は測定まで -20°C あるいは -70°C で保存した。上清中の各サイトカイン量はサンドイッチ ELISA により定量した。捕捉抗体を 0.5-1 μg/ml となるように 0.1 M NaHCO₃, pH 8.4 あるいは 0.1 M Na₂HPO₄, pH 9.0 で希釈し、96 ウェルプレート (Nunc) に吸着させた。1-3% BSA/PBS でブロッキング後、適切に希釈した培養上清あるいは標準溶液を加え、その後、ビオチン標識した検出抗体、ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ、続いて 4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを加えて発色させ、マイクロプレートリーダー Model 450 を用いて 405 nm の吸光値を測定した。なお各ステップは PBS/Tween で洗浄した。用いた捕捉 mAb は、IL-2: JES6-1A2, IL-4: BVD4-1D11, IL-5: TRFK5, IL-6: MP5-20F3, IL-10: JES5-2A5, IFN-γ: R4-6A2, 検出 mAb は IL-2: JES6-5H4, IL-4: BVD6-24G2, IL-5: TRFK4, IL-6: MP5-32C11, IL-10: SXC-1, IFN-γ: XMG1.2

を用いた。R4-6A2 はハイブリドーマを ATCC より購入し当研究室においてヌードマウスにおいて腹水化したものを Protein G カラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。XMG1.2 はハイブリドーマを J. S. Abrams 博士 (DNAX, Palo Alto, CA) より供与され、当研究室において同様に精製後、ビオチン標識した。JES5-2A5 はハイブリドーマを J. S. Abrams 博士より供与され、同様に精製した。SXC-1 はハイブリドーマを K. W. Moore 博士 (DNAX) より供与され、プロタミンカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用い同様に精製し、ビオチン化した。標準溶液は、IL-2: 7-3-7 TCR tg マウスの脾臓細胞を OVA 刺激した培養上清を限外濾過により濃縮した溶液を Genzyme (Cambridge, MA) の IL-2 ELISA キットの標準溶液により濃度を決定したもの、IL-4: マウス Th2 クローン D10.G4.1 をアロ抗原で刺激した培養上清を同様に濃縮した溶液を Endogen (Boston, MA) の IL-4 ELISA キットの標準溶液により濃度を決定したもの、IL-5 および IL-6: PharMingen より購入、IL-10 および IFN-γ: マウス CD8 クローン 13G2 を抗原刺激した培養上清を同様に濃縮した溶液を Genzyme の IFN-γ ELISA キットの標準溶液により濃度を決定したものをそれぞれ用いた。

11) 統計処理

抗体価の投与群とコントロール群の有意差検定は Mann-Whitney U 検定により行った。増殖応答、サイトカイン分泌応答の投与群とコントロール群の有意差検定は、Student の t 検定により行った。

2. パイエル板細胞と脾臓細胞のサイトカイン分泌応答の比較

1) 動物

第1節に記載したものをを用いた。

2) 細胞調製

脾臓細胞およびパイエル板細胞は第一章、材料と方法「パイエル板細胞の調製」に記載した方法と同様に行った。CD4⁺細胞はマイクロビーズ結合抗マウス CD4 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) および MACS LS⁺ 分離カラム (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。なお、CD4⁺細胞の純度はフローサイトメトリーにより検定し、パイエル板細胞、脾臓細胞より分離した CD4⁺細胞の割合は、それぞれ、87-95%、92-98%であった。

3) サイトカインの定量

第1節とほぼ同様に行った。ただし、再刺激を行う場合には、まず、一次培養を 5×10^6 の細胞を 24 ウェルプレート (Costar) で、あるいは 1×10^7 の細胞を 12 ウェルプレート (Costar) で行い、増殖の著しいウェルは3日後に3倍に拡大した。その際の抗原濃度は、0-100 μM の範囲で行った。また、Th1 への分化を誘導する場合、一次培養に抗 IL-4 mAb [11B11 東京大学医学部免疫学教室、多田富雄博士よりハイブリドーマを供与され、腹水化し Protein G カラムを用いて精製した]、組み換え体マウス (rm) IL-12 (Genzyme) のいずれか、あるいは両方を加え、Th2 への分化を誘導する場合には、rmIL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) を加えた。6-7 日後、細胞を回収し、洗浄後、 5×10^5 の回収した細胞に 2×10^6 の 3000-rad の X 線照射した BALB/c マウスの脾臓細胞を抗原提示細胞として加え、

0.1 mg/ml の OVA の存在下培養し、48 時間後の培養上清を回収し ELISA により測定した。また、 5×10^5 の CD4⁺ T 細胞と 5×10^5 の抗原提示細胞を様々な濃度の OVA の存在下 96 ウェルプレートで混合培養し、48 時間後の培養上清を回収し、そのサイトカイン濃度を ELISA により定量した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いはすべて大学の定めるガイドラインを順守して行った。

C. 研究結果

1. 経口投与された抗原に対する免疫応答の解析

1) 異なる量の経口抗原によるサイトカイン分泌応答への影響

まず、異なる量の経口抗原により誘導されるサイトカイン分泌応答を観察した。0.1, 5, あるいは 250 mg の OVA を単回経口投与し、その後の脾臓細胞のサイトカイン分泌応答を観察した (Fig. 3-1)。その結果、0.1 mg 投与群では、有意に IFN- γ 分泌の低下が認められた。また、検討したそれ以外のサイトカインについてコントロール群との間に顕著な差は認められなかった。5 mg 投与群においては 0.1 mg 投与群と同様に有意に IFN- γ 分泌の低下が認められ、有意な IL-4 分泌の亢進が認められた。250 mg 投与群は顕著な IL-2 および IFN- γ 分泌の低下、IL-4 および IL-5 分泌の亢進が認められた。次に、少ない量であっても経口抗原の影響を脾臓細胞より顕著に受けると考えられるパイエル板細胞において、脾臓と同様に異なる量の経口抗原の単回投与によるサイトカイン分泌へ

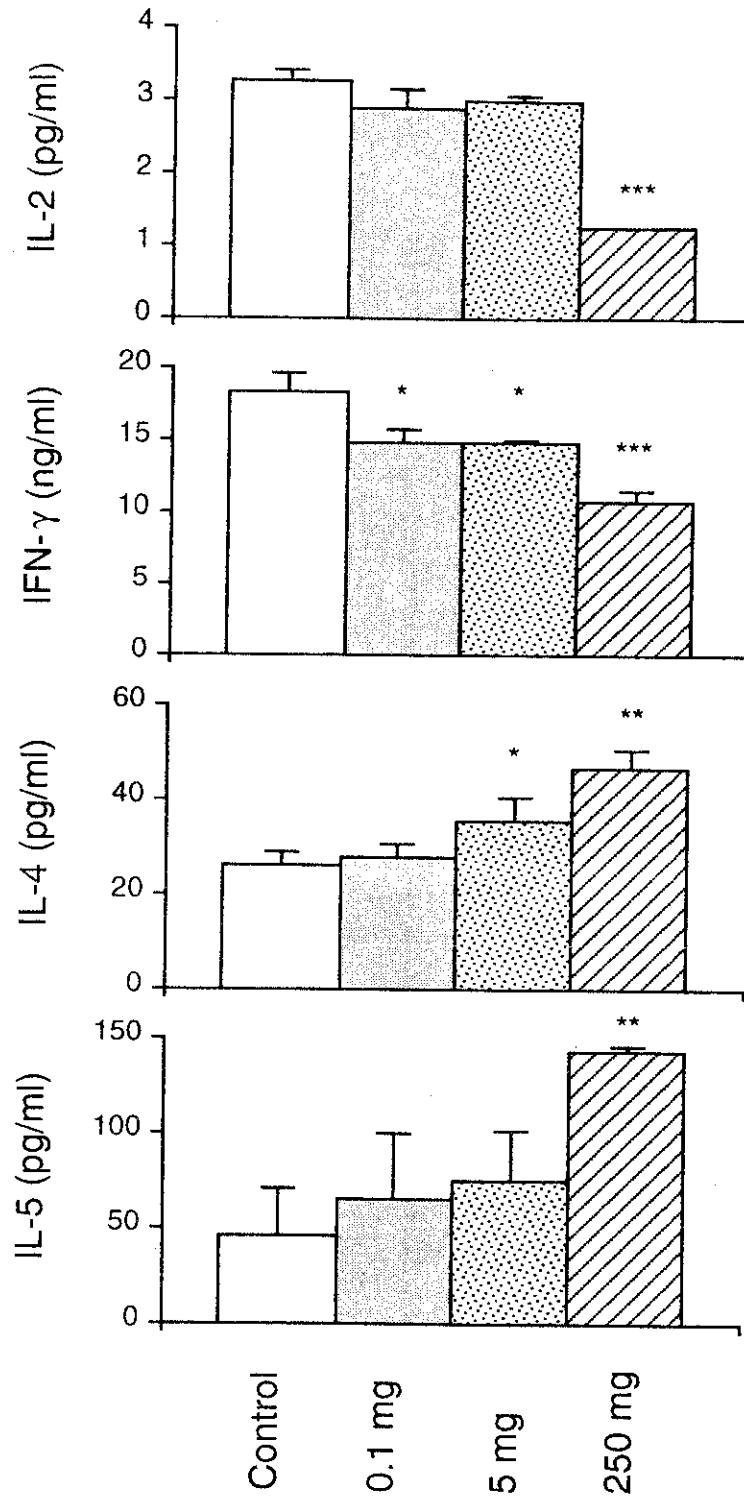


Fig. 3-1 Th2-type cytokine were induced in a dose-dependent manner. 7-3-7 TCR tg mice (3-4 mice/group) were fed with increasing doses of antigen and cytokine secretion to antigenic stimulation by splenocytes from single-fed TCR tg mice was measured with ELISA. Data are of 48 h for IL-2, IL-4 and 72 h for IFN- γ and IL-5, and expressed the mean \pm SD of triplicate culture. The results are representative of at least three independent experiments. *, **, and *** are $p < 0.05$, < 0.005 , and < 0.001 vs. control group, respectively. The values of responses in medium were all under detectable limit. The lower limit of measurement is 250 pg/ml for IL-5.

の影響を観察した (Fig. 3-2). パイエル板においては同量の抗原で比較した場合, 脾臓細胞の場合より顕著に応答に変化が認められた. 0.1 mg および 5 mg 投与群で IL-2 および IFN- γ 分泌の低下が認められた. また, IL-4 および IL-5 分泌においては 250 mg 投与群で初めて顕著な亢進が認められた. 以上の結果より, 抗原の単回投与において, 脾臓細胞においてもパイエル板細胞においても投与量依存的に Th2 型サイトカインの分泌亢進が示された.

次に, 投与回数を 4 回に増やし, 前述と同様に脾臓細胞 (Fig. 3-3) およびパイエル板細胞 (Fig. 3-4) について観察した. 脾臓細胞は投与量依存的に IL-2 および IFN- γ 分泌の低下が認められた. なお, IL-4 は 5 mg 以上の投与, また, IL-5 においては 250 mg 投与群でのみ亢進が認められた. パイエル板細胞においては, 0.1 mg 投与群で若干の IL-2 分泌の低下が認められるものの IFN- γ 分泌はそれほど低下が認められなかった. 5 mg 投与群は若干の IL-2 および IFN- γ 分泌の低下は認められるものの IL-4 分泌はコントロール群と大差なかった. 250 mg 投与群は単回投与と同様に IL-2 および IFN- γ 分泌の低下 IL-4 分泌の亢進が認められた. なお, IL-5 においては投与全群でさらに分泌量が亢進した. 以上の結果より, 抗原の 4 回投与においても投与量依存的な Th2 型サイトカインの分泌亢進が示された.

2) 異なる投与量の経口抗原による増殖応答への影響

次に, 異なる量の抗原の経口抗原が増殖応答に影響を与えるのかどうかを検討した. まず, 0.1, 5, 250 mg の抗原を 7-3-7 TCR

tg マウスに単回経口投与し, 一週間後脾臓細胞を調製し, *in vitro* で抗原刺激後の増殖応答を [3 H] チミジンの取り込みを指標にシンチレーションカウンタを用いて解析した (Fig. 3-5). その結果, 単回の経口投与では用いたどの抗原量においても脾臓細胞の増殖応答において群間で顕著な差は認められなかった. 次に, パイエル板細胞について同様に増殖応答を観察した (Fig. 3-6). パイエル板においても単回の経口投与では, 用いたいずれの抗原量においても増殖応答において顕著な差は誘導できなかった. 単回では, 増殖応答において投与量によって差を誘導するには不足していると考え, 次に, それらの抗原量の 4 回投与を試みた. 一日おきに 4 回同じ量の抗原を投与し, 最後の投与の二日後, 脾臓細胞を調製し, 増殖応答を同様に観察した (Fig. 3-7). その結果, すべての群においてコントロール群と比較して, 48 時間培養以降, 特に, 72 時間培養以降では有意に増殖応答の低下が認められた. 次に, パイエル板細胞においても同様に増殖応答を観察した (Fig. 3-8). その結果, 250 mg 投与群において若干の増殖応答の低下が認められるものの, 他の投与群 (0.1 mg および 5 mg) では差は認められなかった.

3) 異なる量の経口抗原は異なる抗体産生応答を誘導する

単回等少ない回数での投与で経口摂取する抗原量がどれだけ影響を与えるかどうかを検討した. しかしながら少量投与や短い期間の投与においてアジュバントとともに非経口的に投与することなしでは抗体産生は誘導されず (データ省略), 経口投与後非経口的にアジュバントとともに