

反応を停止した。測定波長 492nm または 405nm でそれぞれ吸光度を測定した。

OVA 特異的 IgE については、OVA 特異的 IgG1 と IgG2a の ELISA とほぼ同様の方法で測定した。IgG1 と IgG2a の測定と同様に、サンプルを添加して洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗マウス IgE 抗体 (R35-118 : PharMingen) をプレートに加え、遮光して室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、TMB 溶液 (Kirkegaard Perry Lab.、Gaithersburg, MD, USA) を 1well 当たり 100 μ l ずつプレートに加え、遮光して室温で静置した。その後、2N の硫酸を 1well 当たり 100 μ l ずつプレートに加え、反応を停止した。停止後、450nm でそれぞれ吸光度を測定した。

サイトカインの測定

IFN- γ 、IL-4 と IL-12 の濃度は ELISA で調べた。1 μ g/ml の抗 IL-4 抗体 (BVD4-1D11 : PharMingen) を含む 0.1M の炭酸水素ナトリウム (pH8.2) または 1 μ g/ml の抗 IFN- γ 抗体 (R4-6A2 : PharMingen) を含む 0.05M の Tris-HCl (pH8.9) を 96 ウェルプレートに 1well 当たり 100 μ l ずつプレートに加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。0.1% の Tween 20 を含む PBS で 4 回洗浄し、5% FCS と 3% PEG6000 を含む PBS をプレートに加え、室温で 30 分間静置した。洗浄後、3% PEG6000 を含む PBS で希釈したサンプルを 1well 当たり 100 μ l ずつプレートに加え、室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、ビオチン標識抗マウス IL-4 (BVD6-24G2 : PharMingen) またはビ

オチン標識抗マウス IFN- γ 抗体 (XMG1.2 : PharMingen) をプレートに加え、遮光して室温 2 時間静置した。アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン (Zymed) を 3% PEG6000 を含む PBS で希釈し、1well 当たり 100 μ l ずつ加えた。遮光して 1 時間室温で静置し、4 回洗浄後、1mg/ml の 4-ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミンバッファー (pH9.8) をプレートに加え、遮光して室温で 1 時間静置した。その後、5N の水酸化ナトリウムを 1well 当たり 20 μ l ずつプレートに加え、反応を停止した。対照波長 490nm、測定波長 405nm で吸光度を測定した。

IL-12 の測定は、IL-12 ELISA kit (Bio Source Inter.、Camarillo, CA, USA) を用いて、ユーザーマニュアルに従って測定した。

腹腔マクロファージの採取と培養

3 週齢から NT(-)食または NT(+)食を自由摂取させたメスの OVA-TCR Tg マウスに、2.5ml のチオグリコレート (DIFCO、Detroit, MI, USA) を腹腔投与した。4 日後に、マウス (7 週齢) から腹腔マクロファージを採取した。マウスの腹腔に 1% FCS を含むハンクス液を投与し、このハンクス液を腹腔から回収した。2 回洗浄後、細胞を再度、ハンクス液に懸濁し、5% CO₂ 存在下 37 $^{\circ}$ C で 2 時間、48 ウェルプレートに培養した (5 \times 10⁵ 個/well)。吸着していない細胞を除き、吸着したマクロファージを 0.1 μ g/ml または 1 μ g/ml の LPS を含有する 0.5ml の培地で 2 日間 CO₂ インキューベ

ター中で培養した。

in vitro の実験では、MF 食を自由摂取させた BALB/c マウスから、上述の方法で、腹腔マクロファージを採取し、5%CO₂ 存在下 37°C で 2 時間、96 ウェルプレート (2 X 10⁵ 個/well) で培養した。その後、プレートに吸着したマクロファージを、LPS 非存在下で、0~10 μg/ml のヌクレオチド (CMP : GMP : IMP : UMP=1 : 1 : 1 : 1 の組成) とともに、CO₂ インキュベーター中で 1 日間培養した。

培養に用いた培地は、10%FCS、100U/ml ペニシリン G、100 μg/ml ストレプトマイシン、5 X 10⁻⁵M の 2-メルカプトエタノールおよび 2mM の L-グルタミンを含む RPMI1640 培地を用いた。上清中の IL-12 濃度は以下に述べる IL-12 のバイオアッセイ法で測定した。

IL-12 のバイオアッセイ

マウス IL-12 のバイオアッセイは、Skeen らの方法(62)で行った。すなわち、96 ウェルプレートに 10 μg/ml の抗 IL-12p40 抗体 (C15.1.2.1) (PharMingen) をコーティングし、4°C で一晩静置した。ウェルを洗浄し、様々な濃度のリコンビナント IL-12 (rIL-12)、脾臓またはマクロファージの培養上清をウェルに加え、プレートを一晩インキュベートした。正常マウスの脾臓細胞を 1 X 10⁶ 個/well の濃度で 200 μl ずつ 96 ウェルプレートに添加した。CO₂ インキュベーター中で 37°C 40 時間の培養後、培養上清を回収し、IFN-γ 濃度を ELISA で測定した。既知の rIL-12 濃度と IFN-γ

濃度との検量線から上清中の IL-12 濃度を外挿した。このバイオアッセイ法では、コーティングした抗体に、IL-12p40 と p70 が結合するが、IL-12p70 だけが IFN-γ 産生を誘導できる。

統計

結果は、平均値±SE で示した。統計計算は、Student's t test で解析し、*p* < 0.05 を有意とした。

C-1 結果

カゼインを経口摂取した DBA/2 マウスの血清中のカゼイン特異抗体

本章では離乳直後 (3 週齢) のマウスにヌクレオチド添加食または無添加食を自由摂取させた。これにより、ヌクレオチド摂取の影響がより明確に観察されることが期待できる。なお、このときの成長曲線には、2 群間でほとんど差が見られなかった (データ省略)。

これまでにヌクレオチドの経口投与が、Alum と OVA で免疫した BALB/c マウスの抗原特異的な IgE 抗体価を有意に抑制することを示している。しかし、アジュバントそれ自体が、非特異的に T 細胞の反応を修飾するため、アジュバントの使用は、食物アレルギー等の研究にとって望ましいものでない。ところで、カゼインを DBA/2 マウスに摂取させると、その血清中にカゼイン特異的な IgE が誘導されることが示唆されている。そこで、ヌクレオチドがカゼインを摂取した DBA/2 マウスの血清中の

特異抗体に与える影響を検討した。その結果、3週齢から Casein-NT(-) 食または Casein-NT(+) 食を DBA/2 マウスに自由摂取させた場合、Casein 特異的な IgG1 抗体価については、両群間でほとんど差が見られなかった(図2)。しかし、Casein-NT(+) 食を摂取した DBA/2 マウスは、Casein-NT(-) 食の DBA/2 マウスに比べ、血清中の Casein 特異的な IgG2a 抗体価が、5週齢で有意に上昇した(図2)。カゼイン特異的な IgE は、この実験条件では検出できなかった。

OVA を経口摂取した OVA-TCR Tg マウスの血清中の OVA 特異抗体価

OVA-TCR Tg マウスは OVA を経口摂取させることにより、その血清中に OVA 特異的な IgE 抗体を発現する。そこで、2%の OVA 水溶液投与下で、3週齢から NT(-) 食または NT(+) 食を OVA-TCR Tg マウスに自由摂取させ、その血清中の OVA 特異的な抗体価について検討した。この結果、NT(+) 食を摂取した OVA-TCR Tg マウスは、NT(-) 食を摂取した OVA-TCR Tg マウスに比べ、血清中の OVA 特異的な IgE 抗体価が、有意差は見られないものの低下する傾向が見られた(図3)。同様に血清中の OVA 特異的な IgG1 抗体価についても、有意差は見られないものの低下する傾向が見られた(図4)。また、OVA 特異的な IgG2a 抗体価については、NT(+) 食を摂取した OVA-TCR Tg マウスの方が有意差は見られないものの高くなる傾向が見られた(図4)。

OVA-TCR Tg マウスの脾臓細胞の OVA 特異的なサイトカイン産生

OVA-TCR Tg マウスの脾臓細胞を *in vitro* で OVA とともに培養すると、OVA 特異的にサイトカインを産生することが知られている。そこで、OVA-TCR Tg マウスに OVA を経口摂取させることにより OVA 特異的な抗体産生応答を誘導する系において、脾臓細胞のサイトカイン産生を調べた。すなわち、2%の OVA 水溶液投与下で、3週齢から7週齢まで NT(-) 食または NT(+) 食を OVA-TCR Tg マウスに自由摂取させ、このマウスの脾臓細胞を OVA とともに培養した場合の IFN- γ および IL-4 産生能を検討した。その結果、脾臓細胞の OVA 特異的な IFN- γ 産生能は、NT(+) 食群が、NT(-) 食群に比べて有意に高くなった(図5)。一方、OVA 特異的な IL-4 産生能は、両群間で有意な差は見られなかったが、NT(+) 食群で低下する傾向が見られた(図5)。なお、このとき、OVA 非存在下の培養上清から IL-4 と IFN- γ はほとんど検出されなかった(データ省略)。

OVA-TCR Tg マウスの抗原提示細胞の CD80 (B7-1) と CD86 (B7-2) の発現

Kuchroo らは、抗原提示細胞上の CD80 と T 細胞との結合が Th1 を誘導し、抗原提示細胞上の CD86 と T 細胞との結合が Th2 を誘導するということを明らかにした。そこで、ヌクレオチドが Th1 優位にする機構を検討するため、ヌクレオチドの摂取が脾臓の抗原提示細胞(CD3 陰性細胞)の CD80 と CD86 の発現に与える影響を調べた。CD3

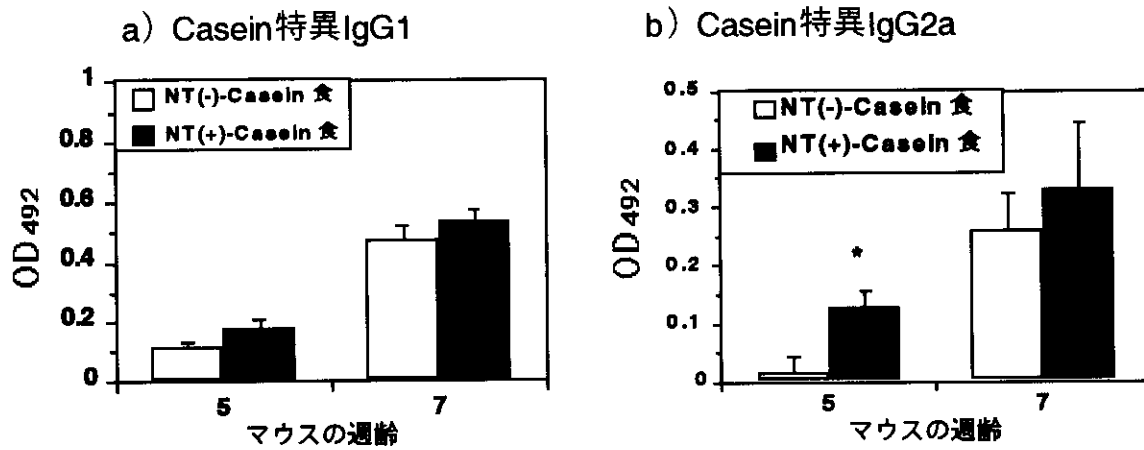


図2 ヌクレオチドの経口摂取が、カゼインを摂取した DBA/2 マウスの血清カゼイン特異的IgG1 (a)とIgG2a (b)抗体価に与える影響 * ; p<0.05

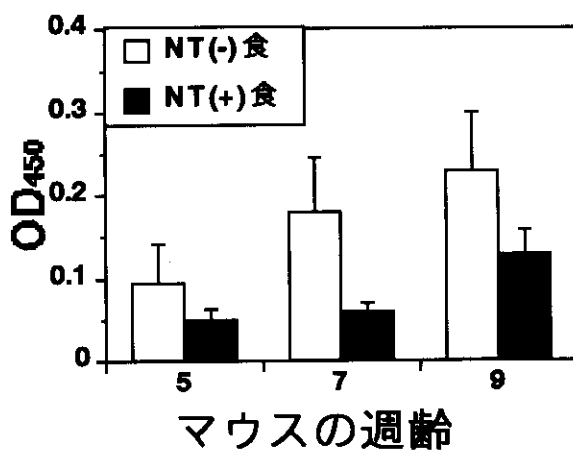


図3 ヌクレオチドの経口摂取が、OVA経口摂取により誘導される OVA-TCR Tg マウスの血清中のOVA特異的なIgE抗体価に与える影響

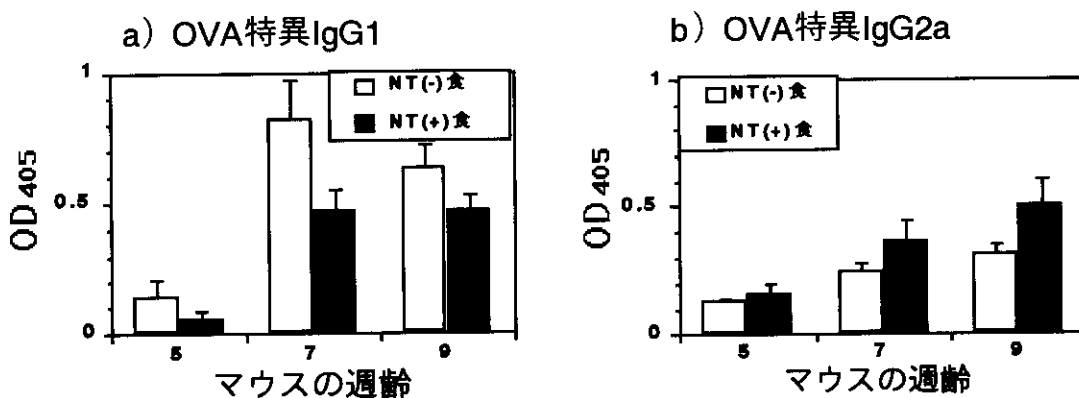


図4 ヌクレオチドの経口摂取が、OVAの経口摂取により誘導される OVA-TCR Tg マウスの血清中のOVA特異的なIgG1 (a)とIgG2a (b)抗体価に与える影響

陰性細胞中で CD80 を発現する細胞の割合は、NT(-)食群が 9.4%、NT(+)食群が 10.1%で、ヌクレオチドによる CD80 の発現はほとんど差が見られなかった。同様に、CD86 を発現する細胞の割合は、NT(-)食群が 95.1%、NT(+)食群が 95.4%となった。以上より、両群間で CD80 と CD86 の発現の差はほとんど見られなかった(図 6)。

脾臓細胞の IL-12 の発現

IL-12 は Th1 型の免疫応答を誘導する重要な因子である。この IL-12 は、p35 と p40 の 2 つのサブユニットから構成されたヘテロダイマー (p70 型) で活性を示すが、p35 や p40 単独では活性を示さない。本研究では、最初に、2%の OVA 水溶液投与下で 3 週齢から 7 週齢まで NT(-)食または NT(+)食を OVA-TCR Tg マウスに自由摂取させ、その脾臓細胞の IL-12 産生能を ELISA で検討した。この方法では、非活性型の IL-12 p40 と活性型の IL-12 p70 の総和が測定できる。その結果、脾臓細胞の IL-12 産生能は、NT(+)食群が、NT(-)食群に比べて有意に高くなった (図 7)。

脾臓細胞および腹腔マクロファージの IL-12 活性

さらに、IL-12 p70 の活性を調べるため、2%OVA 水溶液投与下で、3 週齢から 7 週齢まで NT(-)食または NT(+)食を自由摂取させた OVA-TCR Tg マウスの脾臓細胞や腹腔マクロファージの活性型の IL-12 産生能をバイオアッセイ法で検討した。IL-12 のバイオアッセイ法は、IL-12p70 が脾臓細胞

の IFN- γ 産生能を誘導することを指標に測定する方法である。その結果、脾臓細胞の IL-12 活性は、NT(+)食群の方が NT(-)食群に比べて有意に高くなった (図 8)。さらに、LPS (0.1 または 1 μ g/ml) 刺激下で培養した滲出性の腹腔マクロファージの IL-12 活性もまた、NT(+)食群の方が NT(-)食群に比べて有意に高くなった (図 8)。

ヌクレオチドとともに培養した腹腔マクロファージの IL-12 活性

さらに、ヌクレオチドが in vitro で腹腔マクロファージの IL-12 活性に与える影響を検討した。ヌクレオチド (CMP : GMP : IMP : UMP=1 : 1 : 1 : 1 の組成) (0-10 μ g/ml) とともに腹腔マクロファージを培養し、その上清中の活性型の IL-12 産生能をバイオアッセイ法で検討した。その結果、腹腔マクロファージの IL-12 活性は、ヌクレオチドを 0.32~10 μ g/ml の濃度で添加した場合、ヌクレオチド無添加の場合に比べて有意差は見られないものの、高くなる傾向が見られた (図 9)。

D-1 考察

我々はこれまでに、抗体産生やサイトカイン産生の観点から、ヌクレオチドの経口摂取により、生体内の Th1 と Th2 のバランスが Th1 側に傾くこと、また Alum で免疫した系で、ヌクレオチドの経口摂取が抗原特異的な IgE 産生を抑制することも明らかとしている。

アジュバントを用いずに、カゼインや

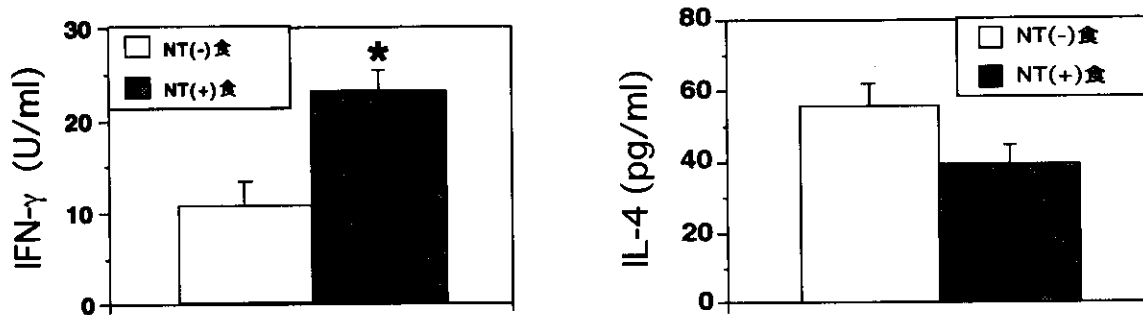


図5 ヌクレオチドの経口摂取が、OVA TCR Tgマウスの脾臓細胞のOVA特異的なサイトカイン (IFN- γ とIL-4) 産生に与える影響
* $p < 0.05$

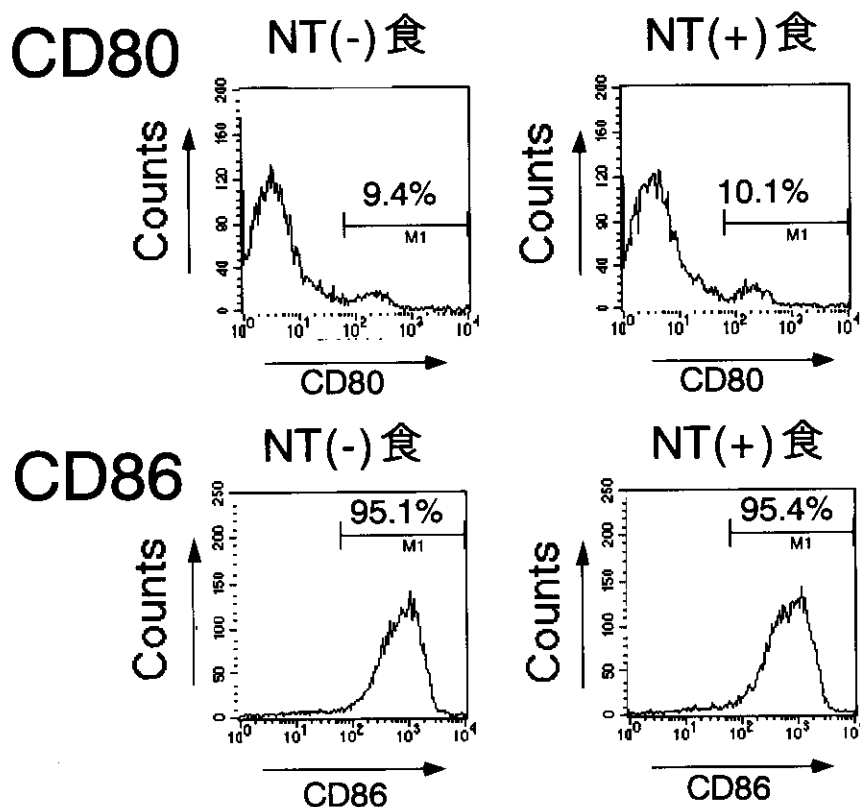


図6 ヌクレオチドの経口摂取がOVA-TCR Tgマウスの脾臓のCD3陰性細胞のCD80およびCD86発現に与える影響

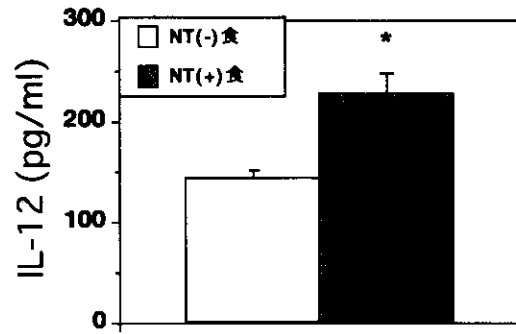


図7 ヌクレオチドの経口摂取がOVA-TCR Tgマウスの脾臓細胞のIL-12 (IL-12 p40とp70の総和) 産生に与える影響 * ; p<0.05

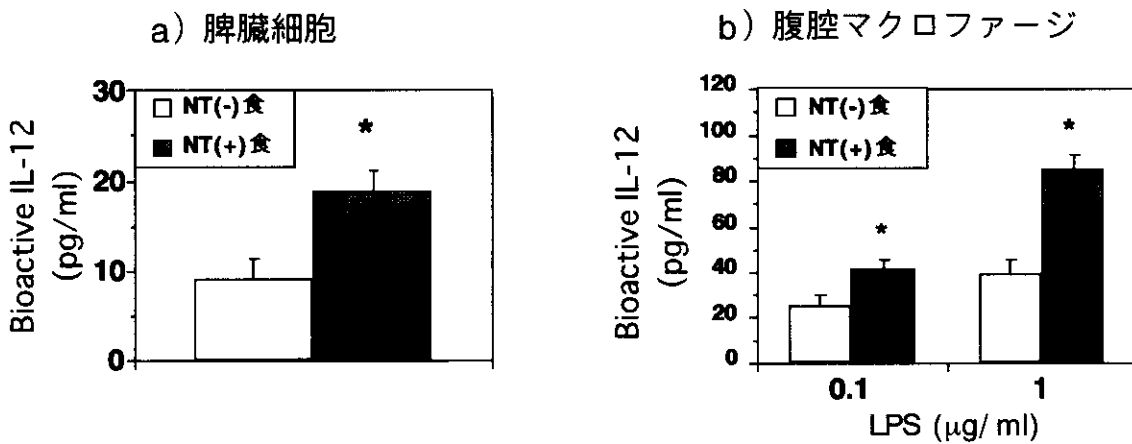


図8 ヌクレオチドの経口摂取がOVA-TCR Tgマウスの脾臓細胞 (a)および腹腔マクロファージ (b)のIL-12産生に与える影響

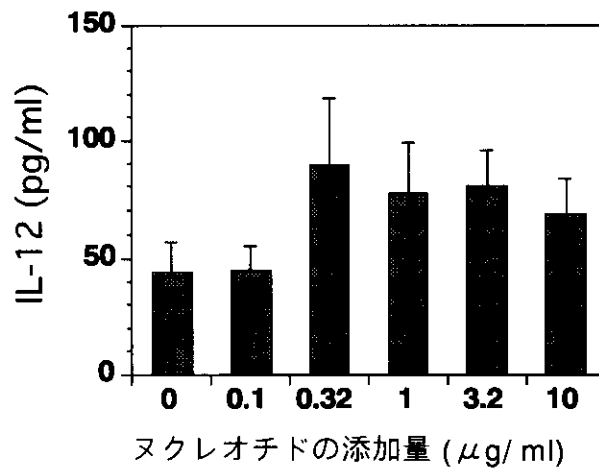


図9 in vitro で添加したヌクレオチドがBALB/c マウスの腹腔マクロファージのIL-12産生に与える影響

OVA を経口摂取することにより、DBA/2 マウスや OVA-TCR Tg マウスに抗原特異的な IgE を誘導できることが報告されている。これらのマウスを用いた系は、食物アレルギーにおける IgE 産生を解析するのに役立つ。本研究で、OVA-TCR Tg マウスでは、ヌクレオチドの経口摂取により、OVA の経口摂取により誘導される血清中の OVA 特異的な IgE と IgG1 が低下する傾向が見られた。それに対し、DBA/2 マウスと OVA-TCR Tg マウスの抗原特異的な IgG2a は、ヌクレオチド投与群で上昇した。OVA-TCR Tg マウスの抗原刺激下で培養した脾臓細胞の IFN- γ 産生は、ヌクレオチド投与群で高くなった。これにより、アジュバントを用いずに特異抗体を誘導した場合でも、ヌクレオチドは食物抗原に対する Th1 型の免疫反応を誘導することが考えられる。

抗原提示細胞上の細胞表面分子に関して、Kuchroo らは、抗原提示細胞上の CD80 と T 細胞との結合が T 細胞を Th1 の方向に、抗原提示細胞上の CD86 と T 細胞との結合が Th2 の方向に傾けることを示唆した。そこで、我々はヌクレオチドが Th1-Th2 バランスを Th1 優位にする機構を調べるために、抗原提示細胞上の CD80 や CD86 の発現について検討した。その結果、ヌクレオチドの摂取により、CD80 と CD86 の発現にほとんど差は見られず、抗原提示細胞上の CD80 と CD86 の発現がヌクレオチドによる Th1 の誘導に関与していないことが示唆された。

IL-12 はマクロファージ、単球や樹状細胞などのような抗原提示細胞によって産生

される。IL-12 は、Th1 型の細胞性免疫を誘導し、Th2 型のリンパ細胞への分化を阻害することにより、ヘルパー T 細胞の分化に影響を与える。また、IL-12 は、IFN- γ の産生を誘導することにより、マクロファージや T 細胞を調節しているサイトカインネットワークの重要な位置に存在している。一方、核酸はマクロファージの活性化に関与することが知られている。Kulkarni らは、核酸無添加食を摂取したマウスでは、マクロファージの *Staphylococcus aureus* に対する貪食作用が低下することを見出している。本研究でも、in vivo で経口摂取されたヌクレオチドや in vitro で添加したヌクレオチドが、マクロファージの IL-12 産生能を促進することを示した。また、ヌクレオチドの経口摂取が Th1 の免疫応答を誘導し、IgE 産生を抑制した。これらを総合して考えると、ヌクレオチドによる Th1 の誘導は、マクロファージの IL-12 産生の上昇によって引き起こされている可能性が高いと考えられる。

ヌクレオチドの混合物中のどのヌクレオチドが免疫系に影響を及ぼし、ヌクレオチドがどのような機構で細胞に影響を与えているのであろうか。ヌクレオチド以外の核酸で、細菌由来の非メチル化 CpG ジヌクレオチドの配列を含む DNA (CpG モチーフ) もまた、Th1-Th2 のバランスを Th1 優位にすることが知られている。細菌由来の非メチル化 CpG ジヌクレオチドは直接単球やマクロファージを活性化する。ヌクレオチドと同様に、CpG がマクロファージの Th1 型のサイトカインである IL-12 産生を促進

することで、ヘルパー T 細胞の Th1 型のサイトカイン産生を誘導する。さらに、CpG モチーフが Th1 型の免疫応答を高めることにより、アレルギーの発症を抑制することが示唆されている。抗原で感作し、Th2 型の反応を誘導したマウスに、抗原とともに CpG モチーフを投与すると、Th1-Th2 のバランスが Th1 優位になり、アレルギー反応を抑制するという報告もある。CpG モチーフを考慮すると、ヌクレオチド中の CMP や GMP が、Th1 の誘導に重要なものかもしれない。

一方、CpG モチーフがどのような方法で細胞内に取り込まれ、シグナルを伝達するかは明らかでない。MAPキナーゼ (MAPK) は細胞内のシグナル伝達に重要な役割を果たす。この MAPK ファミリーに属する分子として、C-Jun N-terminal Kinase (JNK) や p38 キナーゼが知られている。これまでの報告では、CpG モチーフはエンドサイトーシスによって取り込まれ、JNK や p38 キナーゼを活性化することが示唆されている。また、細胞内の分子が CpG モチーフと特異的に結合することや免疫応答に関する遺伝子の発現を制御する転写因子である Nuclear Factor κ B (NF κ B) を活性化しているということも報告されている。したがって、ヌクレオチドによるマクロファージの活性化が CpG モチーフと同様の機構で起きていると考え、ヌクレオチドがエンドサイトーシスによって取り込まれ、細胞内のレセプターによって JNK や p38 の経路や NF κ B が活性化されて、マクロファージの活性の上昇が起こる可能性が考えら

れる。

IL-12 が NK 細胞の細胞傷害活性やマクロファージの活性のような細胞性免疫応答を促進することから考えると、IL-12 は、ガンの抑制に対して重要な役割を果たしている可能性がある。実際、IL-12 は、in vitro で白血病患者の NK 細胞の細胞傷害活性を促進することが知られている。転移性のガンに関する動物実験では、ガンの成長の抑制や転移の抑制および延命効果に関して劇的な効果がある。IL-12 を投与し続けることにより、ガン細胞の転移や成長を有意に抑制したという報告もある。さらに、いくつかの研究グループでは、IL-12 投与の臨床試験を行っている。一方、経口摂取されたヌクレオチドが NK 細胞の活性を高めるという報告もある。このため、ヌクレオチドの経口摂取は、IFN- γ や IL-12 産生の上昇や NK 細胞の活性の促進を通して、ガンの抑制につながる可能性がある。

ヌクレオチドの他に、乳酸菌もまた、Th1 を誘導する食餌成分として知られる。ヌクレオチドのように、乳酸菌は、in vitro および in vivo で IL-12 産生を誘導し、抗原特異的な IgE 産生を抑制することが示唆されている。ある種の乳酸菌は、ヒトの末梢血単核細胞の IL-12、IFN- γ 、IL-18 産生も促進することが明らかとなっている。実際、最近の研究で、乳酸菌はヒトのアレルギーの発症を抑制することが示唆されている。Majamaa と Isolauri は、*Lactobacillus GG* を投与した乳児のアトピーのスコアは有意に回善したことを報告している。したがって、ヌクレオチドとこれらの細菌を同時に

投与することにより、より効率よく Th1-Th2 バランスを Th1 優位にし、アレルギーの発症を抑制できる可能性も考えられる。

E-1 結論

本研究により、食物抗原を摂取させた場合に誘導される抗原特異的な IgE 応答に対しても、ヌクレオチドは成長期のマウスにおいて抑制効果を示し、抗原特異的な Th1 型の免疫応答を高めることが明らかとなった。このとき、マクロファージのような抗原提示細胞の産生する IL-12 の上昇を通して、Th1 の免疫応答を高めている可能性が示唆された。本研究の結果から、ヌクレオチドは、食物アレルギーの抑制にも有用である可能性が考えられる。

第二章：経口摂取されたヌクレオチドが腸管免疫系に与える影響

序

第一章およびこれまでの研究結果より、ヌクレオチドの経口摂取は、血清中の IgE 抗体価を低下させ、アレルギーの抑制に効果がある可能性が示唆された。腸管中の IgA もアレルギーの抑制に重要な役割を果たすことが知られている。例えば、乳幼児期の食物アレルギー患者では、健康な小児と比較して唾液中の IgA 抗体価は低いという報告がある。また、卵アレルギーの患者の卵白アルブミン特異的な IgA 産生細胞数は、健康人より少ないことも報告されている。さらに、IgA 欠損症の小児の半数は、アレルギー性鼻炎、喘息、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎を伴い、健康な小児に比べて、これらの合併率は約 3 倍であるということも見出されている。

しかし、ヌクレオチドが IgA 産生に与える影響について調べた報告はほとんどない。OVA-TCR Tg マウスに OVA を自由摂取させると、腸管中に OVA 特異的な IgA 抗体が産生されることが知られている。そこで、本章第一節では、ヌクレオチドの経口摂取が、OVA-TCR Tg マウスの糞中の OVA 特異的な IgA 抗体価について検討した。

一方、経口摂取されたヌクレオチドは、正常な腸管の機能を維持するのに、重要な役割を果たすことが知られている。ヌクレオチドの *in vitro* での添加は、グルタミン欠乏下で上皮細胞様の細胞株である Caco-

2 のスクラーゼ、ラクターゼ、アルカリホスファターゼなどの刷子縁膜の酵素活性を高める。*In vivo* での実験でも、ヌクレオチドは上皮細胞の増殖や分化に影響を与えることが証明されている。ヌクレオチド欠乏食を、ラットに摂取させると、*villus tip* 上のアルカリホスファターゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、マルターゼ、スクラーゼやラクターゼの活性が低下することが示唆されている。Uauy らは、成長期のラットにヌクレオチド添加食を摂取させると、粘膜タンパク質、DNA 量、絨毛の高さや二糖類分解酵素の活性が上昇することを示した。このように、ヌクレオチドは、腸管管腔の発達に非常に重要である。

IEL は全身免疫系の T 細胞と比較して、TCR γ δ 陽性 T 細胞のサブセットの割合が高い。この TCR γ δ 陽性 T 細胞は、腸管の IgA 産生や全身免疫系の Th1-Th2 バランスに影響を与えているという報告がある。この IEL と腸管上皮細胞はその分化や活性を相互に制御し合うことが知られている。しかし、ヌクレオチドが IEL に与える影響や腸管上皮細胞のサイトカイン産生に与える影響については、ほとんど明らかにされていない。そこで、本章第二節では、ヌクレオチドが IEL のサブセットに与える影響を検討した。本章第三節では、ヌクレオチドが IEL のサブセットを変化させる機構を調べるため、IEL のサイトカインレセプターの発現や IEL と腸管上皮細胞のサイトカイン産生に与える影響についても調べた。

第一節：ヌクレオチドの摂取が腸管の抗原特異的な IgA を促進する

B-2 (1) 研究方法

マウスと食餌

雌の BALB/c マウス (3 週齢) は日本 SLC から購入した。OVA-TCR Tg マウスは東京大学農学部動物室で飼育したものをを用いた。第一章で用いた NT(+) 食または NT(-) 食を離乳直後 (3 週齢) の BALB/c マウスに 2 週間自由摂取させた。また、離乳直後 (3 週齢) の OVA-TCR Tg マウスには、2%OVA 水溶液を自由摂取させるとともに、NT(+) 食または NT(-) 食を 4-5 週間自由摂取させた。自由摂取後、マウスから小腸を採取し、IEL のサブセットおよび IEL や腸管上皮細胞の TGF- β 産生能を検討した。

糞便の調製

2%OVA 水溶液投与下で、NT(-) 食または NT(+) 食を OVA-TCR Tg マウスに摂取させ、6、7、8 週齢で糞を採取した。20mg の糞を 1ml の PBS に溶かし、氷冷下でホモゲナイズし、2°C で 2000rpm 15 分間遠心分離した。遠心後、上清を回収し、OVA 特異的な IgA 抗体を分析するまで、-25°C で保存した。

OVA 特異的な IgA 抗体の測定

OVA 特異的な IgA 抗体価の測定は、ELISA 法で検討した。0.1mg/ml の OVA を含む pH9.6 の 0.05M の炭酸緩衝液を 96 ウェルプレートに 1well 当たり 100 μ l ずつコ

ーティングし、4°C で一晩静置した。0.1% の Tween 20 を含む PBS で 4 回洗浄し、1.5% のゼラチンを含む炭酸緩衝液をプレートに加え、室温で 30 分間静置した。洗浄後、0.1% の Tween 20 と 3% の PEG6000 を含む PBS で希釈した糞便のサンプルを 1well 当たり 100 μ l ずつプレートに加え、室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgA 抗体 (Zymed) をプレートに加え、遮光して室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、1mg/ml の *p*-ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミンバッファー (pH9.8) を 1well 当たり 100 μ l ずつプレートに加え、遮光して室温で 1 時間静置した。その後、5N の水酸化ナトリウムをそれぞれ 1well 当たり 20 μ l ずつプレートに加え、反応を停止した。測定波長 405nm、対照波長 490nm で吸光度を測定した。

腸管上皮細胞の調製

小腸上皮細胞の調製は、Perreault と Beaulieu の方法に従って行った。マウスは 7 週齢の OVA-TCR Tg マウスを用いた。小腸を切り開き、PBS で小腸内容物を洗い流し、4 等分した。4 等分した小腸を 10ml の氷冷した MatrisPerse (Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson Lab., Mississauga, Ontario, Canada) が入った 15ml のチューブに移した。この小腸を攪拌せずに 4°C で 8 時間静置した。その後、チューブを軽く攪拌し、腸管上皮細胞を分離した。この腸管上皮細胞の懸濁液を PBS で 2 回洗浄 (4°C、1600rpm、8

分間遠心分離)した。この腸管上皮細胞を 100U/ml のペニシリン G (GIBCO)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (GIBCO)、5 $\times 10^{-5}$ M の 2-メルカプトエタノールおよび 2mM の L-グルタミンを含む RPMI1640 培地 (Nissui Pharmaceutical Co.) で懸濁し、96well プレートに加えた (2×10^5 個/well)。この腸管上皮細胞を、5%CO₂ 下 37°Cで 16 時間培養した。この時の培養上清中の TGF- β 濃度を測定した。

TGF- β の測定

TGF- β の測定には、Promega社(Madison、MI、USA)の TGF- β 1 Immunoassay System を用いた。ユーザーマニュアルに従って、サンプル中の TGF- β 濃度を測定した。TGF- β Coat 抗体溶液を PBS で 1000 倍希釈し、100 μ l ずつ 96well プレートに加えた。4°C一晩静置後、TGF- β Block Buffer を脱イオン水で 5 倍希釈し、1well 当たり 270 μ l ずつ加えた。37°C35 分間静置後、TGF- β Sample Buffer で希釈したスタンダードとサンプルを 1well 当たり 100 μ l ずつ加えた。室温で 2 時間静置し、洗浄後、TGF- β Sample Buffer で 1000 倍希釈した抗 TGF- β 抗体を 1well 当たり 100 μ l ずつ 96well プレートに加えた。室温で 2 時間静置し、洗浄後、TGF- β Sample Buffer で 1000 倍希釈した Antibody Conjugate を 100 μ l ずつ 96well プレートに加えた。室温で 2 時間静置し、5 回洗浄後、TMB Solution と Peroxidase Substrate を 1:1 の割合で混合し、この混合液を 1well 当たり 100 μ l ずつ 96well

プレートに加えた。1M リン酸を 1well 当たり 100 μ l ずつ加え、反応を停止した。吸光値は、測定波長 450nm、対照波長 550nm で測定した。

統計

結果は、平均値 \pm SE で示した。統計計算は、Student's t test で解析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C-2(1) 結果

ヌクレオチドの経口摂取が腸管の抗原特異的な IgA 抗体価に与える影響

腸管の IgA は食物アレルギーの抑制に重要な役割を果たす。しかし、経口摂取されたヌクレオチドが腸管の IgA に与える影響についてはこれまで報告がない。そこで、経口摂取されたヌクレオチドが、OVA 水溶液投与下で OVA-TCR Tg マウスの糞中の OVA 特異的 IgA 抗体価に与える影響を調べた。この結果、OVA 特異的な IgA 産生に対しては、6 および 7 週齢では、ヌクレオチドの影響はほとんど認められなかった。しかし、8 週齢では、ヌクレオチドを摂取したマウスの方が、摂取していないマウスに比べて有意に高くなった (図 10)。

小腸上皮細胞の TGF- β 産生能

腸管上皮細胞は TGF- β を産生し、この TGF- β は IgA へのクラススイッチを誘導するサイトカインである。そこで、ヌクレオチドの投与による IgA 産生が上昇する機構を検討するため、3 週齢の OVA-TCR Tg マ

ウスに 4 週間、OVA とともにヌクレオチドを投与し、その小腸上皮細胞の培養上清中の TGF- β 濃度を ELISA で測定した。その結果、OVA-TCR Tg マウスの小腸上皮細胞の TGF- β 産生は、NT(+) 食群の方が、NT(-) 食群に比べて有意に高くなった (図 11)。

D-2 (1) 考察

腸管の IgA もアレルギーの抑制に重要な役割を果たす。IgA 欠損症では、食物アレルギーの発症率が高い。その原因として IgA 抗体を欠くために食物抗原が生体内に高頻度に吸収され、アレルギーに対して、より感作されやすくなるためと考えられている。本研究では、ヌクレオチドの摂取が腸管の IgA 産生を上昇させることを示した。これによって、抗原性を保った食物抗原の腸管での吸収が低下することが考えられる。従って、ヌクレオチドは腸管の IgA 産生を促進することによっても、食物アレルギーを抑制する可能性が考えられる。

in vitro や in vivo の実験系で腸管上皮細胞の消化酵素の活性を調べることによって、ヌクレオチドは腸管上皮細胞の分化や活性を促進することが報告されている。腸管上皮細胞は TGF- β を産生するが、本研究結果より、経口摂取されたヌクレオチドは腸管上皮細胞の TGF- β 産生を促進することが明らかになった。従って、本研究結果は、初めて腸管上皮細胞のサイトカイン産生の観点から、ヌクレオチドが腸管上皮細胞の活性を促進することを示した。

TGF- β は、IgA のクラススイッチに重要な役割を果たす。TGF- β は IgM 産生 B 細胞を IgA 産生細胞にクラススイッチするのを促進するサイトカインである。これまでは、パイエル板の T 細胞が TGF- β を産生し、IgA へのクラススイッチを促進していると考えられていた。しかし、腸管上皮細胞が産生する TGF- β も IgA 産生を促進することが、in vitro の系で示されている。上皮細胞株である IEC-6 の培養上清で B 細胞を培養すると、IgA 産生が上昇するが、このとき抗 TGF- β 抗体を IEC-6 の培養上清に添加すると、IgA 産生が低下することが報告されている。本研究では、ヌクレオチドの摂取が腸管上皮細胞の TGF- β 産生を上昇させることを明らかにした。従って、ヌクレオチドの摂取は、小腸上皮細胞の TGF- β 産生の上昇を通して、糞中の OVA 特異的な IgA 抗体価が上昇する可能性が考えられる。

E-2 (1) 結論

ヌクレオチドの摂取は、小腸上皮細胞の活性化を促進することにより、腸管の IgA 産生を促進している可能性が示唆された。

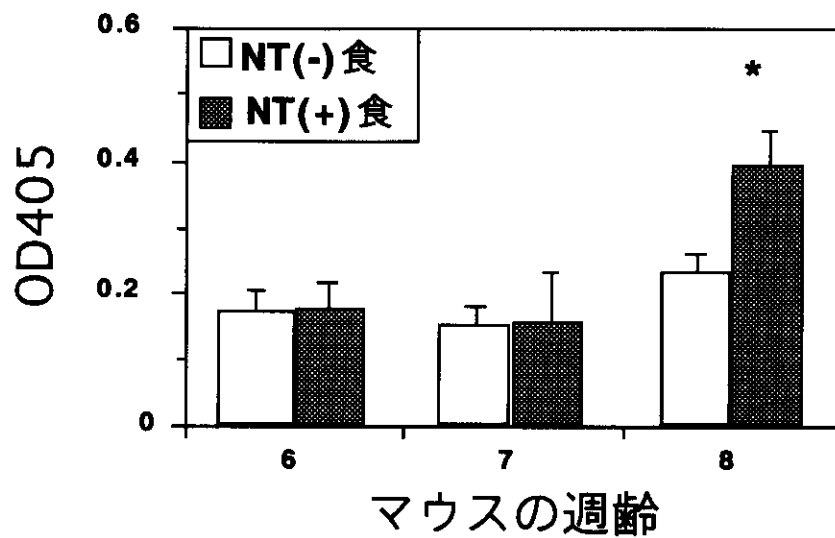


図10. ヌクレオチドの経口摂取が、OVAの経口摂取により誘導されるOVA-TCR Tgマウスの糞便中のOVA特異的なIgA抗体価に与える影響 * ; $p < 0.05$

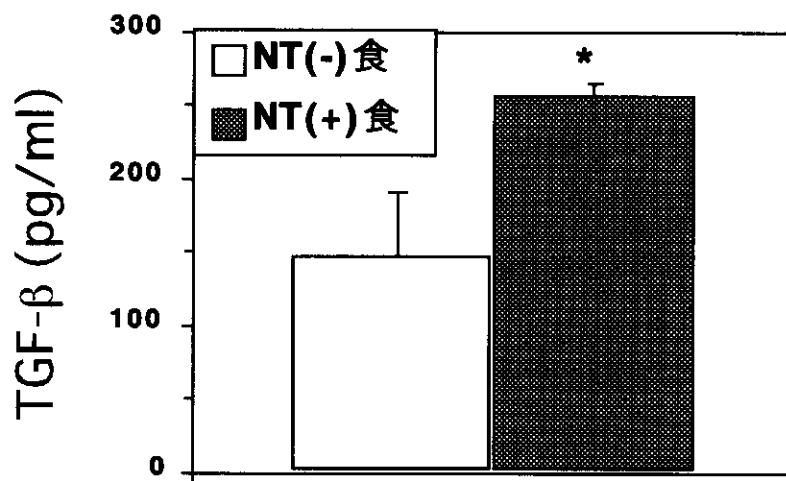


図11. ヌクレオチドの経口摂取が、OVA-TCR Tgマウスの小腸上皮細胞のTGF- β 産生に与える影響 * ; $p < 0.05$

第二節：ヌクレオチドの摂取が腸管上皮間リンパ球 (IEL) の TCR γ δ 陽性 T 細胞の割合を高める

B-2 (2) 研究方法

マウスと食餌

雌の BALB/c マウス (3 週齢) は日本 SLC から購入した。OVA-TCR Tg マウス (61) は本章第一節と同様に飼育したものをを用いた。第一章で用いた NT(+) 食または NT(-) 食を離乳直後 (3 週齢) の BALB/c マウスに 2 週間自由摂取させた。また、離乳直後 (3 週齢) の OVA-TCR Tg マウスには、2% OVA 水溶液を自由摂取させるとともに、NT(+) 食または NT(-) 食を 4 週間自由摂取させた。4 週間後、マウスから IEL を調製し、IEL のサブセットを検討した。

IEL の調製

IEL は 5 週齢の BALB/c マウスまたは 7 週齢の OVA-TCR Tg マウスから採取した。IEL の調製は、Nanno らの方法に従って行った。小腸をマウスから採取し、小腸の内容物をハンクス液で除去した。内容物を除いた小腸をポリエチレンチューブで反転し、腸管の管腔側を露出した。反転した小腸を、5% FCS 含有ハンクス液 (GIBCO) 45ml の入った 50ml チューブに、4 等分して入れた。この小腸の入ったチューブを 37°C 135rpm で 45 分間振とうした。振とう後、小腸を除き、細胞懸濁液をガラスウールカラムに通し、接着性の細胞を除いた。次に、30% (wt/vol) パーコール (Amersham

Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden) に細胞を懸濁し、室温 1800rpm で 25 分間遠心分離した。さらに、この細胞を 44% パーコールと 70% パーコールで密度勾配遠心 (室温 1800rpm で 25 分間) し、その界面に存在する IEL を回収した。

フローサイトメトリー

IEL のサブセットは、2 種類または 3 種類の蛍光色素を用いて染色して、フローサイトメーターで調べた。細胞の染色は、ビオチン標識抗マウス TCR β 抗体 (H57-597; PharMingen)、ビオチン標識抗マウス CD4 抗体 (H129.19; PharMingen)、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス TCR δ 抗体 (GL3; Cedar Lane Lab., Ontario, Canada)、FITC 標識抗マウス CD4 抗体 (H129.19; PharMingen)、phycoerythrin (PE) 標識抗マウス CD8 α 抗体 (53-6.7; GIBCO)、FITC 標識抗マウス CD8 β 抗体 (Y8.77; Seikagaku Co.) および Red 670 標識ストレプトアビジン (GIBCO) を用いた。染色は、IEL をビオチン標識抗体とともに 4°C 30 分間暗所で静置した。静置後、細胞を洗浄し、FITC あるいは PE 標識抗体および Red670 標識ストレプトアビジン存在下で再度 4°C 30 分間暗所で静置した。その後、1% FCS と 0.1% アジ化ナトリウムを含有するハンクス液で細胞を 2 回洗浄し、フローサイトメーター (FACSsort) で調べた。

統計

結果は、平均値 \pm SE で示した。統計計算

は、Student's t test で解析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C-2 (2) 結果

ヌクレオチドの経口摂取が IEL の TCR $\alpha\beta$ 陽性、 $\gamma\delta$ 陽性サブセットに与える影響

ヌクレオチドの腸管免疫系への影響はほとんど明らかにされていない。そこで、経口摂取されたヌクレオチドが、BALB/c マウスおよび OVA-TCR Tg マウスの IEL のサブセット (TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞および TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞) (表 1 参照) に与える影響をフローサイトメトリーで検討した。その結果、BALB/c マウスおよび OVA-TCR Tg マウスともに、IEL 中の TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞のサブセットの割合は、NT(-) 食群に比べて、NT(+) 食群の方が有意に高くなった。一方、TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞のサブセットの割合は、NT(-) 食群に比べて、NT(+) 食群の方が有意に低くなった (図 12 および図 13)。さらに、BALB/c マウスと OVA-TCR Tg マウスともに、TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞と TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞の比率 (TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$) は、NT(-) 食群に比べて、NT(+) 食群の方が有意に低下した (図 12 および図 13)。

ヌクレオチドの経口摂取が IEL の CD4 と CD8 のサブセットに与える影響

TCR $\alpha\beta$ を発現している IEL は、CD4 陽性 CD8 陰性 (CD4+CD8-)、CD4-CD8 $\alpha\beta$ +, CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +, CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + および CD4-CD8-の細胞群に分けられる (表

1)。また、TCR $\gamma\delta$ を発現している IEL は CD4-CD8 $\alpha\alpha$ + と CD4-CD8-の細胞群に分けられる (表 1)。そこで、我々は、経口摂取されたヌクレオチドが、CD4 や CD8 の発現に関して、BALB/c マウスおよび OVA-TCR Tg マウスの IEL のサブセットに与える影響を検討した。その結果、BALB/c マウスおよび OVA-TCR Tg マウスともに、TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞の CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 (CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +) T 細胞の割合は、NT(-) 食群に比べて、NT(+) 食群の方が有意に高くなった (表 4)。このとき、BALB/c マウスでは、TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞の CD4-CD8-のサブセットの割合が少し高くなる傾向があった (表 4)。一方、BALB/c マウスと OVA-TCR Tg マウスともに、TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞中の CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 (CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +) T 細胞の割合は、NT(-) 食群に比べて、NT(+) 食群の方が有意に低下した (表 4)。しかし、どちらのマウスでも、TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞中の CD8 $\alpha\beta$ 陽性 (CD4-CD8 $\alpha\beta$ +) T 細胞の割合は両群間でほとんど差がなかった。また、TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞中の CD8-CD4+, CD4+CD8+, CD4-CD8-細胞の割合も両群間でほとんど差がなかった (表 4)。以上より、ヌクレオチドの自由摂取により、TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞の CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 T 細胞の割合が増加し、TCR $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞中の CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 T 細胞の割合が減少することが明らかとなった。

D-2 (2) 考察

本研究では、TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞は、NT(-)

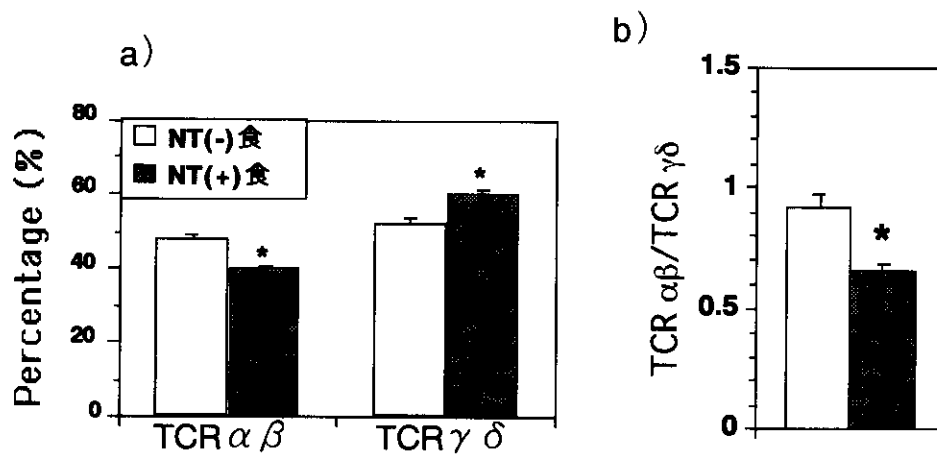


図12 ヌクレオチドの経口摂取がBALB/cマウスIELのTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞とTCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞サブセットの割合 (a) 及び割合の比 (b) に与える影響
* ; $p < 0.05$

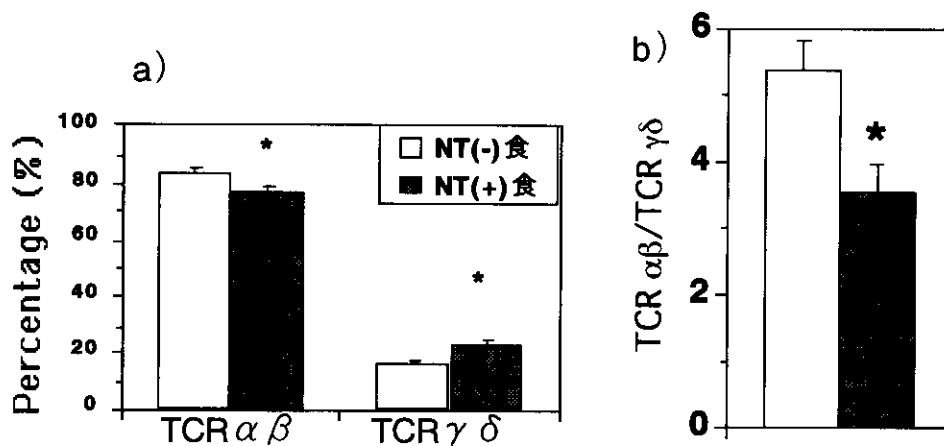


図13 ヌクレオチドの経口摂取がOVA-TCR TgマウスIELのTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞とTCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞サブセットの割合 (a) 及び割合の比 (b) に与える影響
* ; $p < 0.05$

表4 ヌクレオチドを摂取したマウスのIELのTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞とTCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞のサブセットの割合に与える影響

	BALB/c ^a		OVA-TCR Tg ^a	
	NT(-)食	NT(+)*食	NT(-)食	NT(+)*食
TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞				
CD4+CD8+	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0
CD4+CD8-	6.6 ± 1.0	7.3 ± 1.6	7.2 ± 0.7	6.3 ± 0.6
CD4-CD8 $\alpha\beta$ +	14.0 ± 1.4	13.8 ± 0.3	6.3 ± 0.9	5.3 ± 0.7
CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +	20.6 ± 2.2	12.5 ± 1.8*	20.2 ± 0.8	15.8 ± 1.0*
CD4-CD8-	6.1 ± 0.4	6.5 ± 0.5	48.3 ± 1.9	48.4 ± 1.8
TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞				
CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +	40.6 ± 0.8	45.5 ± 0.6*	13.0 ± 1.2	18.2 ± 1.8*
CD4-CD8-	10.0 ± 0.8	13.2 ± 1.0	3.4 ± 0.4	4.4 ± 0.5

a; 全IEL中に占める割合(%)
平均値 ± SE、* ; $p < 0.05$

食群に比べて、NT(+)食群の方が有意に高くなる一方、TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞は、NT(-)食群に比べて、NT(+)食群の方が有意に低くなることを示した。これは、ヌクレオチドがCD8 $\alpha\alpha$ 陽性細胞に影響を与えて起きていることが明らかになった。

IELの中で、TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞にはCD8 $\alpha\alpha$ ホモダイマーを発現する細胞があり、この細胞は、胸腺外分化をすることが知られている。一方、CD4あるいはCD8 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーを発現するTCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞は、胸腺依存性であることが明らかとなっている。また、TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞も胸腺外分化することが報告されている。胸腺のないヌードマウスでは、TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞やCD8 $\alpha\beta$ 陽性細胞は存在しないが、TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞は存在する。本研究で、ヌクレオチドの経口摂取によりTCR $\gamma\delta$ 陽性CD8 $\alpha\alpha$ 陽性T細胞の割合が高くなり、TCR $\alpha\beta$ 陽性CD8 $\alpha\alpha$ 陽性T細胞の割合が減少することを明らかにした。しかし、ヌクレオチドの経口摂取は、TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞中のCD8 $\alpha\beta$ +、CD4+CD8-、CD4+CD8+およびCD4-CD8-細胞の割合には全く影響を与えなかった。以上より、ヌクレオチドの経口摂取は、胸腺外分化したT細胞だけに影響を与えている可能性がある。

抗原を経口摂取すると、その抗原に対する全身性の免疫応答が抑制されるが、これを経口免疫寛容という。TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞は、経口免疫寛容の成立にも関与している可能性がある。Keらは、マウスに抗TCR δ 抗体を投与すると、TCR $\gamma\delta$ の発現が抑

制され、OVAによる経口寛容の誘導を阻害したことを報告している。また、TCR $\gamma\delta$ 欠損マウス(TCR δ 鎖の遺伝子の欠損したマウス)にOVAを経口的に投与しても抗OVA抗体産生は抑制されず、OVAによる経口寛容の誘導は見られなかったことも報告している。したがって、ヌクレオチドはTCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞のサブセットの割合の上昇を通して、経口免疫寛容に影響を与える可能性がある。

TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞はIgAの産生を促進することが知られている。また、TCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞が、抗原特異的IgE産生を抑制することも報告されている。本章の第一節では、経口摂取されたヌクレオチドが腸管のIgA産生を上昇させ、血清中のIgEを低下させることを示した。また、腸管のIELのTCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞の割合が、ヌクレオチドの摂取によって増加することも、本研究で明らかとなった。

E-2 (2) 結論

ヌクレオチドの経口摂取は、腸管IELのTCR $\gamma\delta$ 陽性T細胞の割合の上昇を通して、腸管のIgA産生を上昇させ、IgE産生を低下させた可能性が考えられる。

第三節：ヌクレオチドの摂取が IEL の TCR $\gamma\delta$ 陽性 T 細胞の割合を高める機構

B-2 (3) 研究方法

マウスと食餌

雌の BALB/c マウス (3 週齢) は日本 SLC から購入した。OVA-TCR Tg マウスは、第一節と同様に飼育したものをを用いた。第一章で用いた NT(+) 食または NT(-) 食を離乳直後 (3 週齢) の BALB/c マウスに 2 週間自由摂取させた。また、離乳直後 (3 週齢) の OVA-TCR Tg マウスには、2%OVA 水溶液を自由摂取させるとともに、NT(+) 食または NT(-) 食を 4 週間自由摂取させた。自由摂取後、マウスから小腸を採取し、IEL および腸管上皮細胞を調製した。

IEL の調製

IEL の調製は、本章第二節と同様の方法で行った。

フローサイトメトリー

IEL の IL-2 レセプターおよび IL-7 レセプターの発現は、3 種類の蛍光色素を用いて染色し、フローサイトメーターで調べた。細胞の染色は、FITC 標識抗マウス TCR δ 抗体、ビオチン標識抗マウス IL-7 レセプター抗体 (B12-1 ; PharMingen)、ビオチン標識抗マウス IL-2 レセプター抗体 (CD25) (7D4; PharMingen)、PE 標識抗マウス TCR β 抗体 (H57-597 ; PharMingen) および Red670 標識ストレプトアビジンを用いた。染色およびフローサイトメトリーは本章第

二節と同様の方法で行った。細胞の染色は、IEL をビオチン標識抗マウス IL-7 レセプター抗体または、ビオチン標識抗マウス IL-2 レセプター抗体とともに 4°C30 分間暗所で静置した。静置後、細胞を洗浄し、FITC 標識抗マウス TCR δ 抗体、PE 標識抗マウス TCR β 抗体および Red670 標識ストレプトアビジン存在下で、再度 4°C30 分間暗所で静置した。その後、細胞を 2 回洗浄し、フローサイトメーター (FACSsort) で調べた。

脾臓細胞のマイトマイシン C 処理

50 μ g/ml のマイトマイシン C (SIGMA) を加えた RPMI1640 培地 1ml に、 1×10^8 個の脾臓細胞を加え、37°C で 35 分間静置した。静置後、RPMI1640 培地で 2 回洗浄した。

IEL の培養

固相化した抗マウス CD3 ϵ 抗体 (2C11 ; Cedar Lane Lab.) で刺激した BALB/c マウスの IEL または OVA 刺激した OVA-TCR Tg マウスの IEL のサイトカイン産生能を調べた。抗マウス CD3 ϵ 抗体を Dulbecco's PBS で 10 μ g/ml に希釈し、4°C で一晩静置し、静置後 3 回洗浄した。このプレートに BALB/c マウスの IEL (2×10^5 個/well) を 96well プレートに加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂ 存在下) 中で 2 日間培養した。OVA-TCR Tg マウスの IEL (1×10^5 個/well) は、OVA (1.1mg/ml) の存在下で、2 日間培養した。このとき、1well 当たり、 4×10^5 個のマイトマイシン C 処理した脾臓細胞を加えた。培地は、