

経口抗原に対する免疫応答の誘導に関わる抗原提示細胞の機能
に関する研究

Studies on the functions of the antigen presenting cells which induce
the immune responses to oral antigens

好田 正

目次

略号一覧	3
緒言	5
第一章 抗原の少量経口投与は T 細胞の活性化後に免疫寛容を誘導する のに対し，多量経口投与は活性化を誘導せずに免疫寛容を誘導する 序	23
材料と方法	25
結果	33
考察	52
第二章 パイエル板は経口投与抗原を効率的に取り込み，全身免疫系と は異なった機能を有する抗原提示細胞が特徴的な免疫応答を誘導する 序	61
材料と方法	63
結果	70
考察	86
第三章 パイエル板の抗原提示細胞は抗原濃度に依存して全身免疫系の 抗原提示細胞とは異なった T 細胞分化を誘導する 序	96
材料と方法	98
結果	101
考察	111

総合討論	123
参考文献	130
要約	150
謝辞	156

略号一覧

APC	: antigen-presenting cell	抗原提示細胞
α s1-CN	: α s1-casein	α s1-カゼイン
BSA	: bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CFA	: complete Freund's adjuvant	フロイント完全アジュバント
cpm	: counts per minute	1 分間あたりの放射エネルギーのカウント
CT	: cholera toxin	コレラトキシン
CTLA	: cytotoxic T lymphocyte antigen	細胞傷害性 T 細胞関連抗原
DC	: dendritic cell	樹状細胞
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FCS	: fetal calf serum	ウシ胎児血清
FITC	: fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
GALT	: gut-associated lymphatic tissue	腸管免疫関連組織
IFA	: incomplete Freund's adjuvant	フロイント不完全アジュバント
IFN	: interferon	インターフェロン
Ig	: immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	: interleukin	インターロイキン
LN	: lymph node	リンパ節
LV	: liver	肝臓
MACS	: magnet activated cell sorting	磁気細胞分離
MBP	: myelin basic protein	ミエリン塩基性タンパク質
MHC	: major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MLN	: mesenteric lymph node	腸管膜リンパ節
OVA	: ovalbumin	卵白アルブミン
PBS	: phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	: polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応

PP : Peyer's patch パイエル板

S.I. : stimulation index 刺激係数

SPL : spleen 脾臓

TCR : T cell receptor T 細胞受容体

TGF : transforming growth factor 形質転換増殖因子

Th : helper T cell ヘルパー T 細胞

緒言

腸管は表皮と同様に生体が外界と最も頻繁に接する器官である。一方で、表皮が角質層に覆われ外界の物質（外来抗原）の体内への侵入を、外傷がある場合を除きほとんど完全に防ぐのに対して、腸管は本来の消化吸収器官としての役割から多くの外来抗原と直接的に接し、それらを積極的に体内に取り込み、また同時に病原体の侵入を防ぐという点で大きく異なっている。腸管にはパイエル板、粘膜固有層、腸管上皮内リンパ球など多くの免疫器官(GALT: gut-associated lymphatic tissue)が存在しており、外来抗原の排除のみを主要な目的とする通常の免疫応答とは異なった特徴的な免疫応答を誘導することが知られている。このような経口的に取り込まれた抗原に対して誘導される特徴的な免疫応答のなかでも、特に経口免疫寛容(oral tolerance) (1-6) や immunoglobulin A (IgA)産生 (7, 8) に関してはこれまでに多くの研究が精力的に行われている（図 i）。

経口免疫寛容について

経口免疫寛容は経口的に摂取した抗原すなわち食品に対して誘導される全身性の免疫寛容である (1-3)。本来、免疫寛容は免疫系が自己・非自己を識別し、自己への攻撃を防ぐためのメカニズムである自己寛容として獲得された機構であると考えられる。食品中に含まれるタンパク質などの抗原はほとんどの成分が自己成分とは異なった外来抗原であるものの、同時にエネルギーや栄養源として生体内に取り込まれ生命活動や恒常性の維持に必要不可欠な存在である。日々大量に摂取されるこれら食品成分を排除するための積極的な免疫応答の誘導は生体にとって不必要だけでなく、腸管の炎症やさらには全身における皮膚炎や喘息などの食品アレルギーを引き起こすことへも繋がっていく危険性がある。そこで、外来抗原であるはずの食品抗原に対する免疫寛容状態である経口免

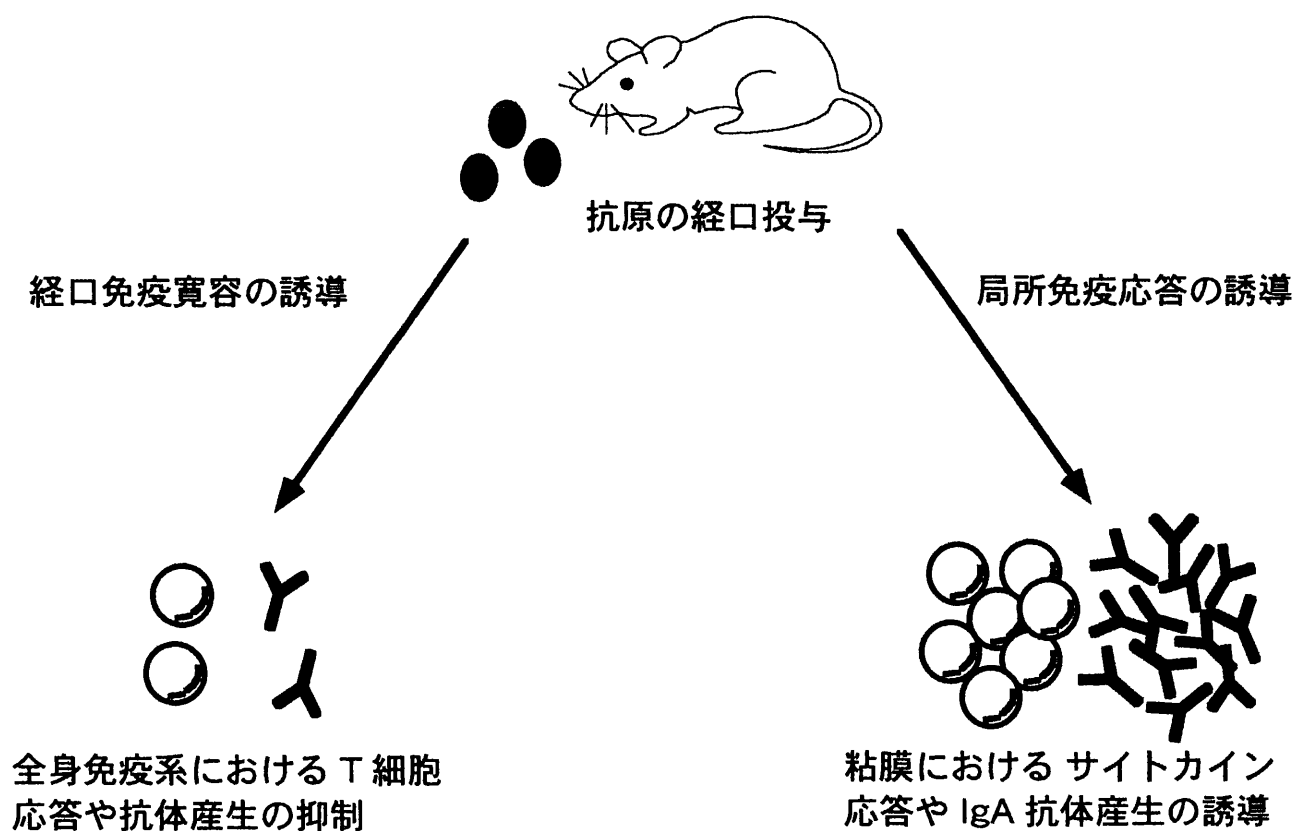


図 i 経口投与された抗原に対する免疫応答の二面性

疫寛容を誘導するメカニズムを獲得したと考えられる。

経口免疫寛容は現象としては古くから慣習的に知られており人々の生活に取り入れられていたが、そのメカニズムが研究されるようになったのは 1970 年代に入ってからのことである (9, 10)。それにより経口免疫寛容が様々な動物種や抗原によって、さらに抗原分子全体によってのみならずペプチドや変性した抗原などによっても誘導される普遍的な生命現象であることが明らかとなった (2, 11-15)。経口免疫寛容のメカニズムの解明は主に T 細胞の機能に関して進められてきた (2, 11-13)。後に平原らによって経口免疫寛容状態下のマウスにおいても B 細胞の機能がほぼ維持されていることが示され、経口免疫寛容における T 細胞の役割がさらに重要視されるようになった (16)。T 細胞の自己寛容が胸腺における発達・成熟の過程で誘導されるのに対し、経口免疫寛容は既に成熟し末梢に存在する T 細胞に誘導されると考えられるため末梢性の寛容 (peripheral tolerance) の一種に分類される。

経口免疫寛容状態下における T 細胞の機能として現在では 1)抑制性サイトカインを産生する調節性 T 細胞の誘導(アクティブサプレッション: active suppression) (17-19), 2)抗原特異的 T 細胞の不応答化(clonal unresponsiveness) (13, 16, 20, 21), 3)抗原特異的 T 細胞の除去(クローナルデリーション: clonal deletion) (11) の三つの説が有力視されている。1)調節性 T 細胞に関しては、Miller らがミエリン塩基性タンパク質(MBP)の経口投与によってラット脾臓中に transforming growth factor β (TGF- β) を産生する T 細胞が誘導されることを報告し、これらの細胞は MBP 特異的な T 細胞応答を *in vivo*, *in vitro* において抑制することを明らかにした (18)。Chen らは MBP を経口投与したマウスの腸管膜リンパ節より TGF- β を産生する MBP 特異的 CD4⁺T 細胞クローンを樹立した (17)。また、西島らは α s1-カゼインを経口投与したマウスのリンパ節より TGF- β に加え interleukin 10 (IL-10)を産生する α s1-カゼイン特異的 CD8⁺T 細胞

クローンを樹立した (22). 2) 抗原特異的 T 細胞の不応答化に関しては, Melamed らによって卵白アルブミン (OVA) の経口投与によって経口免疫寛容を誘導されたマウスのリンパ節より調製した T 細胞は *in vitro* で OVA 刺激に対して増殖応答を示さないものの, IL-2 存在下において前培養することによってその抗原応答性が回復することが示された (13, 20). これは Schwartz が *in vitro* において T 細胞クローンに対して誘導した不応答化 (アナジー: anergy) が IL-2 によって回復する現象 (23) に極めて似ていることから, 経口免疫寛容状態下における T 細胞アナジーの誘導が示唆されるが, 経口免疫寛容状態下における T 細胞の不応答化 (unresponsiveness) と Schwartz の提唱したアナジーが同一のメカニズムによるものであるかどうかは現在のところ明らかになってはいない. 3) 抗原特異的 T 細胞の除去に関しては, T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニックマウスを用いた実験により明らかとなった. Chen らは OVA を特異的に認識する TCR の遺伝子を導入したマウスに多量の OVA を経口摂取させることにより, パイエル板において OVA 特異的 T 細胞のアポトーシスが誘導されることを報告した (11).

またこれらのメカニズムに特に大きな影響を持っていると報告されている要素として, 経口摂取する抗原の量に関する研究が注目されている. Friedman と Weiner は少量の抗原の経口投与によっては TGF- β を産生する調節性 T 細胞が誘導されアクティブサプレッションが誘導されるのに対し, 多量の抗原の経口投与によっては抗原特異的 T 細胞の不応答化が誘導されることを明らかにした (12). Chen らは前述の論文でパイエル板における抗原特異的 T 細胞のアポトーシスは多量の抗原を経口摂取した場合にのみ誘導されることを報告している. 現在では経口免疫寛容状態下ではこれらを含めた様々なメカニズムが同時にまた複雑に相互作用をしながら誘導されていると考えられている.

IgA 産生と粘膜ワクチン

経口免疫寛容と同様に経口投与抗原に対して誘導される特徴的な免疫応答として IgA 産生があげられる。IgA は血清中及び腸管などの粘膜上に分泌される抗体で粘膜分泌型は通常二量体を形成しており消化酵素などにより分解を受けにくい性質を持つ (24, 25)。腸管においては微生物などの有害物質の侵入を防ぐとともに、食品成分に対してもアレルギーなどの過剰な免疫応答を誘導する可能性のある抗原性が高い物質の侵入を防ぐ役割を担うと考えられる。また、IgA は補体活性化能を持たないことから過剰な免疫応答の誘導を防ぐために有効である (26, 27)。このように、経口投与された抗原に対しては腸管において IgA の産生が誘導されるが、一方で前述のように全身の免疫系では経口免疫寛容の誘導により経口投与抗原に対する応答は抑制されており、その二面性が興味深い。

先に述べたように TGF- β は経口免疫寛容におけるアクティブサプレッションに関わっているサイトカインであるが、IgA 産生細胞の誘導（クラススイッチ）にも重要な役割を担っていることが報告されており (28, 29)、腸管免疫系における免疫応答の特徴的なサイトカインであると考えられる。IgA 産生には TGF- β 以外に IL-4, IL-5, IL-6 などの Th2 型サイトカインが関与していることも示されている (28, 30) (図 ii, iii)。実際、多くの研究により腸管における IgA 産生の誘導と同時に Th2 応答が誘導されることが報告されている (31-36)。

しかしながら、タンパク質などの経口投与抗原に対する免疫応答は通常の免疫応答と比較すると非常に弱く解析が困難なため、このような研究の多くでコレラトキシン(CT)や大腸菌の易熱性エンドトキシンなどの粘膜アジュバントが用いられている (31-33, 35, 36)。CT はそれ自体が Th2 応答を強く誘導する免疫原であることが報告されており (37, 38)、また経口免疫寛容の誘導を妨げる働きを持っていることも示唆されている (39)。そのため、これらのアジュバントを用いた場合の腸管における免疫応答

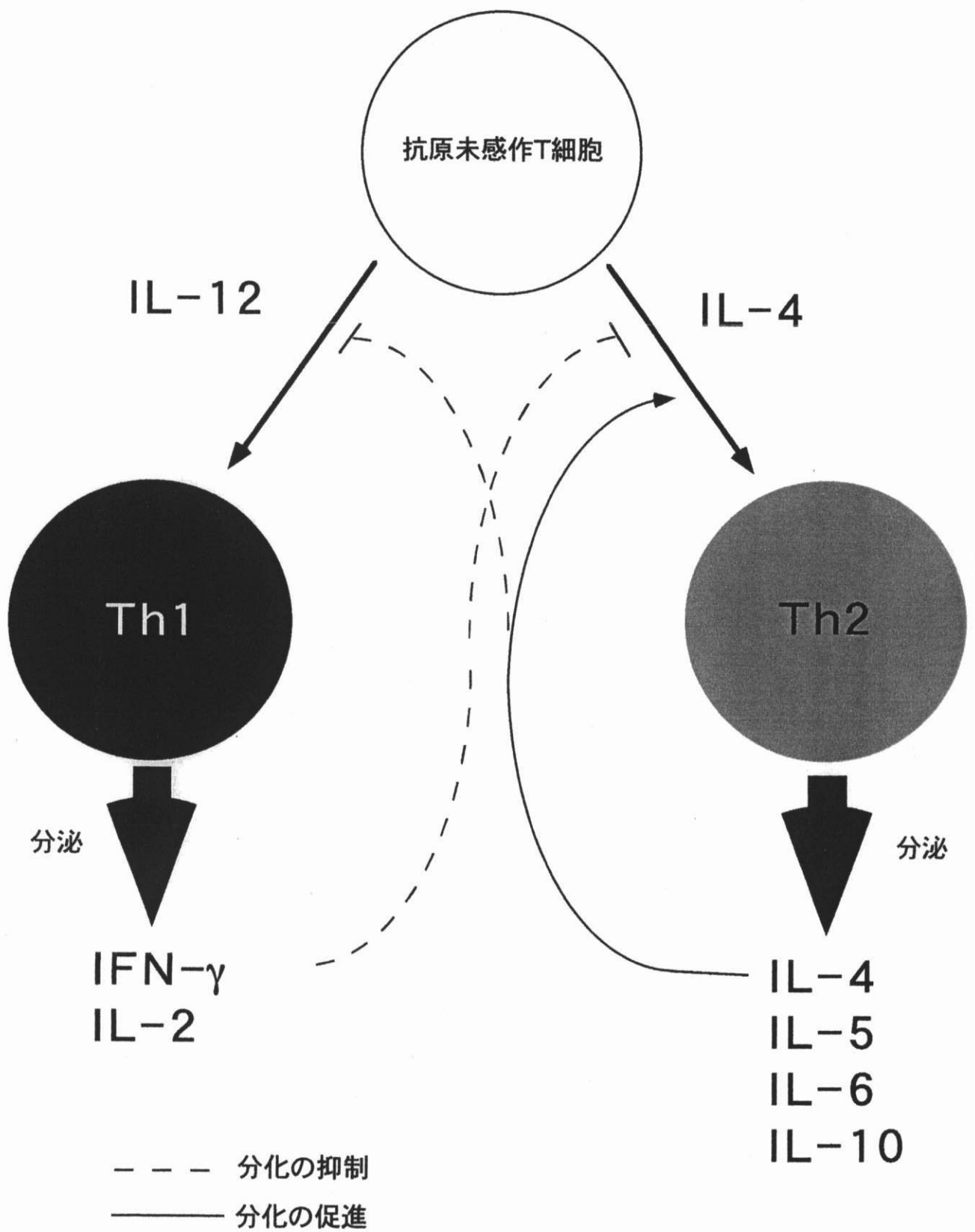


図 ii Th1/Th2 細胞の分化

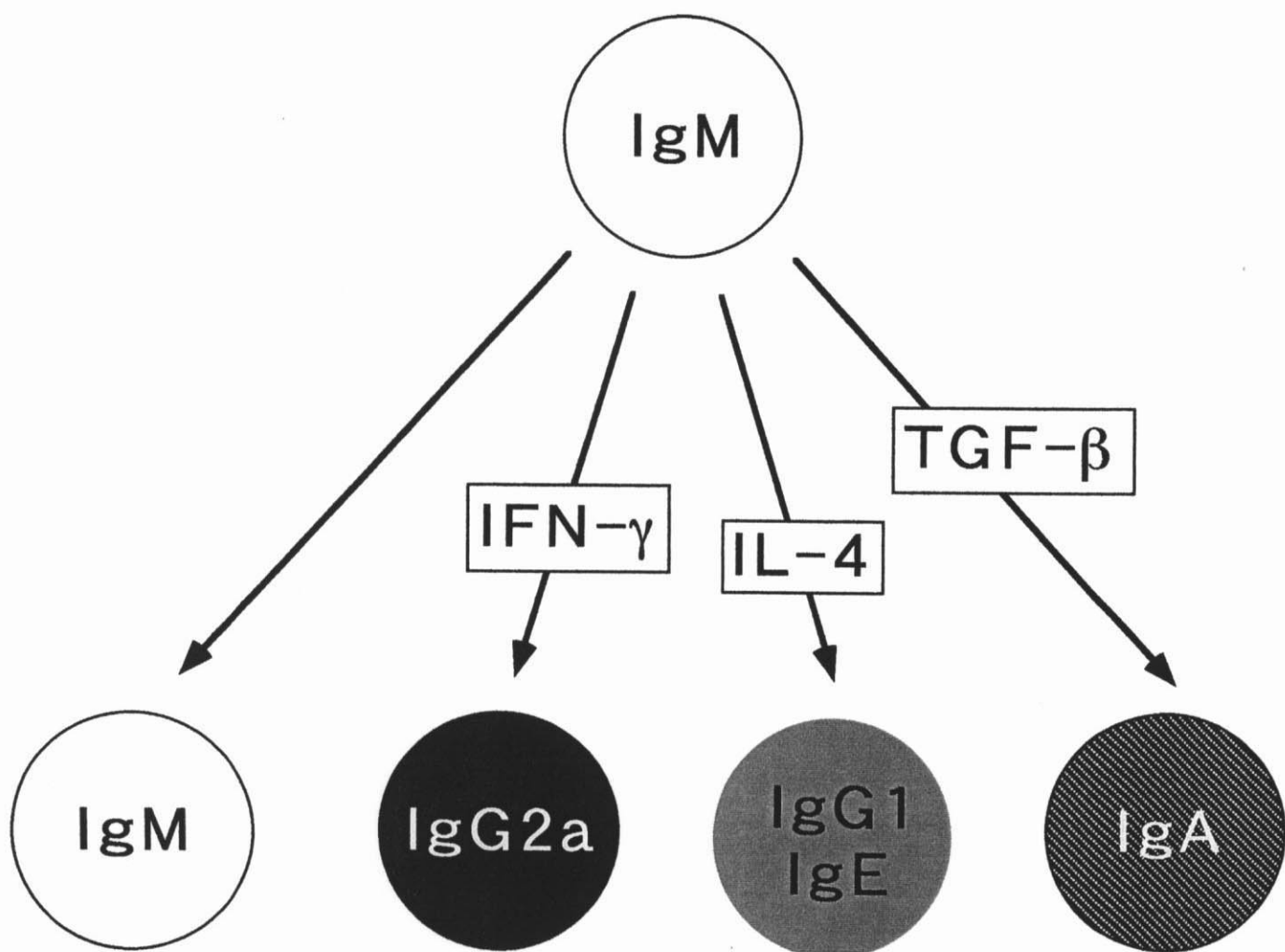


図 iii B 細胞のクラススイッチ

が通常の食品抗原に対するものと同様の機構によるものであるかどうかについては疑問が残されており、今後さらに検討の必要性があると思われる。これに関しては、いくつかのグループによりタンパク質をアジュバントを用いずに経口投与することによって IL-2 や interferon γ (IFN- γ) などの Th1 応答の誘導も報告されている (40, 41)。また、Th1 型のサイトカインである IL-12 が鼻粘膜免疫法による IgA の産生を増強することも明らかにされている (42, 43)。これは腸管における免疫応答でも Th2 型だけではなく Th1 型応答も重要な役割を持つことを示唆する結果であると考えられる。このように腸管においては経口投与抗原に対して IgA 産生を主体とした免疫応答が誘導されるが、その誘導に関わる細胞、サイトカインおよびメカニズムなどは未だ明らかになってはいない。

腸管免疫応答の臨床応用

経口投与抗原に対する免疫応答すなわち経口免疫寛容や腸管における IgA 産生の研究は食品アレルギーの治療や予防のために非常に重要な意味を持っている。さらに、別の臨床医学的な観点からもこれらの免疫応答の解明は大きな期待が寄せられている。例えば、経口免疫寛容現象を利用した自己免疫疾患の治療や粘膜アジュバントを用いた粘膜ワクチンがその代表である。経口免疫寛容は経口投与された抗原に対してのみ特異的に免疫応答が抑制されることから、従来の免疫抑制剤などとは異なり感染防御などの必要な免疫応答は維持した状態で目的とする免疫応答のみを低下させることが可能であると考えられる。リュウマチをはじめとする自己免疫疾患は健常な状態では自己寛容により抑制されているはずの自己抗原に対する免疫応答が何らかの原因により誘起され、自己の細胞や組織に傷害を与えることにより発症する疾患である。近年の研究により一部の糖尿病や多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなど多くの疾患が自己免疫に由来することが明らかとなってきた。これらのほと

んどが難治性の疾患であり，経口免疫寛容の治療法としての確立が期待されている．現在までにこれらの疾患の動物モデルにおいて症状の軽減や治癒が報告されており (44-48)，ヒトへの臨床治験も行われている (49-51)．同様に過剰な免疫応答の制御によって治療が可能となる疾患として，種々のアレルギーや移植片の拒絶などが考えられる．しかし一方で，経口免疫寛容誘導の際に行われる抗原の経口投与は，寛容を誘導すると同時にその抗原に対する免疫応答を促進する可能性を併せ持っている．このような応答が誘導されると疾患の悪化を引き起こす危険性があるため，誘導は極力避けることが望まれる．すなわち，いかに安全に，また効率的に強い寛容を誘導するかが経口免疫寛容の臨床応用において最も重要な問題となる．

この問題の解決のために，これまでもいくつかの研究が行われている．ある抗原に対する免疫応答，特に T 細胞応答は抗原分子全体を認識しているのではなく，分子内のある一部分 (T 細胞抗原決定基 ; T cell determinant) を認識して応答している．また，全ての T 細胞抗原決定基に対して同様に応答するのではなく特定の部位に対して強く応答することが明らかになっている (優勢な T 細胞抗原決定基 ; dominant T cell determinant) (52)．すなわち優勢な T 細胞抗原決定基に対する応答を抑制することによって抗原分子全体に対する免疫応答をも大きく低下させることが可能であると考えられる．T 細胞抗原決定基は B 細胞による抗原認識部位と必ずしも一致するとは限らないため，I 型アレルギーやリウマチなど疾患の発症に B 細胞の応答が関与している場合には T 細胞抗原決定基を経口投与することによって疾患を悪化させる危険性を伴わずに T 細胞に対して経口免疫寛容を誘導できる可能性を示唆している．タンパク質抗原の場合は一部のアミノ酸残基だけをもつペプチドとして T 細胞抗原決定基を取り扱うことが出来る．実際，マウスに優勢な T 細胞抗原決定基を含むペプチドを経口投与することにより，タンパク質分

子全体に対する免疫応答を低下させることが可能であることが明らかにされている (14, 53). この結果は臨床応用へ向けて安全に経口免疫寛容を誘導するための手段として大いに期待されるものである. 一方で, T 細胞抗原決定基は同じタンパク質抗原においても個人 (実際には主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の型) によってその部位が異なっているため患者ごとに情報が必要となり治療に必要な情報の解析に多大な労力を要することが今後の課題となる. しかしながら, 遺伝子診断などの導入により, このようなオーダーメイド医療が主流となる日が来ることも十分期待できる.

経口免疫寛容を効率的に誘導する方法として, CT の B サブユニット (CTB)との複合体化が知られている (54, 55). 前述のように CT は強力な粘膜アジュバントである一方で, その B サブユニットと複合体化されたタンパク質抗原は少量の抗原量を経口投与することによって強い経口免疫寛容を誘導することが報告されている. この方法を用いることにより疾患治療時に多量の抗原にさらされる危険性が回避できる. さらに, 動物実験においては既に感作されたモデルにおいても効果的な経口免疫寛容が誘導可能なことが示されており予防だけでなく治療効果も期待される (56). しかしながら, 複合体による寛容誘導のメカニズムは明らかになっておらず, 複合体の調製方法や複合体化する抗原の種類などによってその効果が異なることも報告されており今後更なる検討が必要である (56). また, アクティブサプレッションは少量の抗原によって誘導できることから臨床応用に向けて期待されているものの, 安定した誘導方法が確立されておらず詳細な誘導機構の解明が重大な課題となっている. このように経口免疫寛容の安全かつ効率的な誘導には多くの免疫疾患の治療や予防に向けて大きな期待が寄せられている.

さらに, 経口免疫寛容と並んで腸管におけるもう一つの特徴的な免疫応答である IgA 産生に関しても粘膜ワクチンとして臨床応用へ向けて多

くの研究が行われている。現在ではウィルスや細菌など様々な感染症に対する予防手段としてワクチンの接種が広く行われており、体内に侵入したこれらの病原体に対して有効な効果を発揮している。これらの病原体は通常、鼻、のど、消化管などの粘膜部分からの侵入が主要な感染経路であり粘膜組織における IgA 産生の誘導は病原体の体内への侵入を未然に防ぐことの出来るさらに効果的な感染防御手段となることが期待される。また、注射によるワクチンの投与は医療機関でしか行えないため多くの人手が必要となるほか、多くの場合乳幼児が対象となるため精神的苦痛も大きな問題となる。粘膜ワクチンは経口的または経鼻的にワクチンを投与するため家庭でも手軽に行えるほか、接種時の苦痛も軽減化される。これらのことより、粘膜ワクチンの開発に向けて精力的に研究が進められている。さらに粘膜ワクチンによって粘膜部位のみでなく従来のワクチンと同様に全身免疫系における免疫応答も誘起することが可能であることも報告されており (57, 58)、体の表面と内部に二重の防御機構を成立させることができると期待される。

しかしながら、前述の通り経口投与された抗原に対する免疫応答は他の免疫応答と比較して非常に弱く、さらに全身の免疫系における経口免疫寛容も誘導されるため有効なワクチンとはなりにくい。そこで、粘膜ワクチンの開発において最も重要な課題となるのが粘膜アジュバントの研究である。CT や易熱性エンドトキシンなどは実験的には有効な粘膜アジュバントであるが、その毒性から直接の臨床応用は不可能である。近年、山本らの研究により CT のアミノ酸配列に変異を導入することにより毒性を著しく減弱させる一方で、アジュバント活性は維持させることが可能であることが報告された (59)。さらにこのミュータント CT は全身免疫系においても強い免疫応答を誘起することが可能であった。これにより粘膜ワクチンが臨床的に実際に有用なものとなりうることが示唆された。より安全な粘膜アジュバントの開発のために今後は CT のア

ジュバント活性発現機構の解析が行われていく必要がある。また、多様なワクチンの用途に合わせて CT のように Th2 応答を誘導する粘膜アジュバントのみでなく Th1 応答を誘導する粘膜アジュバントの開発も求められている。

抗原提示について

現在のところ、腸管免疫応答の誘導のメカニズムはほとんど明らかとなっていない。これらの免疫応答は投与された抗原に対して特異的に誘導され、他の免疫応答は影響を受けないことが大きな特徴である。そのため、その誘導には抗原提示細胞による抗原提示が重要な役割を持つと考えられる。抗原特異的な免疫応答は T 細胞および B 細胞によって担われる。また、通常 B 細胞が抗体を産生するためには T 細胞の活性化が必要となる。そのため、ほとんどの抗原特異的な免疫応答は抗原による T 細胞の活性化により開始される。T 細胞は細胞表面に発現する TCR によって抗原を認識するが、TCR は直接抗原と結合することは出来ない。TCR は抗原提示細胞の表面に発現する MHC 分子上に提示された抗原のみを認識する (図 iv)。代表的な抗原提示細胞としては、マクロファージや樹状細胞(DC)、B 細胞などが挙げられるが、それ以外にも MHC 分子を発現する多くの細胞による抗原提示が報告されている (60-62)。

タンパク質抗原の場合、抗原提示細胞はエンドサイトーシスなどにより抗原を取り込み、細胞内においてプロテアーゼにより切断しペプチド断片を生成する。それとは別に細胞内で MHC クラス II 分子が合成されインバリアント鎖と呼ばれる分子と結合した状態で小胞体膜に存在する。MHC 分子および抗原ペプチドは後にエンドソームに移動し、インバリアント鎖と置き換わる形で MHC 分子に抗原ペプチドが結合する。このようにして生成した抗原ペプチドと MHC 分子の複合体は細胞表面に輸送され T 細胞に対して提示される。これを認識した T 細胞は活性化さ

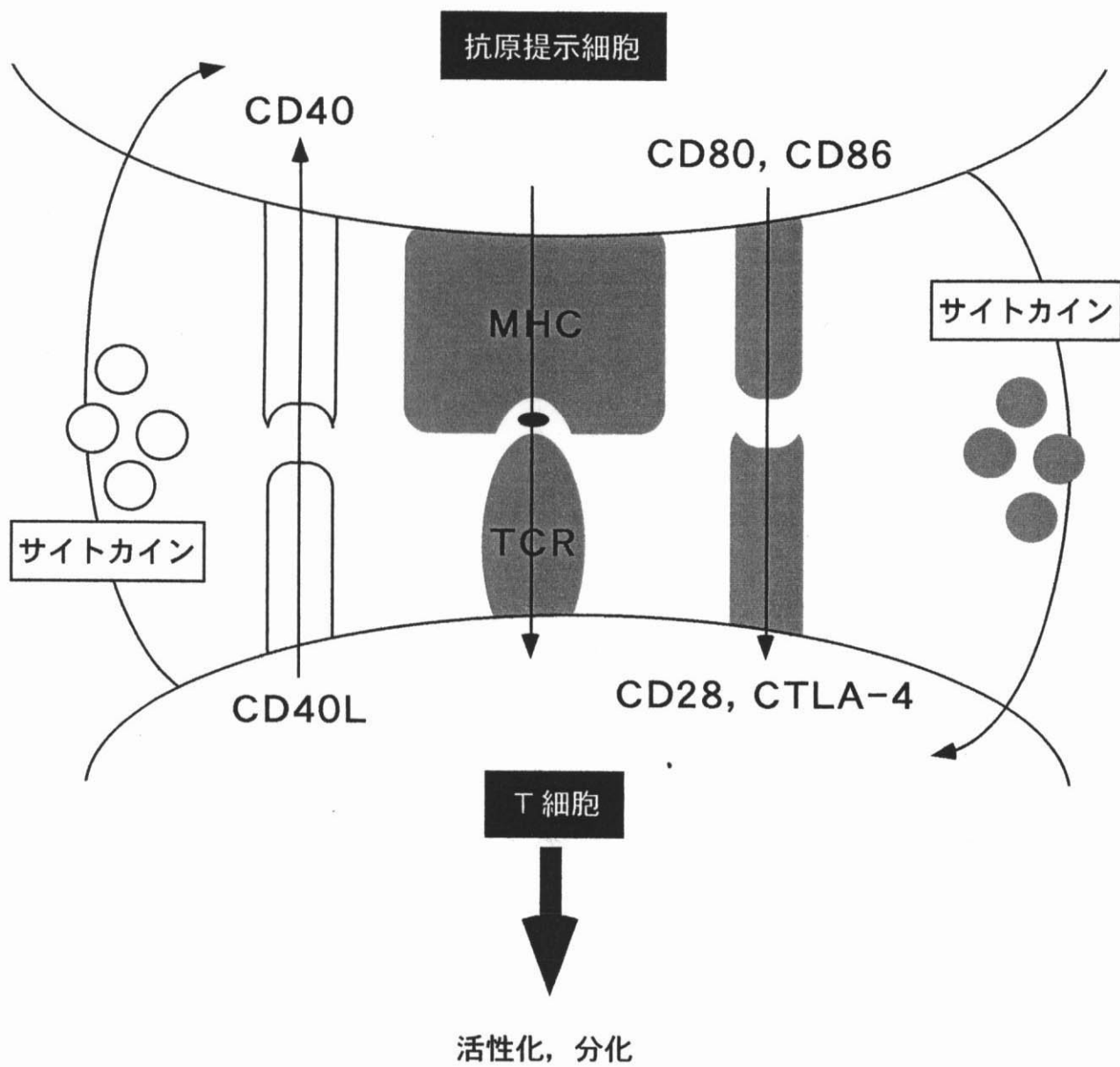


図 iv 抗原提示

れる。すなわち、抗原提示細胞による T 細胞への抗原提示がその後の抗原特異的な様々な免疫応答の開始点となる。

さらに、この抗原提示の際の条件により T 細胞がその抗原に対してどのような応答をするかがある程度決定されることが明らかになっている。先に挙げた種々の抗原提示細胞は細胞種により、または同じ細胞でも活性化状態などによりそれぞれ異なった抗原提示能を持ち、T 細胞応答さらにはその抗原に対する総合的な免疫応答を決定する上で重要な役割を持つと考えられている (63, 64)。

腸管免疫応答の誘導機構

腸管免疫系における特徴的な免疫応答の誘導においても抗原提示細胞の機能が大きく関与することが示唆されている。Everson らはマウスを用いた実験によりパイエル板に存在する DC による抗原提示は Th2 型サイトカイン産生を誘導することを報告した (65, 66)。Iwasaki と Kelsall によっても同様な報告がなされている (67)。また、Harper らは粘膜固有層の抗原提示細胞により TGF- β 産生が誘導されることを報告している (68)。Th2 型サイトカインや TGF- β は経口免疫寛容や IgA の誘導において重要な役割を果たしており、これらの結果は腸管免疫における抗原提示の重要性を示唆している。一方で、Th2 型サイトカインである IL-4 は食品アレルギーの主要なメカニズムである I 型アレルギー反応を引き起こす IgE を誘導するため (69)、誘導のみでなく産生を制御する機構が生体の恒常性の維持において大きな意味を持つと考えられる。また、実際には腸管における Th1 の誘導も報告されており (40, 41)、これらの抗原提示細胞が常に Th2 を誘導するののかも疑問である。

古くから抗原濃度が免疫応答の誘導に多大な影響を与えることが報告されてきたが (12, 70-73)、最近このような抗原濃度による異なった免疫応答の誘導に抗原提示細胞の機能が関与していることが示された (74, 75)。

この報告は、腸管免疫応答を誘導する抗原提示細胞の機能にも抗原濃度が影響を与える可能性を示唆しており、非常に興味深い。しかしながら、そのメカニズムについてはほとんど検討されていない。

このように特徴的な腸管免疫応答の誘導に抗原提示細胞が関与することが徐々に明らかにされているが、その誘導部位に関しては今後検討の必要が残されている。経口抗原は他の抗原と異なりその摂取量が極度に多量であるため、直接接触する腸管のみでなく生体内に取り込まれた後に多くの器官において影響を及ぼす可能性が考えられる。実際、全身性の抗体産生応答や免疫寛容などが誘導されることは先述の通りである。腸内抗原の取り込みに関しては Owen らによってパイエル板に存在する特殊化した上皮細胞である M 細胞によるパイエル板内への抗原の取り込みが報告されており (76, 77), パイエル板の免疫応答誘導部位としての役割が注目されている。

一方で、経口免疫寛容や経口投与抗原に対する Th1 応答の誘導機構などこれまで報告されているパイエル板における抗原提示の特性だけでは説明できない現象も多く、その他の器官の関与も示唆される。特に免疫寛容の誘導に関しては近年 T 細胞表面分子である cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA-4) の関与が報告され研究が進められている (78-82)。CTLA-4 は活性化 T 細胞上に発現する補助刺激分子で、抗原提示細胞上に発現するリガンドと結合し T 細胞にシグナルを伝達する (83)。この報告により、寛容誘導においても抗原提示細胞が重要な役割を担うことが強く示唆された。しかしながら、誘導部位、関与する抗原提示細胞など詳細なメカニズムについては多くのグループにより研究が進められているものの、未だ明らかになってはいない。

腸管における免疫応答誘導機構の解析は食品アレルギーを予防するだけでなく、効率的な経口免疫寛容誘導法や安全な粘膜アジュバントの開発など現代医療において大きな意義を持つ。現在、経口抗原に対する免

疫応答の誘導部位や誘導に関わる細胞の解明はさらに早急な対応が望まれている。

本研究においてはタンパク質抗原を経口投与することによって誘導される免疫応答を個体、細胞さらには分子レベルで解析し、これまで知られていない細胞の関与を明らかにした。特に、経口投与抗原に対する免疫応答に大きな影響を与えると報告されている抗原量に着目し、抗原量によって免疫応答が制御される機構を解析した。また、抗原特異的な免疫応答の強度や質を決定する上で極めて重要な役割を担っていると考えられる抗原提示細胞の機能との関わりを、抗原提示機能の評価に有用な抗原特異的未感作 T 細胞を多量に調製することが可能である TCR トランスジェニックマウスを用いて詳細に検討した。

第一章では、牛乳タンパク質であり主要なアレルゲンである α s1-カゼインを様々な投与量でマウスに経口投与することによって誘導される免疫応答と免疫寛容の関係を詳細に解析するとともに、安全で効率的な経口免疫寛容の誘導法を検討した (84)。第二章では、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスより調製した抗原未感作 T 細胞を用いパイエル板に存在する抗原提示細胞と脾臓に存在する抗原提示細胞の抗原提示能を比較し、パイエル板の抗原提示細胞の従来の報告とは異なった抗原提示能を明らかにした (85)。さらに第三章では、様々な濃度の抗原の存在下におけるパイエル板および脾臓の抗原提示細胞の抗原提示能の変化とそれに関わる分子を解析した (85, 86)。本研究によって経口投与抗原に対する免疫応答の制御・誘導機構について新たな知見がもたらされた。

本研究の成果が食品アレルギーの発症機構の解明のみでなく、経口免疫寛容や粘膜ワクチンなどの次世代の医療技術の発展においても重要な位置を占めることを期待している (図 v)。

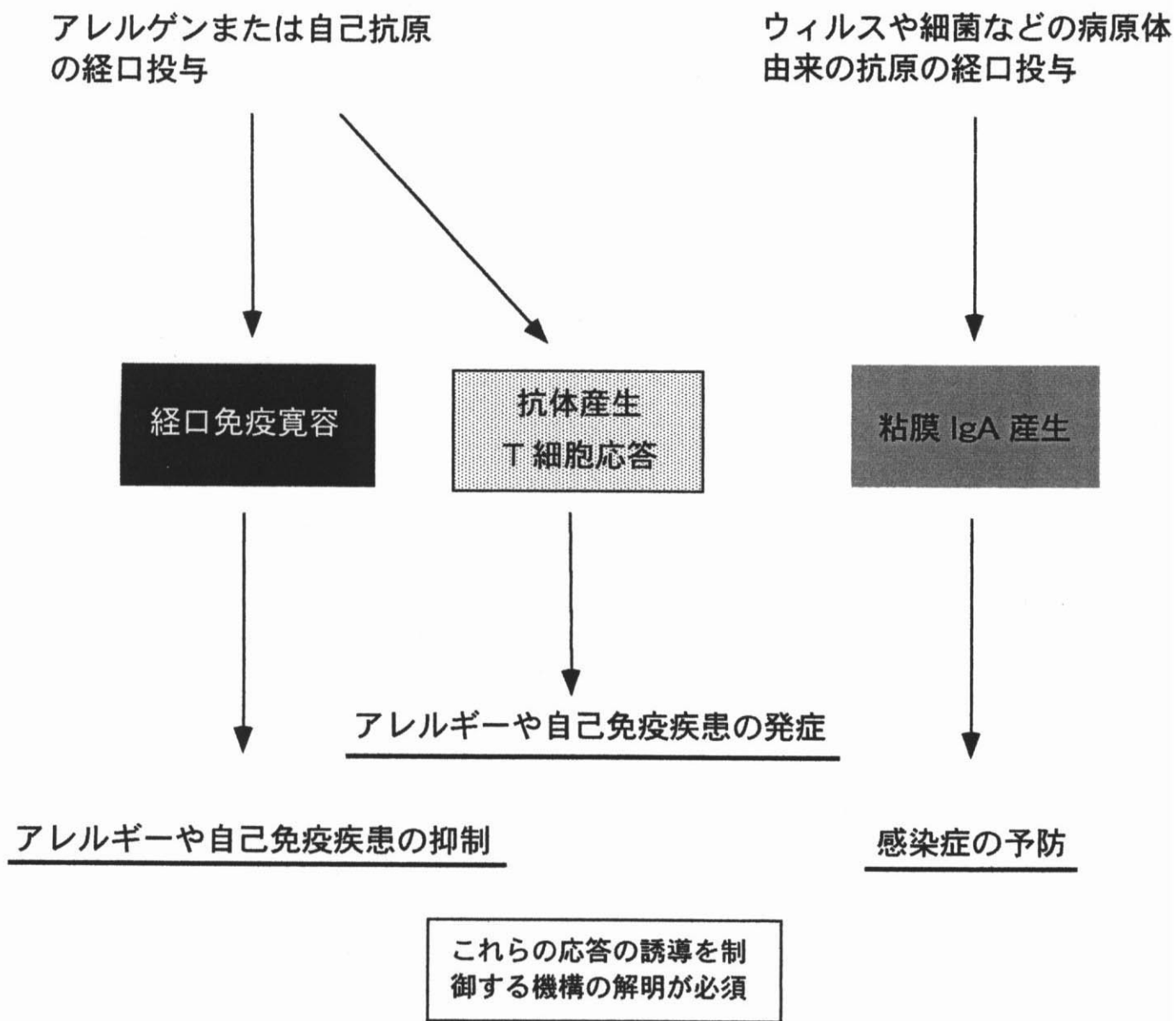


図 v 腸管免疫応答の制御と臨床応用

第一章

抗原の少量経口投与は T 細胞の活性化後に免疫寛容を誘導するのに対し,
多量経口投与は活性化を誘導せずに免疫寛容を誘導する

序

経口免疫寛容は外来性の抗原を腸管を通じて末梢免疫系に投与することにより誘導される抗原特異的な免疫寛容である (1-3). 1911 年に Wells らによって報告されて以来, 胸腺外において誘導される抗原特異的免疫寛容現象として注目を集めてきた (87).

その誘導機構に関しては, これまでにいくつかの説に基づいて数多くの報告がなされており, 主に T 細胞が寛容誘導に重要であることが知られている (2, 11-13, 16). 1993 年に Friedman と Weiner は抗原の投与量により経口免疫寛容の誘導メカニズムは決定され, 少量ではアクティブサプレッション, 大量の抗原によってはクローナルアナジーが誘導されると報告した (12). また 1995 年には Chen らにより, OVA 特異的 TCR を持つトランスジェニックマウスに OVA を大量に経口投与することによりパイエル板における OVA 特異的 T 細胞が減少することが報告されており, 報告例は少ないものの, 経口免疫寛容における T 細胞の除去(クローナルデリーション)が誘導されることも示されている (11). しかしどの様な要因により, これらの様々なメカニズムが誘導されるかについてはほとんど明らかになっていない.

また, 経口投与された抗原に対しては全身免疫系の経口免疫寛容が誘導される一方で, これと同時に腸管における IgA 産生などの局所免疫応答が誘起されることが知られており (7), その二面性が大きな特徴となっている. 近年, このような免疫応答が腸管などの局所に留まらず全身免疫系においても報告され (40), その重要性が再確認されてきた. 現在のところ経口投与された抗原に対して誘導される免疫寛容と免疫応答の誘導機構を統一的に説明するような報告はされておらず, どのようにして免疫寛容と免疫応答の誘導が制御されているのかは全く明らかになっていない.

本研究においては、 α s1-カゼインを投与量を変えてマウスに経口投与し、経口免疫寛容の誘導および免疫応答の活性化に与える影響を詳細に検討した。様々な投与量の抗原によって誘導される免疫寛容や免疫応答を明らかにすることによって、免疫寛容と免疫応答の制御機構の解明に寄与することが出来ると期待される。さらに、抗原の投与量の調節による腸管免疫応答の制御方法の確立は様々なアレルギー疾患や自己免疫疾患の予防や治療および有効な経口ワクチンの開発という面でも大きな意味を持つと考える。

材料と方法

マウス

C3H/HeN メス 6-8 週令は日本クレア（東京）より購入した。

抗原

ウシ α s1-カゼインは Zittle らの方法 (88) により牛乳より調製し、さらに DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィー (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) により精製した。約 8%の α s1-カゼインを含む全カゼイン含有飼料は船橋農場により調製されたものを用いた。

モノクローナル抗体の精製

抗マウス IFN- γ 抗体, XMG1.2 (89) はマウス腹水より Protein G カラム (Pharmacia AB) を用いて精製したのち, NHS-LC-Biotin (ImmunoPure, Pierce, Rockford, IL) によりビオチン化した。R4-6A2 (90) はマウス腹水を硫酸アンモニウムにより濃縮した。抗マウス IL-10 抗体, SXC-1 (91) はマウス腹水より Mono Q カラム (Pharmacia AB) を用いて精製し, XMG1.2 と同様にビオチン化した。JES5-2A5 (92) はマウス腹水を硫酸アンモニウムにより濃縮した。抗マウス CD4 抗体 GK1.5 (93), 抗マウス CD8 抗体 53-6-72 (94) はマウス腹水より Protein G カラムを用いて精製した。

抗原の経口投与

抗原の経口投与は α s1-カゼインを生理食塩水にとかし経口ゾンデを用いて 10 μ g, 100 μ g, 1 mg, 10 mg ずつ 2-3 日間隔で計 4 回マウスに経口投与するか、またはカゼイン含有飼料を 2 週間自由摂取させることにより行った。

図 1-7 の実験においては、経口投与は少量ずつ多回数と大量に少回数

に設定した。2-3 日間隔で 200 μg ずつ 5, 10, 15 回投与する少量投与群と 1 mg ずつ 1, 2, 3 回投与する大量投与群に分けた。両群とも最終的な投与量は 1, 2, 3 mg となる。

免疫

αs1 -カゼインを最後に経口投与してから 5 日後にフロイント完全アジュバント(CFA, Difco Laboratories, Detroit, MI) と共に 50 μg の抗原を腹腔内免疫し、さらに 2 週間後にフロイント不完全アジュバント(IFA, Difco) と共に 50 μg の抗原を追加免疫した。リンパ節細胞を用いた実験では細胞摘出の 10 日前に 100 μg の抗原を CFA と共に皮下免疫した。

細胞培養

αs1 -カゼインを最後に経口投与してから 4 日後または追加免疫の 10 日後の脾臓細胞を無菌的に摘出した。赤血球を除去後、100 U/ml のペニシリン（萬有製薬，東京），100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン（明治製菓，東京），4 mM の L-グルタミン（和光純薬工業，大阪）及び 5×10^{-5} M の 2-メルカプトエタノール（東京化成工業，東京）を含む RPMI 1640（ニッスイ，東京）培地に懸濁した。これらの細胞は抗原と共に 8×10^5 cells/well の細胞濃度で 96 ウェルプレート（Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ）で 4 日間培養し最後の 24 時間における [^3H]-チミジンの取り込みを指標として増殖アッセイを行った。サイトカイン産生を測定する際には細胞濃度を 1×10^7 cells/ml にし 96-または 48-ウェルプレート（Costar Corporation, Cambridge, MA）で培養した。培養の際は全て 5% のウシ胎児血清（FCS，三光純薬，東京または Gibco BRL, Gaithersburg, MD）が培地中に含まれている。

抗体補体処理による T 細胞の除去

赤血球を除去した脾臓細胞を 1×10^7 cells/ml の濃度で、前述の RPMI に 0.3% ウシ血清アルブミン (BSA), 25 mM HEPES (和光純薬工業) を加えた培地 (細胞傷害用培地) に懸濁した. 抗 T 細胞抗血清 (anti-mouse T cell serum, Cedarlane, Ontario) を加え 4℃ で 1 時間処理後遠心し再び細胞傷害用培地に 1×10^7 cells/ml で懸濁し補体 (low-tox-M rabbit complement, Cedarlane) を加え 37℃ で 1 時間処理した. 遠心して RPMI 培地に懸濁し T 細胞除去細胞懸濁液とした.

ブロッキング実験

培養中に抗マウス CD4 モノクローナル抗体 (GK1.5) または抗マウス CD8 モノクローナル抗体 (53-6-72) を添加した.

サイトカインの測定

細胞培養上清中のサイトカインの測定はサンドイッチ酵素免疫測定法 (ELISA 法) により行った. 培養上清は結果中に特に指示されていない場合は, IL-2 の測定には培養開始 14 時間後, そのほかは 72 時間後のものを用いた. TGF- β の測定には TGF- β ELISA キット (Genzyme, Cambridge, MA) を用いた. IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ の測定はそれぞれプレート (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) をラット抗マウス IL-2 抗体 (JES6-1A12, Pharmingen, San Diego, CA), ラット抗マウス IL-4 抗体 (BVD4-1D11, Pharmingen), ラット抗マウス IL-10 抗体 (JES5-2A5), ラット抗マウス IFN- γ 抗体 (R4-6A2) でコーティングした. 0.05% tween 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS/tween) で洗浄後 3% BSA-PBS/tween でブロッキングし, サンプルを加えた. 洗浄後ビオチン化ラット抗マウス IL-2 抗体 (JES6-5H4, Pharmingen), ラット抗マウス IL-4 抗体 (BVD6-24G2, Pharmingen), ラット抗マウス IL-10 抗体 (SXC-1), ラット抗マウス IFN- γ 抗体 (XMG1.2) を加えた. 洗浄後アビジン化アルカリフォスファター

ゼ (Zymed, San Francisco, CA) を加え, さらに洗浄後基質溶液 (p-nitrophenyl-phosphate, 東京化成工業) を加えた. 405nm で吸光度を測定した.

血中抗体量の測定

追加免疫の 7 日後にマウス尾の動脈より採血をした. 血清中の抗 α s1-カゼイン抗体量を ELISA 法により測定した. プレートを 0.01% α s1-カゼイン/PBS でコーティングした. サイトカインと同様に洗浄及びブロッキング後サンプルを加えた. 洗浄後アルカリフォスファターゼ化ヤギ抗マウス IgG+M+A (Cappel, Organon Teknika, West Chester, PA), ウサギ抗マウス IgG1, ウサギ抗マウス IgG2a, ウサギ抗マウス IgG2b 抗体 (Zymed) を加え, さらに洗浄後基質溶液を加えた. 405nm で吸光度を測定した.

脾臓細胞による T 細胞の増殖抑制試験

先述のように α s1-カゼインを経口投与したマウスより脾臓細胞を調製し, α s1-カゼインで免疫後 10 日目のマウスのリンパ節細胞と共に抗原の存在下で培養した. 96-ウェルプレートをを用い, リンパ節細胞は 4×10^5 cells/well の細胞濃度で, 脾臓細胞は 1, 2, 4×10^5 cells/well で培養した. 前述の増殖試験と同様に増殖を測定した.

有意差の評価

有意差の検定は, Mann-Whitney 法により行った.

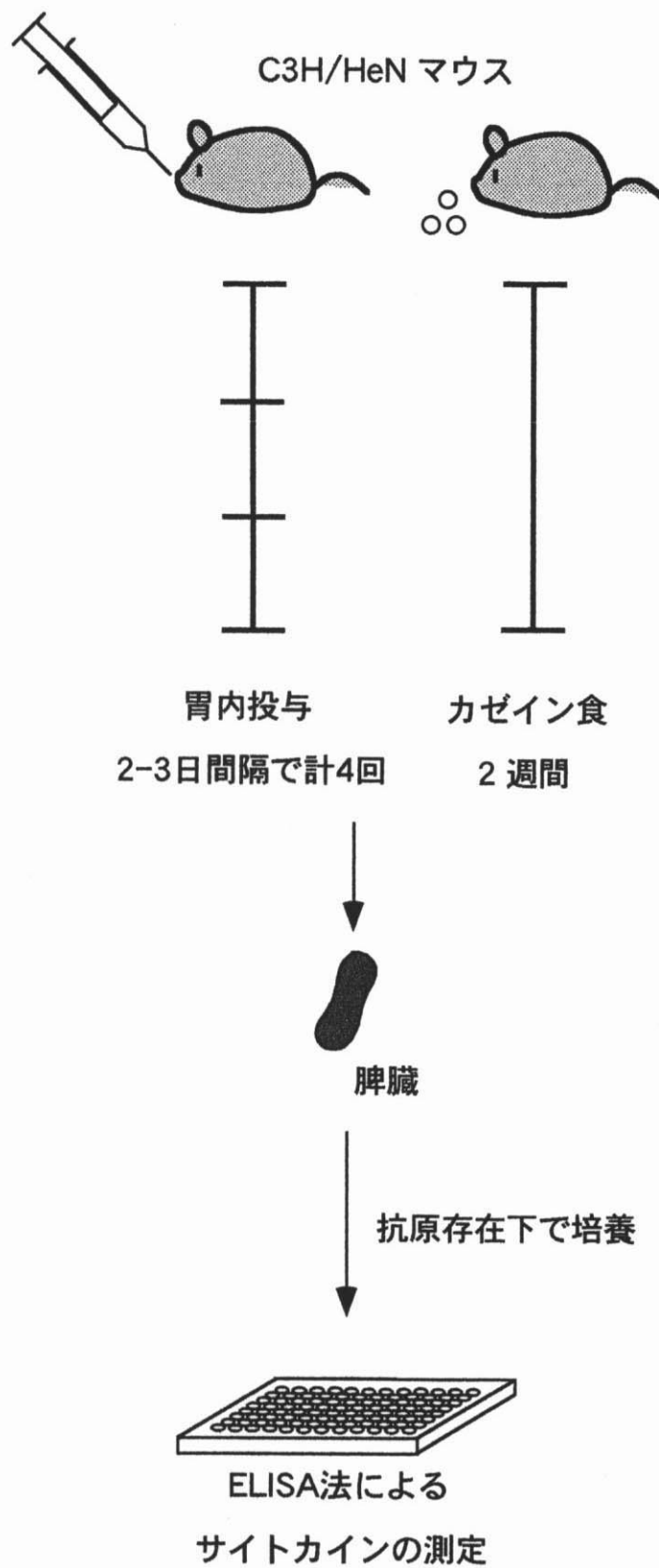


図 1-i 経口投与された抗原に対する免疫応答の評価方法

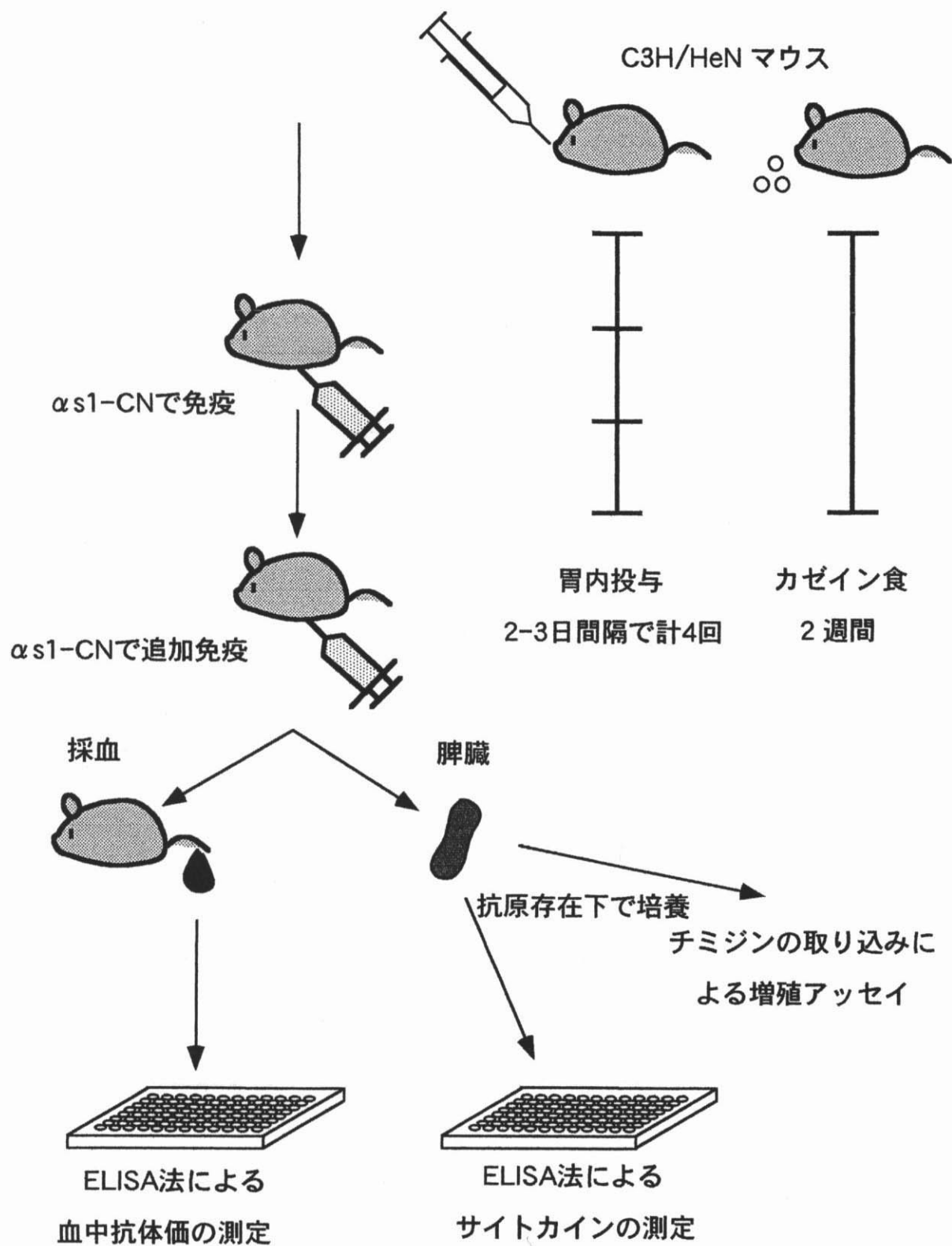


図 1-ii 経口免疫寛容の誘導とその評価方法

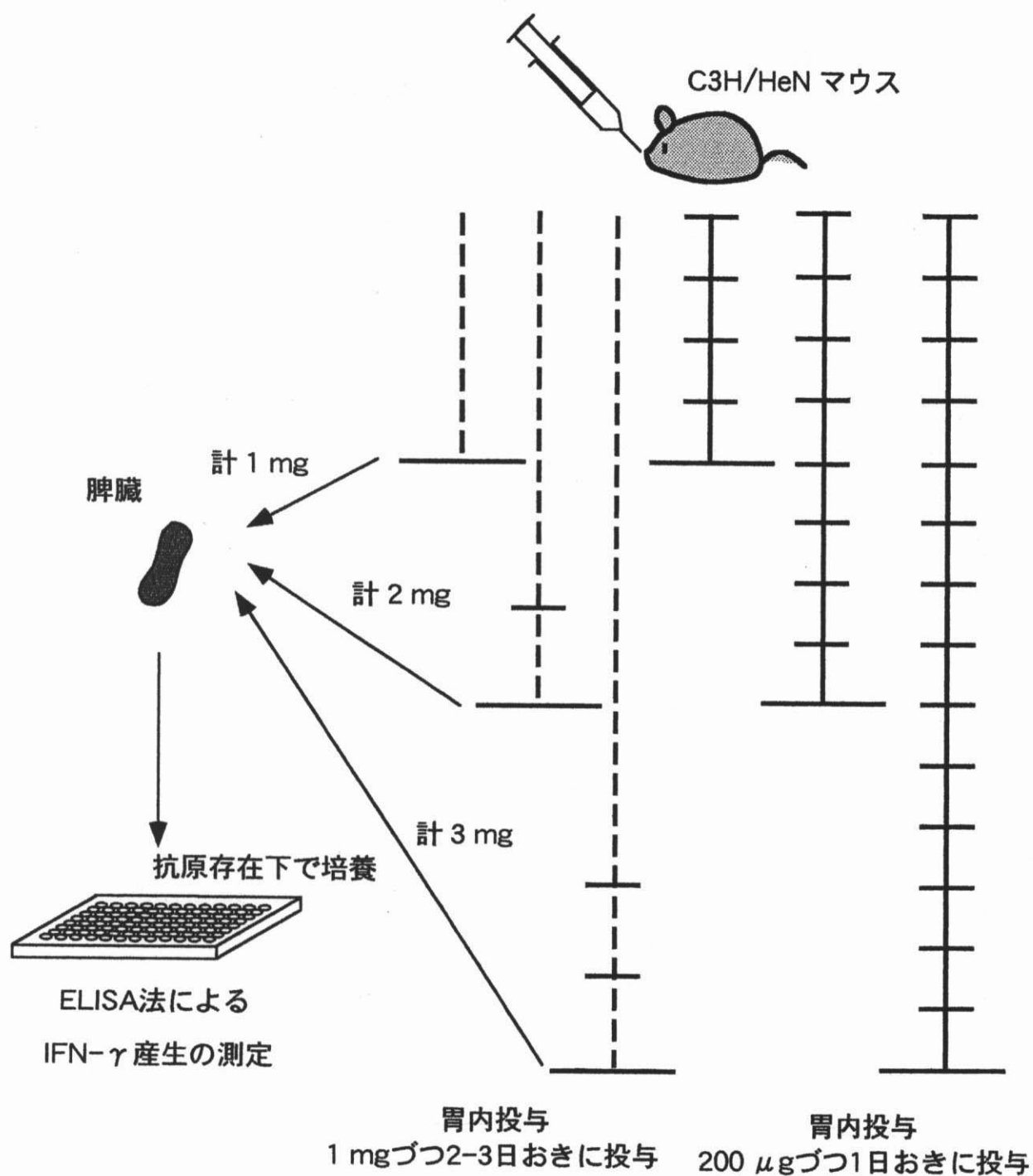


図 1-iii 抗原の投与方法が免疫系の活性化に与える影響の評価方法

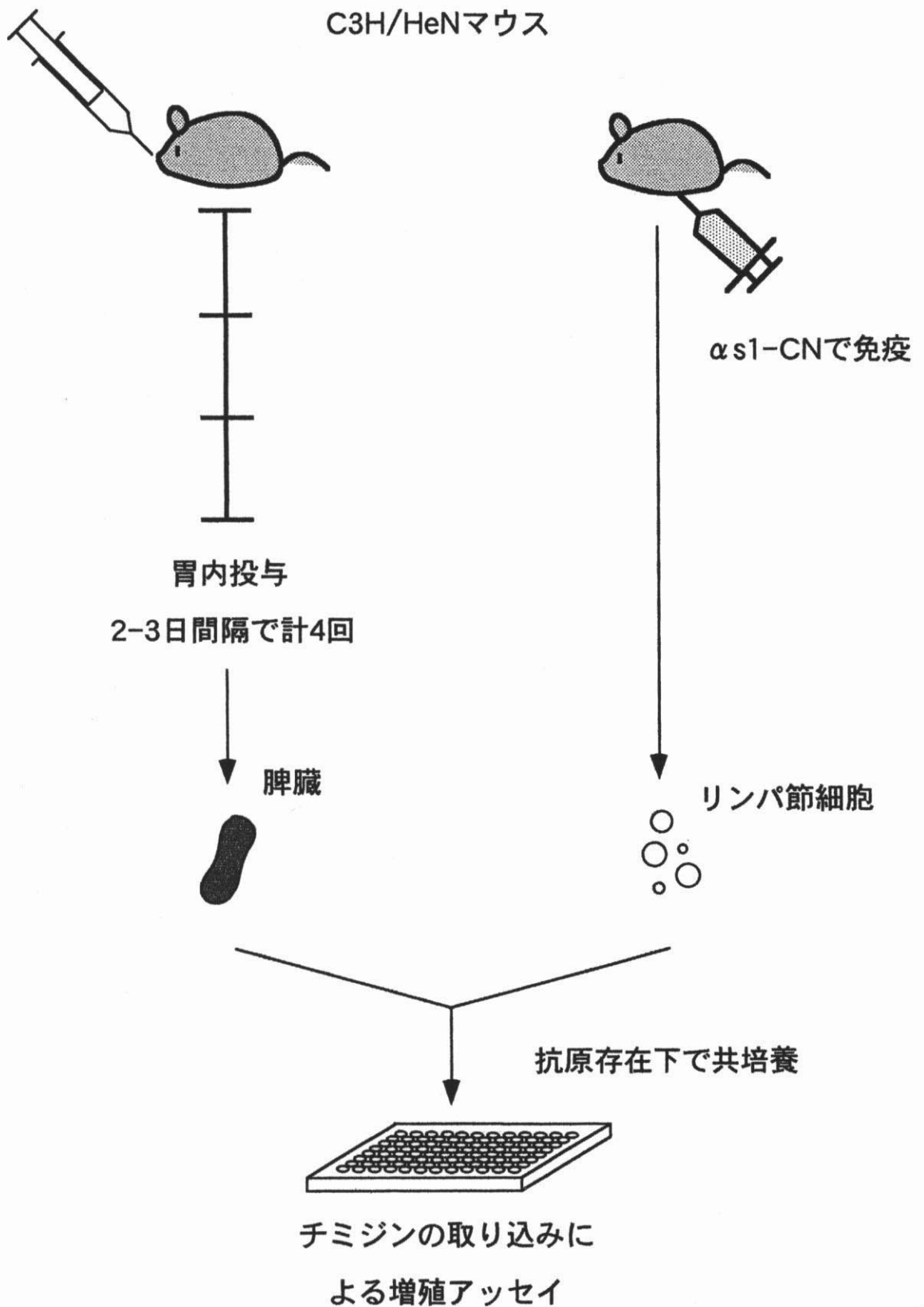


図 1-iv アクティブサプレッションの評価方法

結果

α s1-カゼインの経口投与量を変えることにより異なったサイトカイン応答が誘導された

経口投与された抗原量が誘導する免疫応答に与える影響を調べるため、様々な量の抗原を経口投与したマウスから得られた脾臓細胞を抗原の存在下で培養し、培養上清中のサイトカイン量を測定した。その結果、1 回に 10 μ g, 100 μ g といった比較的少量の α s1-カゼインを経口投与したマウスの脾臓細胞による IFN- γ 産生が *in vitro* での抗原刺激により顕著に増加することが観察された (図 1-1A)。この IFN- γ 産生は 1 mg 以上の比較的大量の抗原を投与したマウスにおいては抗原の経口投与量が増加するにつれて減少した。IL-2 産生においても同様の結果が得られた (図 1-1B)。 *in vitro* での抗原刺激に対する IL-10 産生は検出されたが経口投与された抗原量に対する依存性は確認されなかった (表 1-1)。TGF- β 産生は抗原の経口投与量に依存して産生が減少し、さらに *in vitro* での抗原刺激により若干の抑制が見られた (表 1-1)。また IL-4 はどの群においてもほとんど産生は見られなかった (表 1-1)。この際、IL-2 は培養 20 時間以内で強い産生が検出され、そのほかのサイトカインは培養 72 時間までは増加することを確認している (データ省略)。

少量の α s1-カゼインを経口投与することにより Th1 型の CD4⁺T 細胞によるサイトカイン産生が誘導された

少量の α s1-カゼインを経口投与することにより脾臓細胞に誘導された IFN- γ 産生をマウスの個体数を増やして詳細に解析した。1 回の投与量が 100 μ g のマウスにおける IFN- γ 産生は個体差はあるもののコントロール群と比べ有意な産生が認められた ($p < 0.01$, 図 1-2)。また、*in vitro* 刺激における抗原濃度に依存し (図 1-3)、刺激後 96 時間までは培養上

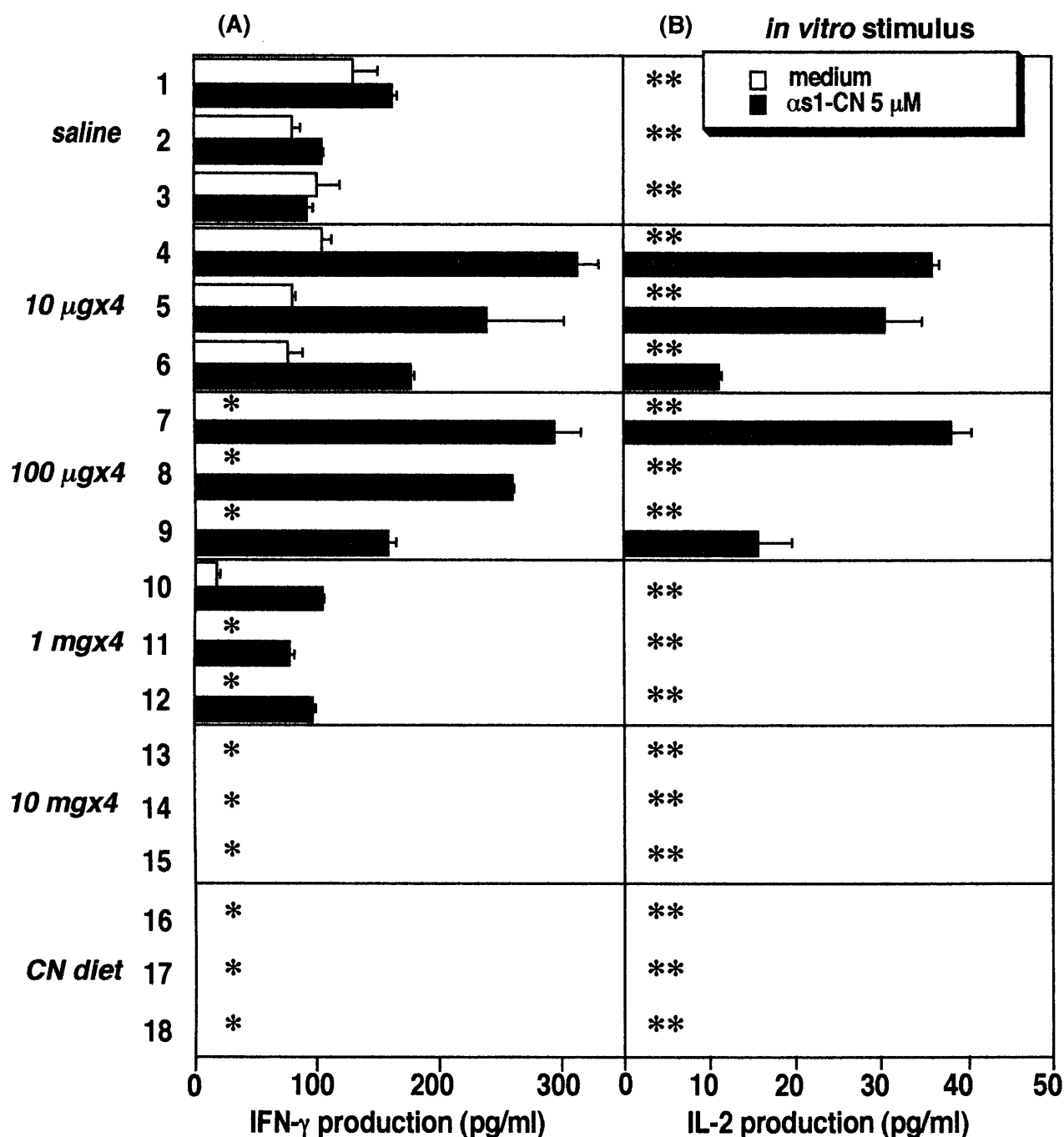


図 1-1 抗原の経口投与量と誘導されるTh1型サイトカイン応答

αs1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 μg-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか、またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた。これらのマウスより脾臓細胞を摘出し、抗原の存在下/非存在下で培養した。3 日後培養上清中の IFN-γ (A) および IL-2 (B) 産生量を ELISA 法で測定した。* < 15, ** < 7.8

表 1-1 抗原の経口投与量と誘導されるTh2 型サイトカイン応答

Fed	Mouse No.	IL-4 (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		TGF- β (pg/ml)	
		Medium	Ag 5 μ M	Medium	Ag 5 μ M	Medium	Ag 5 μ M
saline	1	<12	<12	<7.5	22.1	105.8	70.9
	2	<12	<12	<7.5	27.0	104.6	68.6
	3	<12	<12	11.5	20.7	92.7	50.2
10 μ gx4	4	<12	12.0	9.5	23.2	93.9	86.2
	5	<12	<12	9.1	24.8	89.0	55.9
	6	<12	12.4	11.7	30.2	82.4	72.2
100 μ gx4	7	<12	<12	<7.5	23.6	70.9	47.6
	8	<12	<12	<7.5	29.5	71.2	<47
	9	<12	<12	<7.5	25.0	68.9	<47
1 mgx4	10	<12	<12	10.7	30.2	59.4	<47
	11	<12	<12	10.1	24.5	<47	<47
	12	<12	<12	<7.5	19.1	<47	<47
10 mgx4	13	<12	<12	10.2	21.4	<47	<47
	14	<12	<12	9.7	25.6	<47	<47
	15	<12	<12	16.8	39.6	<47	<47
CN diet	16	<12	<12	12.8	22.0	<47	<47
	17	<12	<12	11.2	31.9	<47	<47
	18	<12	<12	9.7	24.12	<47	<47

α s1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 μ g-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか、またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた。これらのマウスより脾臓細胞を摘出し、抗原の存在下/非存在下で培養した。3 日後培養上清中の IL-4, IL-10 および TGF- β 産生量を ELISA 法で測定した。

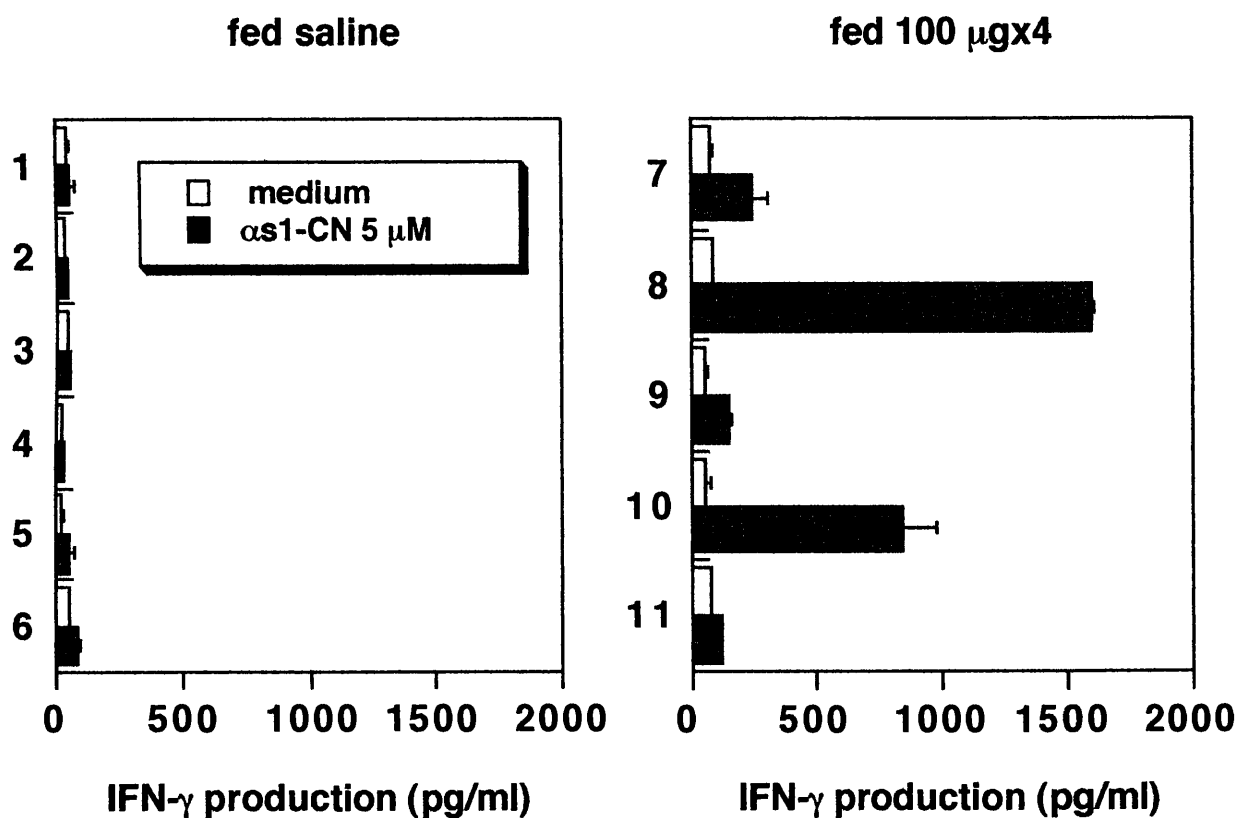


図 1-2 少量の抗原を経口投与したマウスにおける IFN- γ 産生

$\alpha\text{s1-CN}$ を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 100 μg ずつ経口ゾンデを用いて経口投与した。2-3 日間隔で計 4 回投与した後、脾臓細胞を摘出し、抗原の存在下/非存在下で培養した。3 日後培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した。

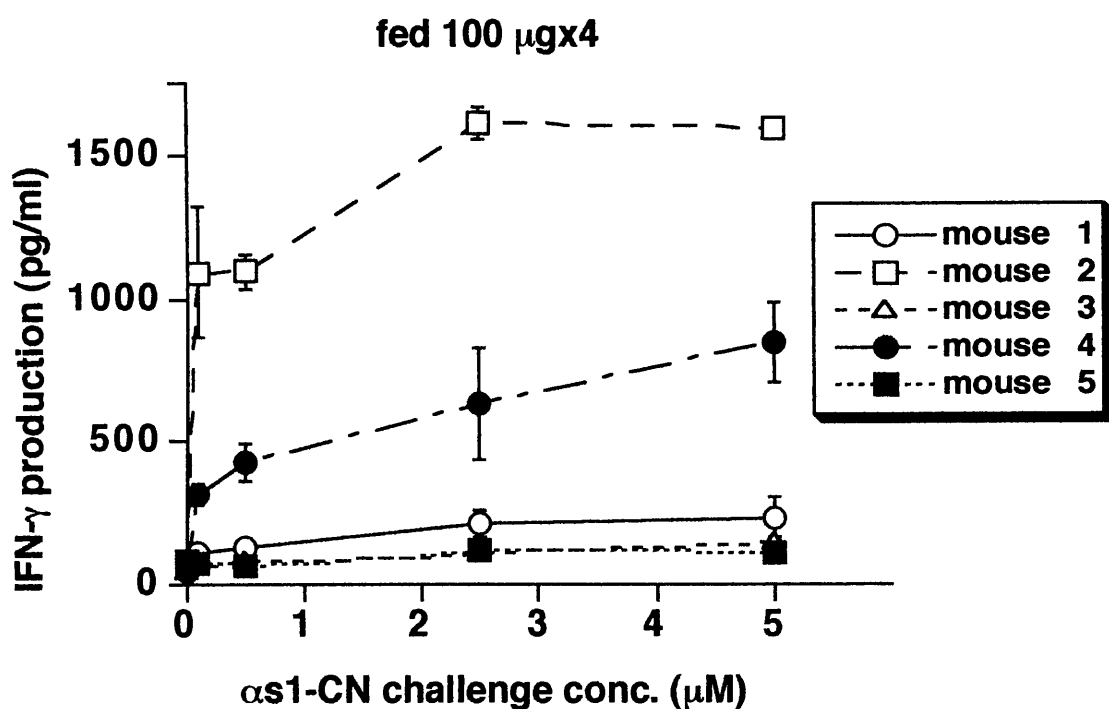


図 1-3 少量の抗原を経口投与したマウスにおける抗原濃度依存的な IFN- γ 産生応答

$\alpha\text{s1-CN}$ を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 100 μg ずつ経口ゾンデを用いて経口投与した。2-3 日間隔で計 4 回投与した後、脾臓細胞を摘出し、抗原の存在下/非存在下で培養した。3 日後培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した。

清中に増加し続けることが観察された（図 1-4）。

次に，誘導された IFN- γ は，どの細胞が分泌したものが検討した．抗体補体処理により T 細胞を除去した細胞を調製した結果，このような IFN- γ 産生は観察されなくなった（図 1-5）．すなわち上述の IFN- γ 産生は T 細胞によるものであることが示された．さらに T 細胞の 2 つの細胞群である CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞のどちらのサブセットによるものかを調べるため，抗 CD4 または抗 CD8 抗体を培養中に加えることによりブロッキング実験を行った．その結果，抗 CD8 抗体を加えても IFN- γ 産生にほとんど影響を与えなかったのに対して抗 CD4 抗体を加えると，抗体濃度に依存して IFN- γ 産生が阻害された（図 1-6）．これにより少量の α s1-カゼインを経口投与することによって CD4⁺ T 細胞による IFN- γ 産生が誘導されることが示された．すなわち α s1-カゼインの経口投与は主に Th1 型の T 細胞を誘導することが示された．

一度に少量ずつ複数回にわたって抗原を経口投与することによっては Th1 細胞の活性化を誘導するのに対し，一度に大量の抗原を投与することによっては活性化は誘導されにくかった

少量の抗原の経口投与によっては Th1 細胞の活性化を誘導したが，大量の抗原の経口投与によってはこのような活性化は認められなかった．そこで，抗原の投与方法（少量ずつまたは一度に大量）が Th1 細胞の活性化に与える影響を解析した．その結果，最終的に同量の α s1-カゼインを経口投与しても，200 μ g ずつに分けて投与すると強い IFN- γ 産生が誘導されるのに対し 1 mg ずつ投与すると 1 回目の投与後ですらその産生量は低く，活性化が誘導されにくいことが示された（図 1-7）．この傾向は，最終的に 1, 2, 3 mg を投与したすべてのマウスにおいて同様であった．また，1 mg を 1 回投与したマウスにおいて，経口投与から脾臓摘出までの期間を変化させても（1-10 日）その傾向に変化がないことを

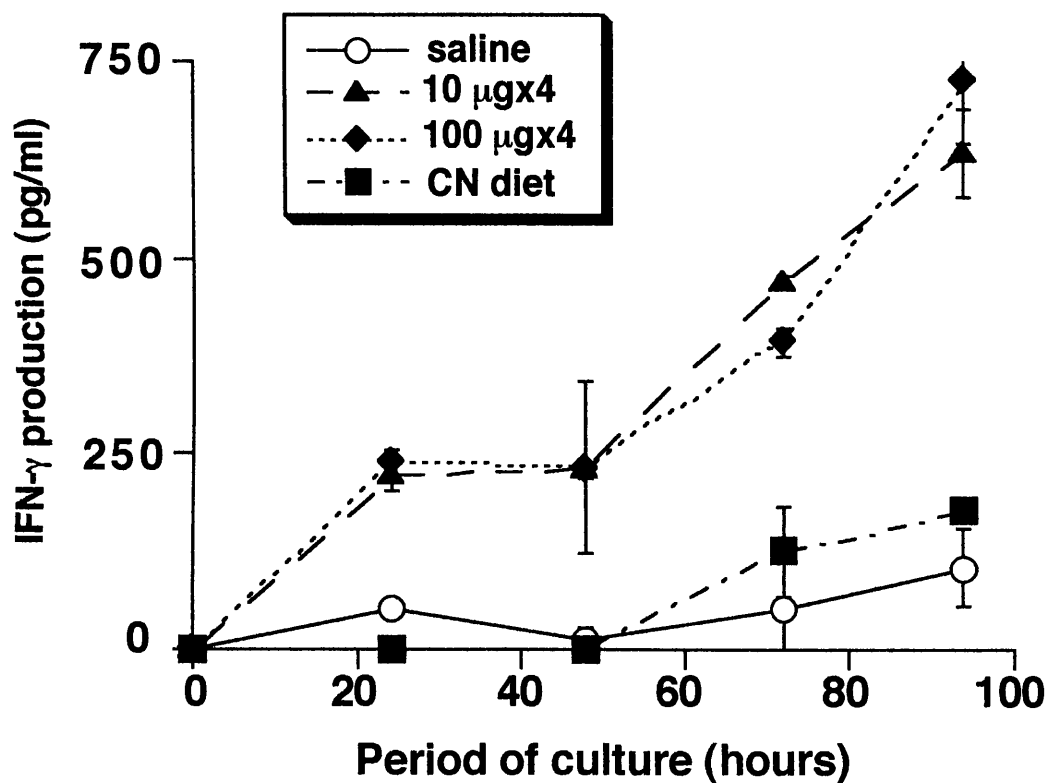


図 1-4 抗原を経口投与したマウスにおける IFN- γ 産生の経時的変化

α s1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 または 100 μ g ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか、またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた。これらのマウスより脾臓細胞を摘出し、5 μ M の抗原の存在下で培養した。1-4 日後培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した。

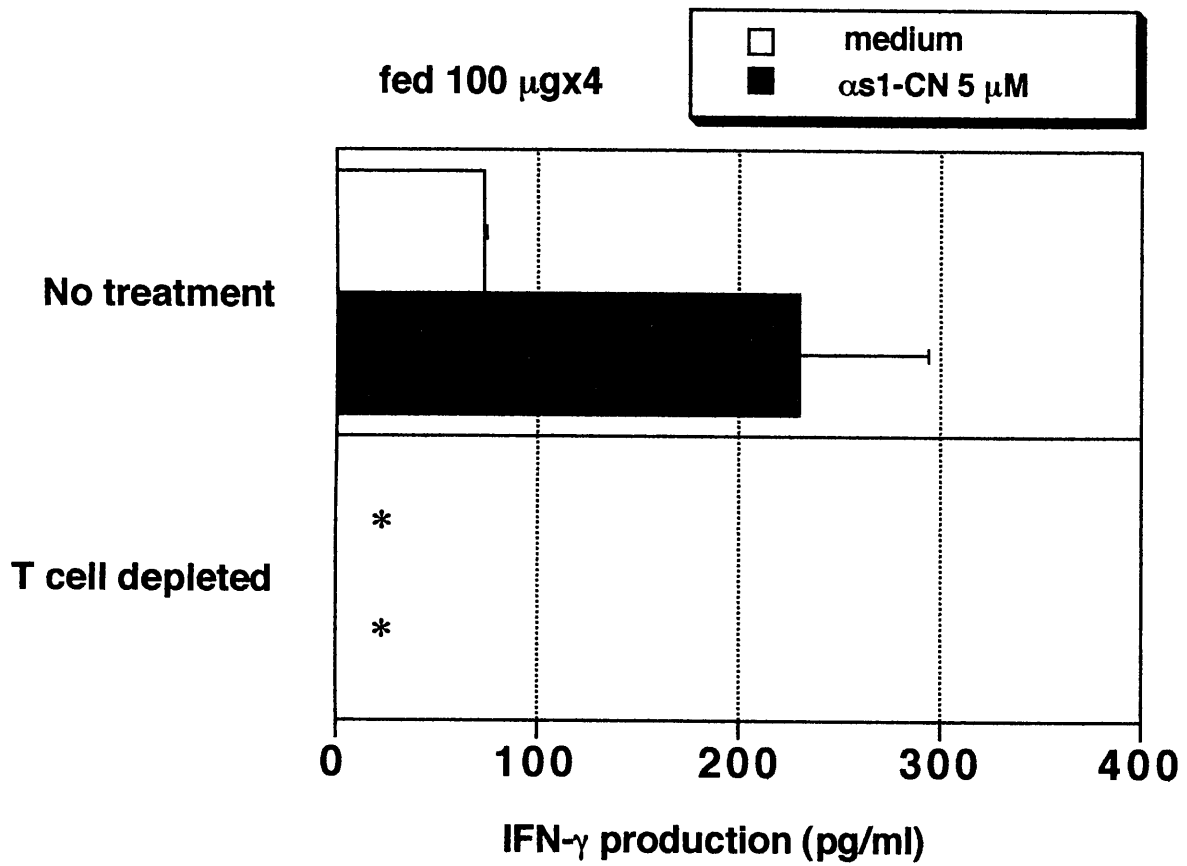


図 1-5 抗体補体処理による T 細胞除去の IFN- γ 産生への影響

α s1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 100 μ g ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与した。これらのマウスより脾臓細胞を摘出し、抗原の存在下/非存在下で培養した。3 日後培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した。* <15

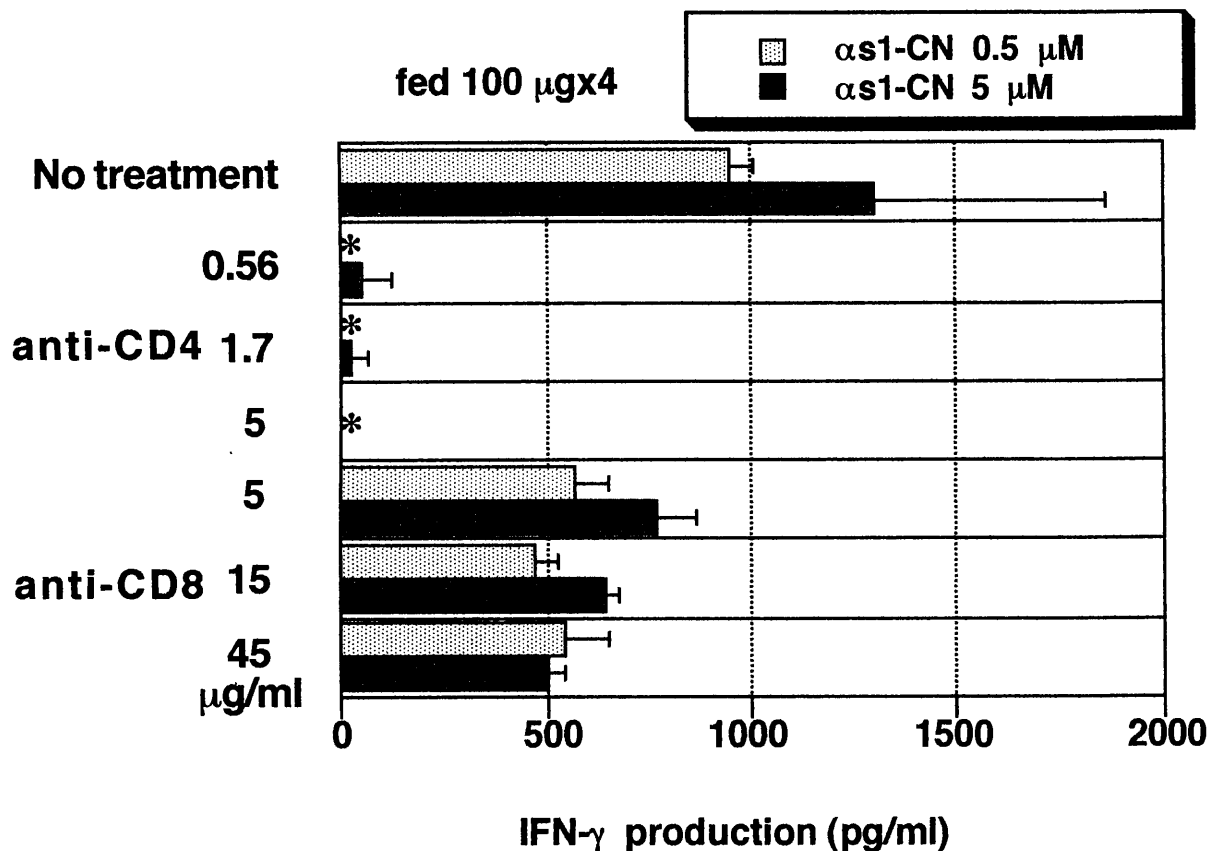


図 1-6 抗 CD4 および抗 CD8 抗体による IFN- γ 産生の阻害

$\alpha\text{s1-CN}$ を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 100 μg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与した。これらのマウスより脾臓細胞を摘出し、抗原の存在下で培養した。培養中に抗 CD4 または抗 CD8 抗体を添加した。3 日後培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した。* <15

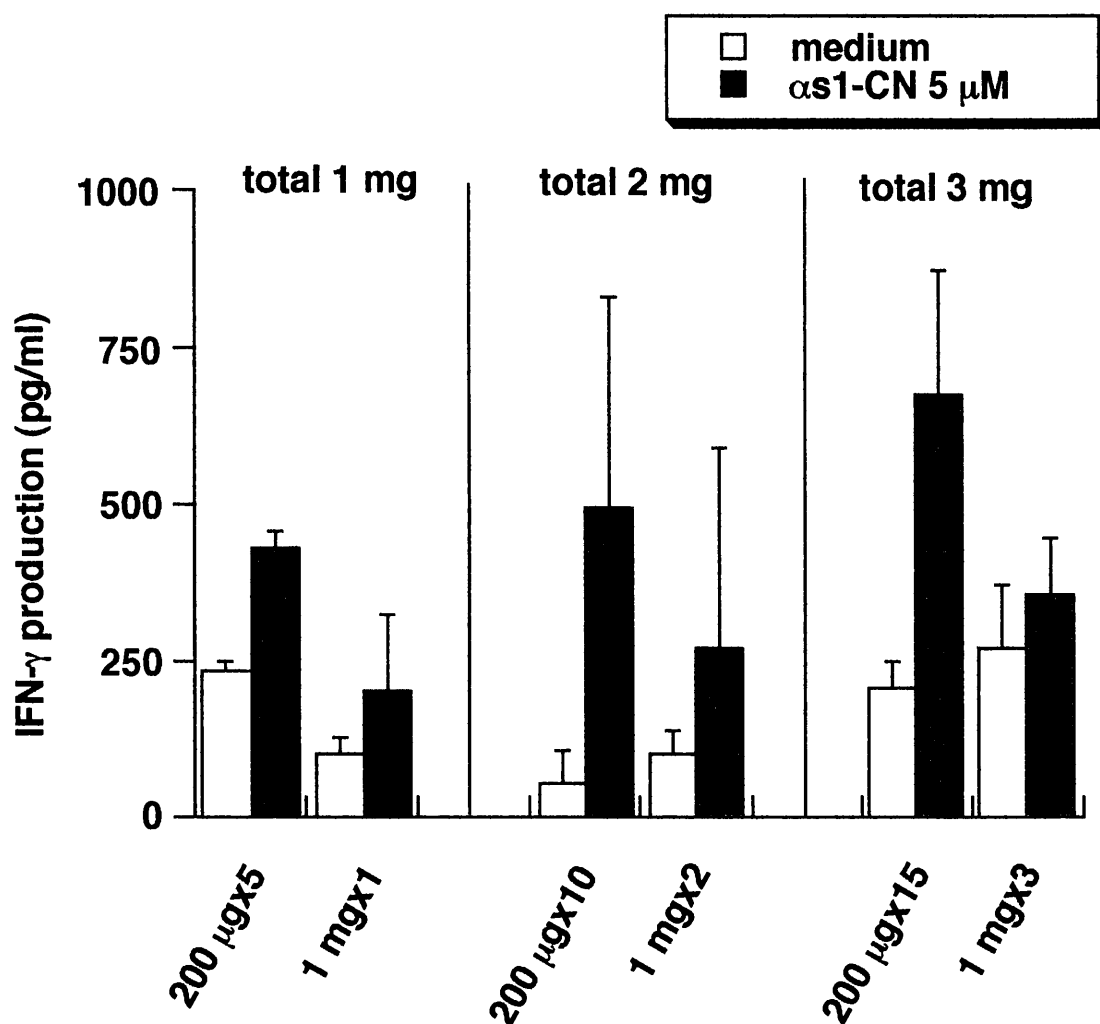


図 1-7 1 回に投与する抗原量が IFN- γ 産生の誘導に与える影響

α s1-CN を生理食塩水に溶解し，マウスに 1 頭当たり 200 μ g または 1 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 1, 2, 3 mg となるように経口投与した．これらのマウスより脾臓細胞を摘出し，抗原の存在下/非存在下で培養した．3 日後培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した．

確認した（データ省略）。

少量の α s1-カゼインの経口投与によっては Th1 細胞の活性化に引き続き寛容が誘導されたのに対して、多量の抗原の経口投与によっては活性化を伴わずに寛容が誘導された

α s1-カゼインの経口投与により誘導される経口免疫寛容と経口投与量の関係を検討した。 α s1-カゼインの経口投与後、抗原で免疫し 2 週間後に更に追加免疫した。10 日後の血中抗体価および脾臓細胞の増殖応答、サイトカイン産生応答を測定し生理食塩水投与群（対照群）と比較した。血中抗体価は、血清を IgG+A+M : 1/8000, IgG1 : 1/40000, IgG2a : 1/2000, IgG2b : 1/1000 に希釈して測定した。その結果、10 μ g, 100 μ g ずつの少量投与群では血中抗体価（IgG+A+M）の低下は見られなかったが 1 mg 以上の大量投与によっては投与量に依存して抗体価は抑制されており、経口免疫寛容が誘導されていた（図 1-8）。一方、少量投与群においても Th1 型の抗体である IgG2a は対照群に比べ若干の低下が認められた（図 1-8）。マウスの個体数を増やして詳細に解析した結果、100 μ g ずつの少量投与群において対照群との間に IgG2a 産生に統計的有意差があることを確認した（ $p < 0.05$, データ省略）。

また、脾臓細胞の増殖応答を測定したところ、少量投与群においても抑制が見られ、投与量に依存してその抑制は強くなった（図 1-9）。T 細胞の通常の培養条件下における増殖応答は、一般に Th2 細胞よりも Th1 細胞の方が大きいと考えられ、この結果からも Th1 細胞に対しては少量の抗原の経口投与によっても経口免疫寛容が誘導されていると考えられる。さらに、これら脾臓細胞のサイトカイン産生を測定したところ、Th1 型のサイトカインである IFN- γ （図 1-10）は少量投与群においてもその産生はほとんど見られなかった。

これらの結果および図 1-1～1-7 に示した結果より、少量の抗原の経口

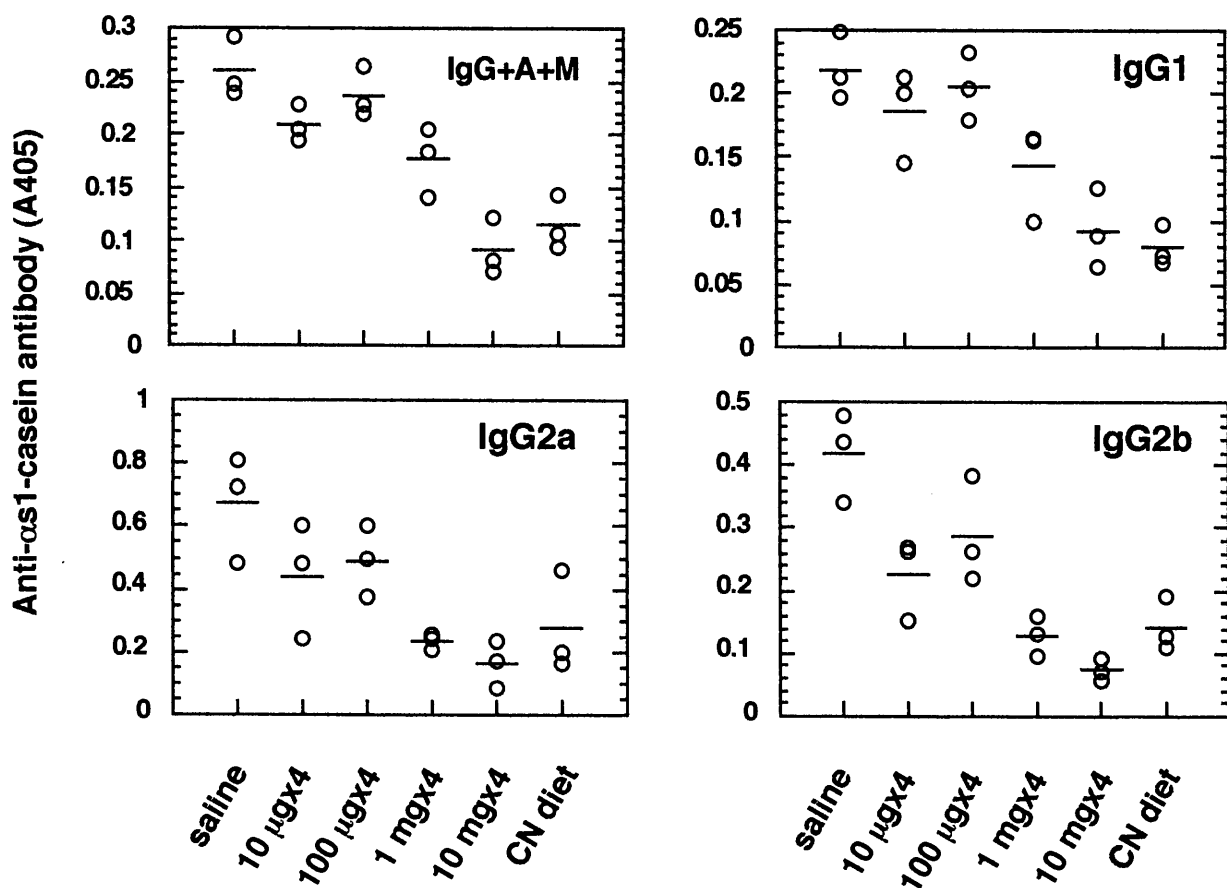


図 1-8 抗原の経口投与量と経口免疫寛容の誘導（抗体産生）

α s1-CN を生理食塩水に溶解し，マウスに 1 頭当たり 10 μ g-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか，またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた．これらのマウスを抗原で免疫し，さらに追加免疫を行った後に血清を採取した．血清中の抗 α s1-CN 抗体量を ELISA 法で測定した．

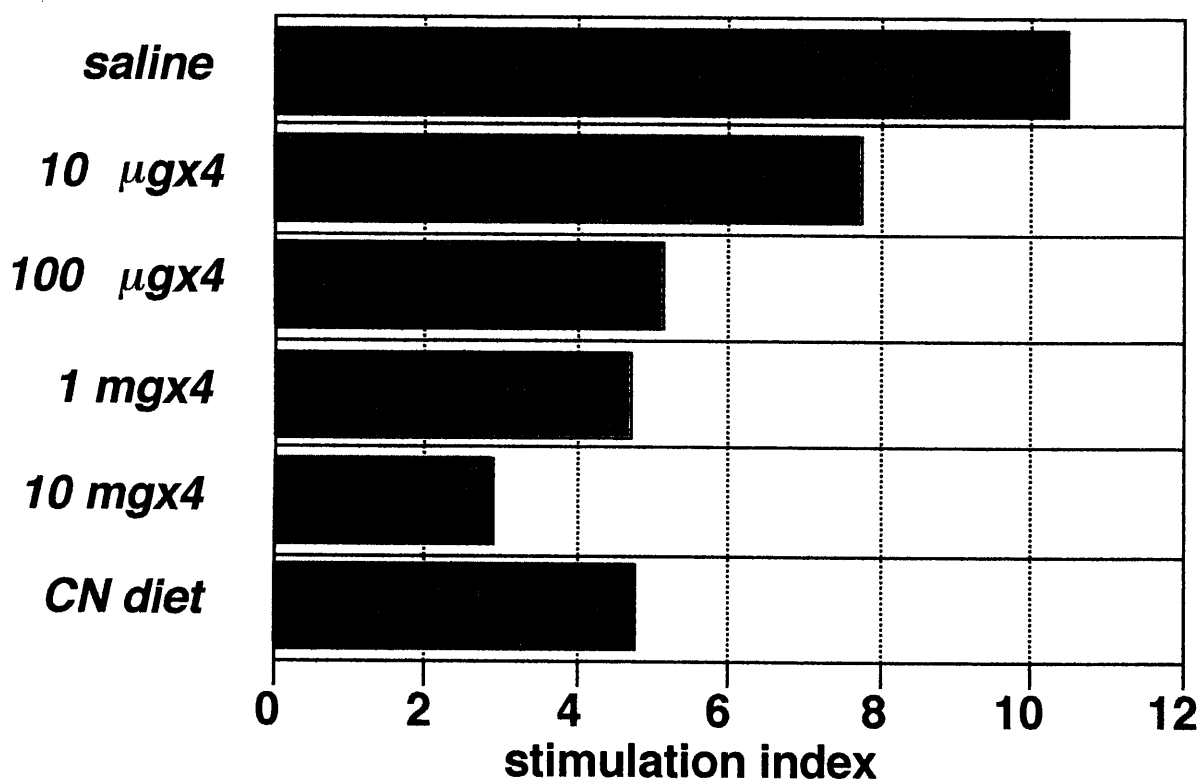


図 1-9 抗原の経口投与量と経口免疫寛容の誘導 (T 細胞増殖応答)

α s1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 μ g-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか、またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた。これらのマウスを抗原で免疫し、さらに追加免疫を行った後に脾臓細胞を採取した。得られた脾臓細胞を抗原存在下/非存在下で培養し、増殖応答を [3 H]-thymidine の取り込みにより測定した。値は抗原存在下における取り込み値を抗原非存在下における取り込み値で除して表した。

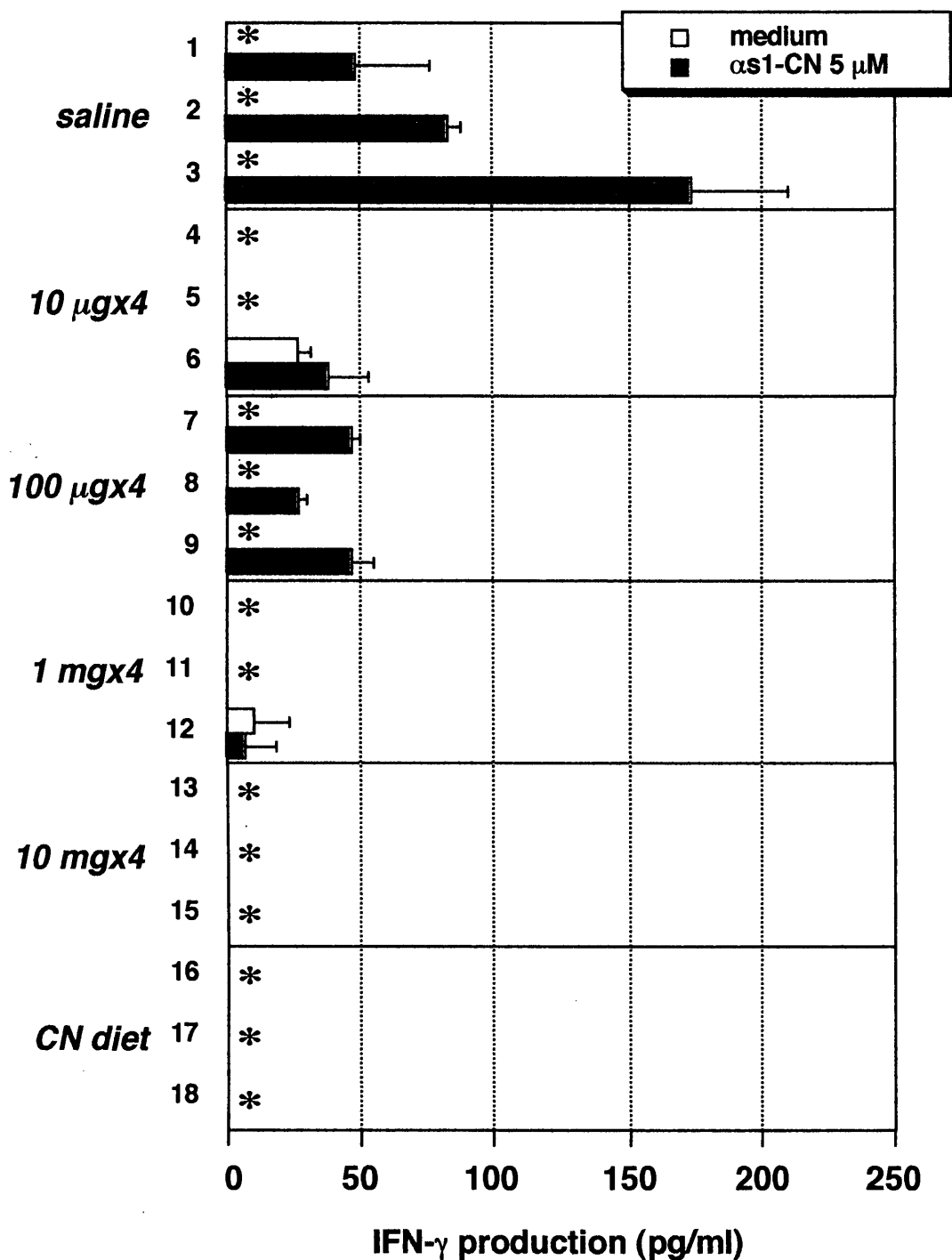


図 1-10 抗原の経口投与量と経口免疫寛容の誘導 (IFN-γ 産生)

αs1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 μg-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか、またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた。これらのマウスを抗原で免疫し、さらに追加免疫を行った後に脾臓細胞を採取した。得られた脾臓細胞を抗原存在下/非存在下で培養し、3 日後培養上清中の IFN-γ 産生量を ELISA 法で測定した。* <

投与によっては Th1 細胞の活性化に引き続いて、Th1 細胞の寛容も誘導されていることが明らかとなった。一方で、大量投与群では明らかな Th1 細胞の活性化は認められず、強い寛容のみが誘導されていた。

α s1-カゼインの経口投与により誘導される Th1 型応答の経口免疫寛容は Th2 型に比べより低い投与量で誘導された

α s1-カゼインの経口投与により誘導される経口免疫寛容と経口投与量の関係を Th1 型応答と Th2 型応答の差異に着目して検討した。前述のように、少量投与群では Th1 型の抗体である IgG2a は対照群に比べ若干の低下が認められたのに対し、Th2 型の抗体である IgG1 の低下は認められなかった（図 1-8）。これより、Th1 型応答は Th2 型に比べより低い投与量で経口免疫寛容が誘導されることが示された。

また、脾臓細胞のサイトカイン産生では、前述のように Th1 型のサイトカインである IFN- γ （図 1-10）は少量投与群においても産生が抑制されていたのに対し、Th2 型のサイトカインである IL-4（図 1-11）、IL-10（図 1-12）は投与量に依存してその産生量が緩やかに減少していた。このことから Th1 細胞は Th2 細胞に比べより少量の抗原の経口投与によって経口免疫寛容が誘導されることが示唆された。また、抑制性のサイトカインであり、経口免疫寛容の誘導を担っていると考えられている TGF- β はどの投与量においても検出されなかった（データ省略）。

α s1-カゼインの経口投与により誘導される経口免疫寛容においてはアクティブサプレッションは認められなかった

既に、少量の抗原の経口投与によって抑制性のサイトカインによるアクティブサプレッションが誘導されるケースが報告されている（18, 19, 95）。また本研究では、少量の α s1-カゼインの経口投与によっても Th1 細胞の応答が抑制されることを示した。一方で、これらのマウスにおける

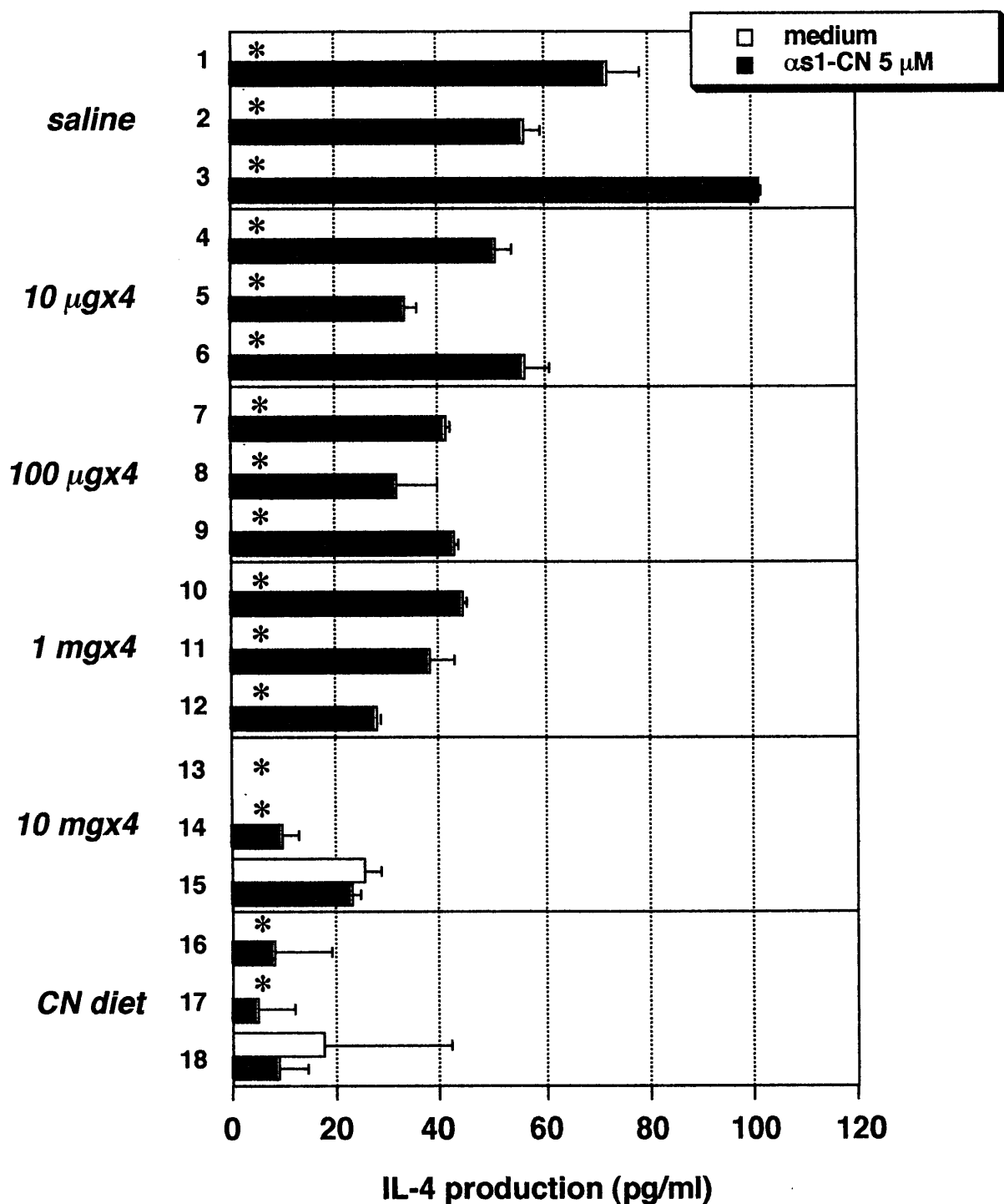


図 1-11 抗原の経口投与量と経口免疫寛容の誘導 (IL-4 産生)

αs1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 μg-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか、またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた。これらのマウスを抗原で免疫し、さらに追加免疫を行った後に脾臓細胞を採取した。得られた脾臓細胞を抗原存在下/非存在下で培養し、3 日後培養上清中の IL-4 産生量を ELISA 法で測定した。* < 13

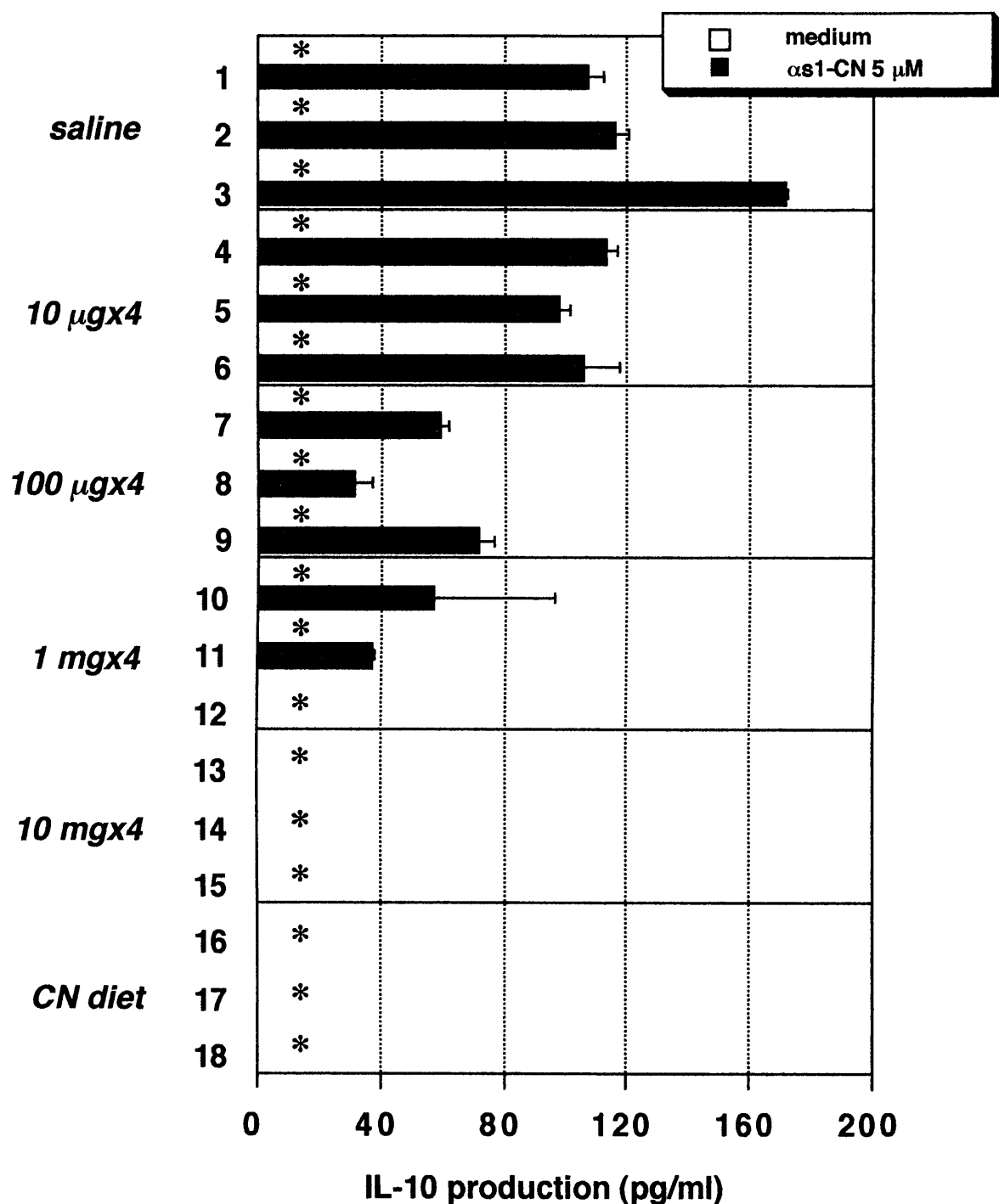


図 1-12 抗原の経口投与量と経口免疫寛容の誘導 (IL-10 産生)

αs1-CN を生理食塩水に溶解し，マウスに 1 頭当たり 10 μg-10 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与するか，またはカゼイン含有試料を 2 週間自由摂取させた．これらのマウスを抗原で免疫し，さらに追加免疫を行った後に脾臓細胞を採取した．得られた脾臓細胞を抗原存在下/非存在下で培養し，3 日後培養上清中の IL-10 産生量を ELISA 法で測定した．* < 30

有意な TGF- β の産生は認められなかった。しかし、IL-10 などの抑制性サイトカインや、明らかとなっていない未知の要因によってアクティブサプレッションが誘導されている可能性も考えられる。そこで、少量の α s1-カゼインを経口投与したマウスの脾臓細胞を事前に α s1-カゼインにより感作されたリンパ節細胞と共に培養し、リンパ節細胞の増殖応答に与える影響を解析した。その結果、どの群においても対照群と差はなくアクティブサプレッションの誘導は認められなかった（図 1-13）。

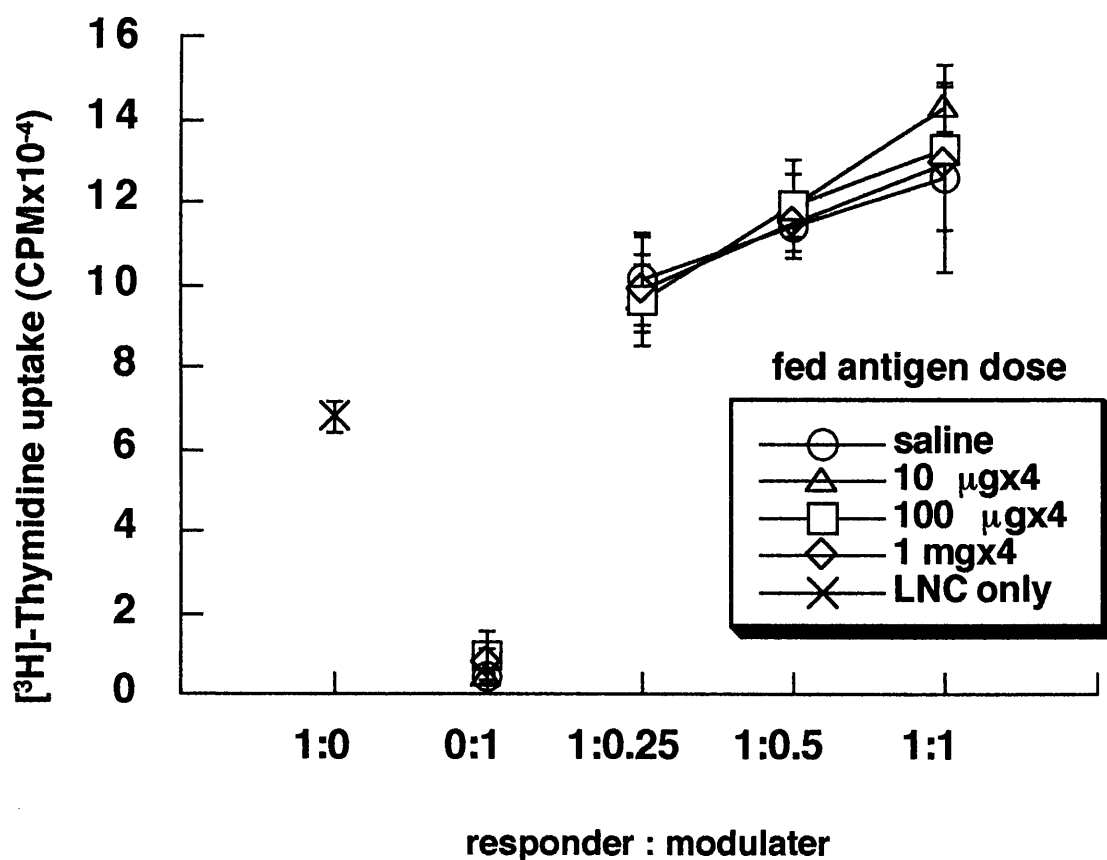


図 1-13 抗原を経口投与したマウスの脾臓細胞が抗原感作されたリンパ節細胞の増殖応答に与える影響

α s1-CN を生理食塩水に溶解し、マウスに 1 頭当たり 10 μ g-1 mg ずつ経口ゾンデを用いて 2-3 日間隔で計 4 回経口投与した。これらのマウスより脾臓細胞 (modulator) を採取した。得られた脾臓細胞を α s1-CN で免疫したマウスのリンパ節細胞 (responder) と図に示した割合で混合し、抗原存在下で培養した。3 日後、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みにより増殖応答を測定した。

考察

第一章では、タンパク質抗原の経口投与によって誘導される免疫応答の活性化と経口免疫寛容の関係を投与する抗原量に着目して検討した。牛乳由来タンパク質である α s1-カゼインを経口投与したマウスにおいて、経口免疫寛容は少量の抗原の投与によっても認められ、投与量が多くなるに従って強く誘導された。一方で、脾臓 T 細胞の IFN- γ 産生応答は大量の抗原の投与によっては認められず、少量の抗原の経口投与によってのみ誘導された。すなわち、少量の抗原の経口投与によっては T 細胞の活性化と寛容の誘導が同時にもしくは連続的に誘導されることが示された。さらに、最終的に同量の抗原を摂取する場合でも少量ずつ多数回投与する方が、一度に多量に投与するよりも T 細胞の活性化を誘導しやすいことも明らかとなった。この結果は、経口投与抗原の投与量および投与方法を変化させることによって、誘導される免疫応答と免疫寛容のバランスを制御することが可能であることを示唆している。

経口投与されたタンパク質抗原の大部分は消化管においてペプチドやアミノ酸に切断され腸管より体内に取り込まれるが、消化の影響を免れたタンパク質分子や抗原性を有する一部のペプチドは生体内で様々な免疫応答を誘導することが知られている。興味深いことにこれらの抗原は腸管粘膜では IgA を主体とする分泌型の抗体産生を誘起する一方で (7)、全身の免疫系では経口免疫寛容を誘導することによりその抗原に対する免疫応答を低下させる (1, 3) という二面性を持つことが明らかとなっている。このような二面性は経口投与抗原に対する免疫応答の大きな特徴と考えられるが、これらの応答がどのようなメカニズムにより制御されているかについては未だほとんど解明されていない。近年では経口投与抗原に対しては腸管だけでなく肺や気管などの粘膜表面 (96, 97)、脾臓やリンパ節などの全身性の免疫器官 (34) においても抗体産生やサイトカイ

ン産生などの免疫応答が誘導されることも明らかとなってきた。これは経口投与抗原が全身の免疫系に影響を持っていることを表しており、経口免疫寛容はこのような全身性の免疫応答が過剰に誘導され食品アレルギーの発症に至ることを防いでいると考えられる。すなわち、経口投与抗原に対する寛容誘導と活性化のバランスの制御機構の解明が食品アレルギーの予防や粘膜ワクチンの開発さらには経口免疫寛容の臨床応用へ向けて重要な課題であると考えられる。

経口投与抗原の抗原量と免疫応答の活性化

本研究において、われわれは 10 μ g を 4 回 (10 μ gx4) および 100 μ gx4 といった極めて少量の α s1-カゼインを経口投与したマウスより調製した脾臓細胞が *in vitro* での抗原刺激に対して IFN- γ を産生することを明らかにした。また、GALT を構成する主要な器官であるパイエル板においても同様に IFN- γ を産生する細胞が誘導されていた (データ省略)。一方で、1 mgx4 以上の比較的多量の抗原を経口投与することによって、投与量依存的に IFN- γ 産生量が減少することが明らかになった。さらに、最終的に 1 mg の抗原を投与した場合でも、一度に投与するよりは 200 μ g ずつ 5 回に分けて投与した方が高い IFN- γ 産生を誘導することが示された。この結果は、経口投与抗原によってアジュバントを用いずに免疫系の活性化を誘導するためには一度に大量の抗原を投与するよりも少量ずつ多数回に分けて投与する方が効果的であることを示唆している。

粘膜免疫応答を利用した経口ワクチンの開発は様々な感染症に対する予防策として大いに期待されている。しかしながら現在のところ有効な粘膜アジュバントとして知られている CT や大腸菌の易熱性毒素などは、毒素としての危険性やタンパク質として高い抗原性を有していることから臨床利用に向けてはその安全性が大きな問題となる。近年これらのタ

ンパク質のアミノ酸配列に変異を加え毒性の極めて低いアジュバントの開発が報告されているものの (59, 98), 強い抗原性は残存しており不必要な免疫応答が誘起されるという副作用の危険性は排除されていない。本研究の結果より, 少量のタンパク質抗原を継続的に経口投与することによって, 特別なアジュバントを用いずに効率的に免疫応答を誘導できる可能性が示唆された。

一方, 経口免疫寛容現象を自己免疫疾患やアレルギーの治療に応用する場合, 経口抗原によって誘起される免疫応答は症状の悪化を引き起こすおそれがあるため最小限に抑えることが重要な課題となる。本研究では 10 μ gx4 から 2 週間の自由摂取まで抗原の投与量を 5 段階に設定して経口免疫寛容の誘導を評価したところ, 投与量が増加するに従って強い経口免疫寛容が誘導されることが明らかとなった。前述の結果とあわせて考察すると, 一度に多量の抗原を経口投与することによっては, 免疫系を強く活性化するのではなくむしろ免疫系の活性化を伴わずに経口免疫寛容を誘導できることが示唆された。これらの結果は, 経口投与抗原に対する免疫応答の誘導において抗原投与量が非常に大きな影響を持っていることを示しており, 臨床医学的な面だけでなく食品アレルギーを初めとする食品に対する免疫応答の誘導機構を解明する上でも重要な知見であると考えられる。

タンパク質抗原の経口投与により誘導される免疫応答の研究は, 従来までの多くの報告で CT などのアジュバントを用いた解析により行われてきた (31-33, 35, 36)。CT はそれ自身が高い抗原性を有するタンパク質であり Th2 型応答を誘導しやすい性質を持つことが知られているため (37, 38), これらの研究が通常的食品中のタンパク質抗原に対する応答をどの程度反映しているかについては疑問であった。本研究の結果, タンパク質抗原をアジュバントを用いずに経口投与することによって Th1 細胞の活性化が誘導される場合があることが明らかとなった。

これまでに T 細胞の抗原認識の際に刺激をうける抗原量がその後の Th1, Th2 細胞への分化に影響を与えることが報告されている。本研究においては投与量によって IFN- γ 産生量は影響を受けたものの、いずれの投与量においても Th1 応答の誘導が認められ Th2 型サイトカインは誘導されなかった。さらに、少量の α s1-カゼインを経口投与したマウスにおいて脾臓だけでなくパイエル板においても IFN- γ 産生細胞が誘導されていることを明らかにした。本研究では第三章に詳しく述べるように、極めて少量の抗原によっては脾臓およびパイエル板細胞のいずれの抗原提示によっても Th2 細胞への分化は誘導されにくいことを明らかにしており、この結果は *in vitro* での知見と矛盾しないものである。

パイエル板は経口投与抗原に対する免疫応答の誘導器官であると考えられており、多くの研究により IgA 産生誘導を主体とする Th2 型応答の優勢な活性化が報告されている。一方で、本研究ではいずれの投与量においても Th2 応答の誘導は認められなかった。第三章における *in vitro* の実験の結果によると、Th2 の誘導は比較的高い濃度の抗原刺激が必要であることが示されている。しかしながら *in vivo* においては多量の抗原を経口投与することによって経口免疫寛容が誘導されてしまうため、本研究では本来 Th2 応答が誘導されるような抗原量においても Th2 の応答が検出されなかったものと考えられる。これまでの多くの研究では、経口免疫寛容の誘導を阻害するようなアジュバントを用いることによって Th2 応答の誘導が示されてきた可能性が考えられた。また、第三章の結果から、Th2 細胞が誘導されるのは極めて狭い濃度範囲に限られていることから、本実験で用いた条件には強く Th2 応答を誘導する濃度が含まれていなかった可能性もある。本研究の結果は食品抗原によって実際に生体内において Th1 型の応答が誘導されていることを示唆するものである。経口投与抗原に対する Th1 型応答の誘導は過剰な Th2 応答による IgE 産生の防止すなわち食品アレルギーの抑制機構の一部を担ってい

る可能性が考えられる。

経口投与抗原の抗原量と経口免疫寛容の誘導

Freedman と Weiner は経口免疫寛容の誘導機構は経口投与する抗原量により決定されると報告している (12)。彼らの報告によると、少量の抗原では抑制性の細胞である調節性 T 細胞が誘導され、これらの T 細胞の産生する TGF- β により免疫応答が抑制される。一方、多量の抗原によっては抗原特異的 T 細胞の不応答化やアポトーシスによる除去が誘導され免疫応答が抑制されると報告されている。本研究においては少量の抗原の経口投与によっても調節性 T 細胞の誘導は認められず、TGF- β の産生も検出されなかった。しかしながら、T 細胞の活性化に伴う IFN- γ の産生が認められた。これは少量の抗原の経口投与によって T 細胞の活性化が誘導されることを示し、Freedman らの見解と矛盾しない結果である。ある抗原に対してどの様なタイプの免疫応答が誘導されるかを決定する要因としては、抗原の投与方法や投与量の他に抗原の種類と動物の遺伝的バックグラウンドとの組み合わせが大きな影響を持つことも知られている (99)。同じ抗原や細菌感染に対する応答であっても MHC 分子のハプロタイプによって異なった応答が誘導されることがマウスの実験により報告されている (100, 101)。少量の抗原の投与による TGF- β の誘導はすべての動物や抗原に対して認められるものではないと考えられる。

一方で、本研究でも少量の抗原を経口投与したマウスにおいてその後のアジュバントを用いた非経口的な抗原に対する応答が抑制されることが示された。この結果は、少量の抗原を経口投与したマウスにおいて T 細胞の活性化と同時にもしくは活性化に引き続き T 細胞の不応答化や除去が誘導されたことを示唆している。一般に T 細胞の不応答化や除去は TCR を介して強いシグナルが伝達された場合に誘導されると考えられていた。*in vitro* では抗 CD3 抗体やスーパー抗原を用いた刺激により、ま

た *in vivo* においてはスーパー抗原の投与や静脈注射・経口摂取などによる大量の抗原の投与による誘導が報告されている。本研究で得られた結果は、通常少量の抗原では誘導されないと考えられていた T 細胞の不応答化や除去が、経口投与によっては誘導され得ることを示している。T 細胞の不応答化を誘導する機構として上記のような TCR からの強い刺激と並んで抗原提示の際の副刺激の欠如が *in vitro* の実験により報告されている。副刺激とは抗原提示の際に抗原提示細胞上の副刺激分子である CD80 および CD86 が T 細胞上の CD28 または CTLA-4 と結合することによって T 細胞に伝わるシグナルであり、T 細胞の活性化を誘導する正のシグナルおよび活性化を収束させる負のシグナルを伝達する (102-104)。一方で、近年 *in vivo* での免疫寛容の誘導には CTLA-4 を介した副刺激の存在が必須であるとの報告もされている (78-82)。これらの報告は T 細胞の不応答化は単に TCR からの強い刺激により誘導されるのではなく、ある特異な機能を持った抗原提示細胞により抗原提示が行われることによって誘導されることを示唆している。本研究では少量の抗原の経口投与によって T 細胞寛容の誘導が認められたことから、経口免疫寛容の誘導にこのような特異な機能を持った抗原提示細胞が関与している可能性が強く示唆される。

しかしながら、現在までの研究では経口抗原の抗原提示が体内のどの器官において行われているのかは明らかになっておらず、その同定およびその器官に存在する抗原提示細胞の機能の解析が、経口免疫寛容の誘導機構の解明に繋がるものと期待される。本研究では、*in vitro* の実験において第二章に示すように単に抗原濃度を高くしただけでは T 細胞の不応答化は誘導されず、またパイエル板細胞の抗原提示によっても T 細胞の不応答化は誘導されないことを示した。これは、経口免疫寛容の誘導には生体内における腸管免疫に特異な環境が必須であることを示唆している。また、少量の抗原の経口投与により一度活性化された T 細胞が、

その後不応答化する機構についても通常の免疫応答とは異なった応答であり非常に興味深い。

経口投与抗原の抗原量による免疫応答と免疫寛容の制御

本研究の結果，最終的に同じ量を経口投与する場合，少量ずつ多数回投与するよりも一度に多量に投与する方が T 細胞の活性化を誘導しにくいことが示された。また，これらのマウスにおいて弱いながらも経口免疫寛容が誘導され，その後の同抗原に対する免疫応答は抑制されることも示された。抗原量における投与方法の違いがどのように経口免疫寛容の誘導に影響を与えるのかは明らかではない。しかしながら，このように T 細胞の活性化を誘導せずに免疫寛容を誘導することが出来ることは，経口免疫寛容を自己免疫疾患や種々のアレルギーに対する臨床応用において非常に重要な方策となることを示唆する。

また，本研究では Th1 型の T 細胞は Th2 型の T 細胞に比べ経口免疫寛容が誘導されやすいことが示された。これはこれまで *in vitro* および *in vivo* の様々な研究によって報告されてきた結果と矛盾しない結果である (20, 21, 105-108)。また，大量投与によっては Th2 応答においても Th1 応答と同様にほぼ完全にその応答が抑制されていることから，経口免疫寛容を臨床的に応用する場合アレルギーなどの Th2 型の関与する疾患にも有効である可能性を強く示唆していると考えられる。また，Th1 細胞と Th2 細胞における経口免疫寛容の誘導に対する感受性の差異がどのようなメカニズムによってもたらされるのかは本研究では明らかにすることが出来なかったが，経口免疫寛容の誘導機構を解明する上でも非常に興味深い問題である。今後，着目して解析を進めていきたい。

本研究で示した抗原量による免疫寛容と活性化および Th1 応答と Th2 応答の誘導の制御機構は明らかではないが，抗原量の違いによって抗原の取り込まれる器官が異なる可能性や抗原を取り込んで T 細胞に提示す

る抗原提示細胞の活性化に異なった影響を与える可能性などが考えられる。

第一章の結果をまとめると，少量の抗原の経口投与により T 細胞の活性化，特に Th1 応答の活性化が誘導されることが明らかとなった。また，抗原の経口投与によっては投与する抗原量によって T 細胞応答の活性化に引き続き，もしくは活性化を伴わずに経口免疫寛容を誘導できることが示された。今後はこれらを制御する機構を，特に抗原提示に着目して検討することが必要である。

経口抗原による免疫応答と免疫寛容の制御は食品アレルギーの予防や，経口ワクチンの開発などにおいて非常に重要な意味をもっている。本研究の結果はこれらの領域に有用な知見を与えるものであると考えている。

第二章

パイエル板は経口投与抗原を効率的に取り込み，全身免疫系とは異なった機能を有する抗原提示細胞が特徴的な免疫応答を誘導する

序

経口的に摂取された抗原に対しては IgA 産生や経口免疫寛容など通常の免疫応答とは異なった特有の応答が誘導される。これにより腸管から侵入してくる病原体から身を守り、同時に食品アレルギーなどの過剰な免疫応答を抑制していると考えられる。近年、パイエル板や粘膜固有層など腸管の免疫器官に存在する抗原提示細胞や T 細胞の機能面における特殊性が報告され (63, 65-68, 109, 110), 腸管免疫応答の誘導における役割に注目が集まっている。経口抗原に対する腸管特有な免疫応答の誘導は投与された抗原特異的に誘導されることから、特に抗原提示細胞による抗原提示がこれら特徴的な免疫応答の誘導に深く関与していると考えられる。抗原提示は抗原特異的な免疫応答の最初のプロセスであり、その後の免疫応答の質に影響を与えることが知られている。第一章で述べた免疫応答と免疫寛容および Th1 応答と Th2 応答の誘導の制御も抗原提示細胞が行っている可能性が考えられる。そこで、本研究では経口抗原の抗原提示に関わる細胞の同定と機能の解析を行った。

パイエル板は M 細胞を介して腸管腔から直接抗原を取り込む能力を持つため、腸管における免疫応答の誘導部位として主要な役割を果たしていると考えられてきた。パイエル板には B 細胞、マクロファージや DC などの MHC クラス II 陽性細胞が存在しているが、それぞれの細胞における抗原の取り込みや提示に関する検討はほとんどなされていない。また、これらの細胞の機能と腸管特異的な免疫応答の関係はほとんど明らかとなっていない。

Iwasaki と Kelsall および Everson らはパイエル板由来の樹状細胞は Th2 型のサイトカイン産生を誘導すると報告している (65-67)。一方で、これまでのいくつかの研究により腸管免疫応答における Th1 応答の重要性や (42, 43), 実際に生体内における経口抗原に対する Th1 応答の誘導も報告

されている (40, 41). このように, パイエル板において DC による抗原提示が常に Th2 応答のみを誘導するのか, またはその他の細胞種によって Th1 型の応答が誘導されるのか, さらに T 細胞の寛容誘導に関与するのかなど, 未だ検討の必要性が残されている.

本研究では蛍光標識したタンパク質 (卵白アルブミン; OVA) を用いて腸管から経口抗原を取り込む器官および細胞を解析した. さらに OVA に特異的な TCR のみを発現するトランスジェニックマウスより調製した抗原未感作 T 細胞を用いて, 経口抗原の抗原提示機構を解析した. 抗原未感作 T 細胞は抗原刺激時の条件により, 様々な機能を獲得し異なった細胞へと分化することが知られている. 本研究では, 抗原未感作 T 細胞を用いることによって, パイエル板やそれ以外の器官に存在する抗原提示細胞の抗原提示能を *in vitro* において詳細に解明することに成功した.

材料と方法

マウス

BALB/c メス 5-6 週令は日本クレアより購入した。OVA の 323-339 残基ペプチドに特異的な TCR トランスジェニックマウス (OVA23-3) は東海大学医学部の垣生園子博士、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 (111)。実験には導入遺伝子ホモ接合体マウスと BALB/c マウスを交配させた仔 (メス; 6-20 週令) を用いた。導入遺伝子の確認は ACT GTC CTC GCT GAT TCT GC および TCC ATC CTC ATG GAA GTT CC のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により行った。TCR トランスジェニックマウスは滅菌水と滅菌飼料により維持した。

抗原の蛍光標識

OVA は生化学工業 (東京) より購入した。OVA を 0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に 10 mg/ml となるように溶解した。この溶液に fluorescein isothiocyanate (FITC, 和光純薬工業) を 500 μ g/ml となるように加え 4℃で一晩攪拌した。PBS に対して透析を行い、未反応の FITC を十分取り除いた。さらに PD-10 カラム (Ampure SA code RPN. 1754; Amersham Pharmacia Biotech) を用いて残存する遊離の FITC を除去した。

抗原の経口投与

OVA および FITC 標識 OVA (FITC-OVA) はそれぞれの実験で示された投与量になるように PBS に溶解し、経口ゾンデを用いて BALB/c マウスに 1 匹当たり 500 μ l 経口投与した。

細胞培養

BALB/c マウスの脾臓およびパイエル板から細胞を調製した．実験によっては BALB/c マウスに OVA を経口投与し，経口投与の 1, 3, 5 時間後にそれぞれの器官から細胞を調製した．さらに，実験によっては得られた脾臓およびパイエル板細胞を B 細胞および非 B 細胞画分に分画して用いた．B 細胞および非 B 細胞は anti-mouse CD45R micro beads を用いた magnet activated cell sorting (MACS ; Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany)により，脾臓およびパイエル板細胞から分離した．CD45R 陽性画分を B 細胞，陰性画分を非 B 細胞として用いた．これらの細胞は無処理 TCR トランスジェニックマウスの脾臓より分離した未感作 CD4⁺ T 細胞とともに抗原の存在下／非存在下で培養した．TCR トランスジェニックマウスの未感作 CD4⁺ T 細胞は anti-mouse CD4 micro beads を用いた MACS により，TCR トランスジェニックマウス脾臓細胞より分離した．BALB/c マウス由来の細胞は 2.5×10^6 cells/ml (B 細胞と非 B 細胞を混合して用いる場合はそれぞれ 1/2 濃度)，TCR トランスジェニックマウス由来の CD4⁺ T 細胞は 5×10^5 cells/ml の濃度で培養した．

T 細胞増殖アッセイは抗原刺激の 2 日後，第一章と同様に [³H] -チミジンの取り込みにより測定した．分化誘導実験では一次刺激の 1 週間後に細胞を回収し，二次刺激を行った．二次刺激は全ての群において抗原提示細胞として X-線照射またはマイトマイシン C (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 処理により分裂能を阻害した BALB/c マウスの脾臓細胞を用いた．X-線照射は 3000-rad で，マイトマイシン C 処理は 50 μg/ml のマイトマイシン C を含む RPMI 培地中に細胞を懸濁し，37℃で 30 分間処理した後，よく洗浄して用いた．二次刺激時の抗原濃度は特に示した場合を除き 2 μM で行った．二次刺激の 2 日後に培養上清を回収し，上清中のサイトカイン量を ELISA 法により測定した．すべての培養は 10% FCS を含む RPMI 培地を用いて行った．

サイトカインの測定

第一章と同様に行った。ただし，これに加え IL-5 の測定には一次抗体としてラット抗マウス IL-5 抗体 (TRFK5, PharMingen)，二次抗体としてビオチン化ラット抗マウス IL-5 抗体 (TRFK4, PharMingen) を用いた。

フローサイトメトリー

FITC-OVA の経口投与の 1 時間後に脾臓，パイエル板，腸管膜リンパ節，鼠径部リンパ節，肝臓から細胞を調製し，フローサイトメトリーにより FITC-OVA で標識された細胞を解析した。脾臓細胞は赤血球を除去してから解析に用いた。肝臓細胞は Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて非実質細胞を精製し解析に用いた。

また，図 2-9 の実験においては脾臓摘出直後，および一次刺激 5 日後に細胞を回収し，FITC 標識抗マウス CD4⁺抗体 (H129.19, Gibco BRL) により，CD4⁺ T 細胞の存在比を解析した。その際，ヨウ化プロピジウム (PI)により死細胞は測定より除外した。

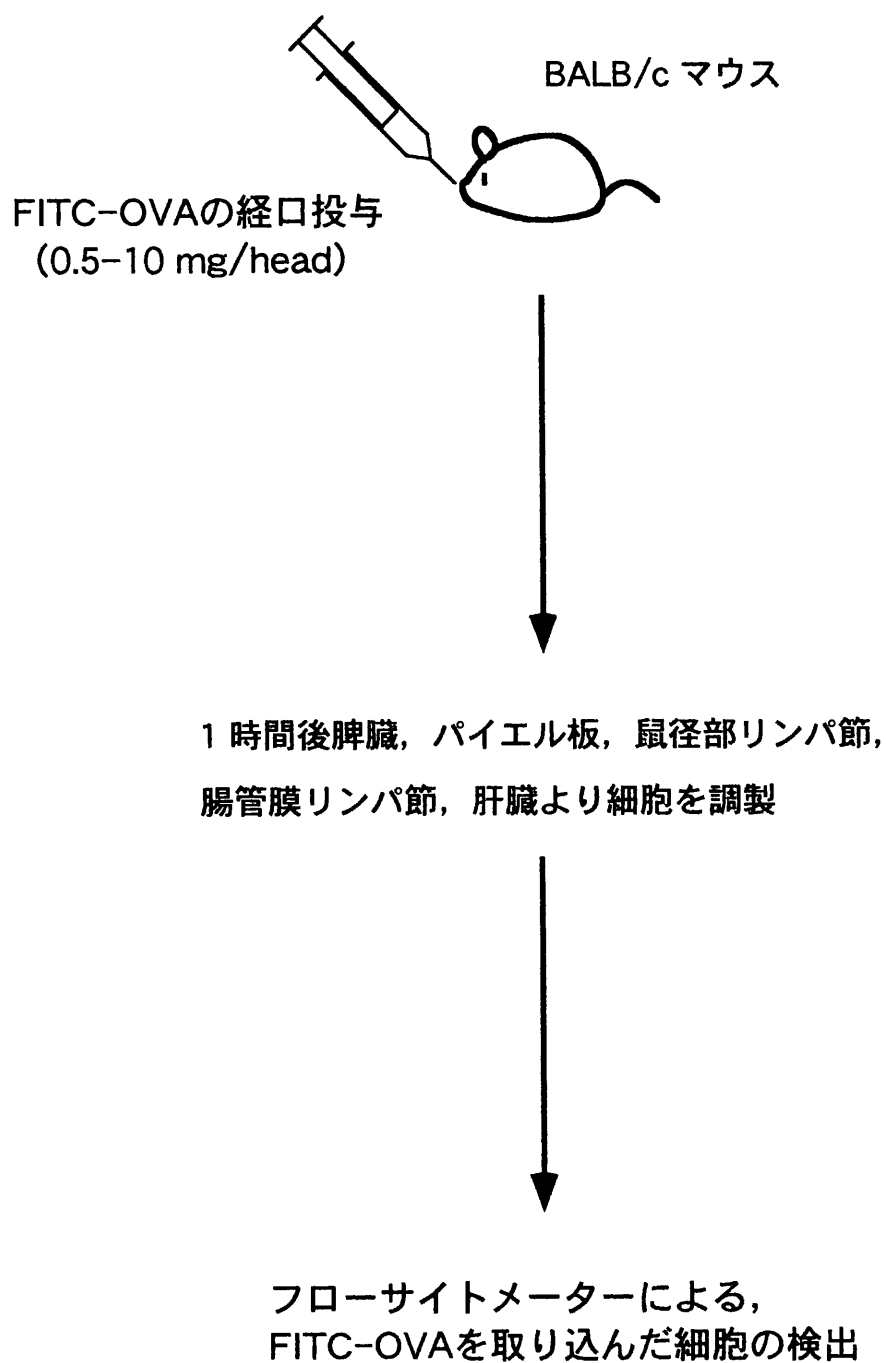


図 2-i 経口投与された抗原を取り込んだ細胞の解析方法

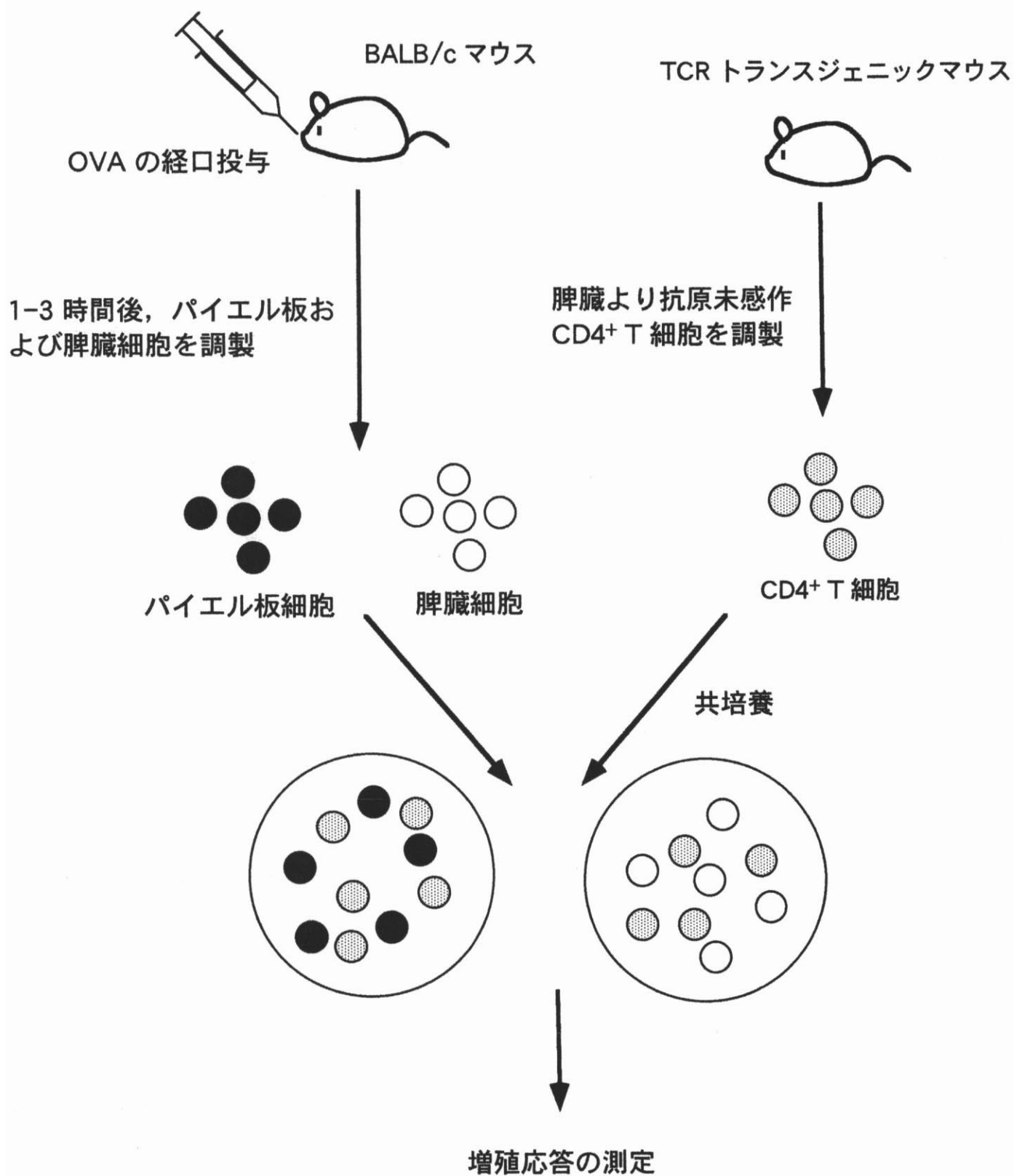


図 2-ii 経口投与された抗原を取り込んだパイエル板および脾臓細胞による抗原未感作 T 細胞の増殖応答誘導能の評価方法

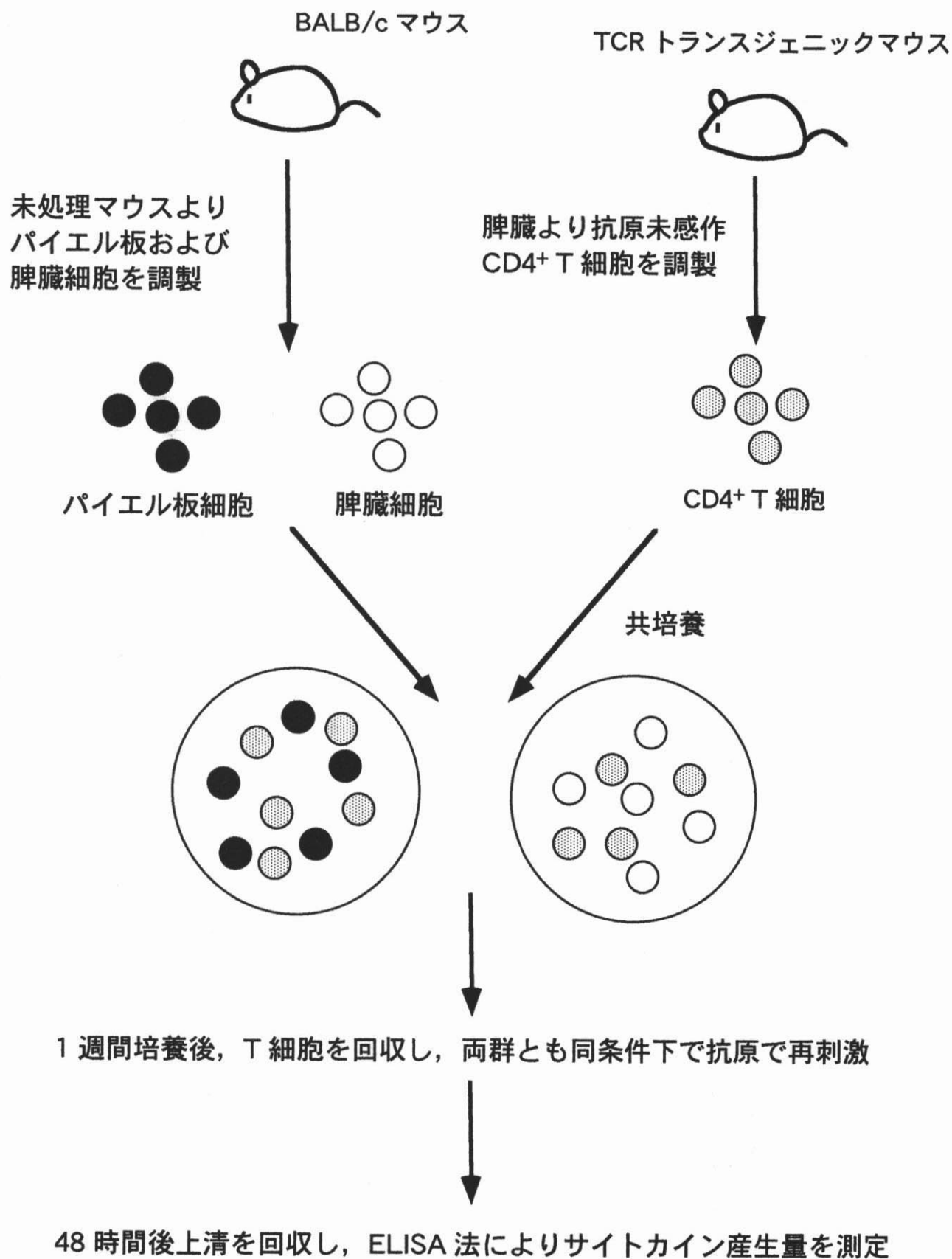


図 2-iii パイエル板および脾臓細胞の抗原提示による T 細胞分化誘導能の評価方法

TCR トランスジェニックマウス

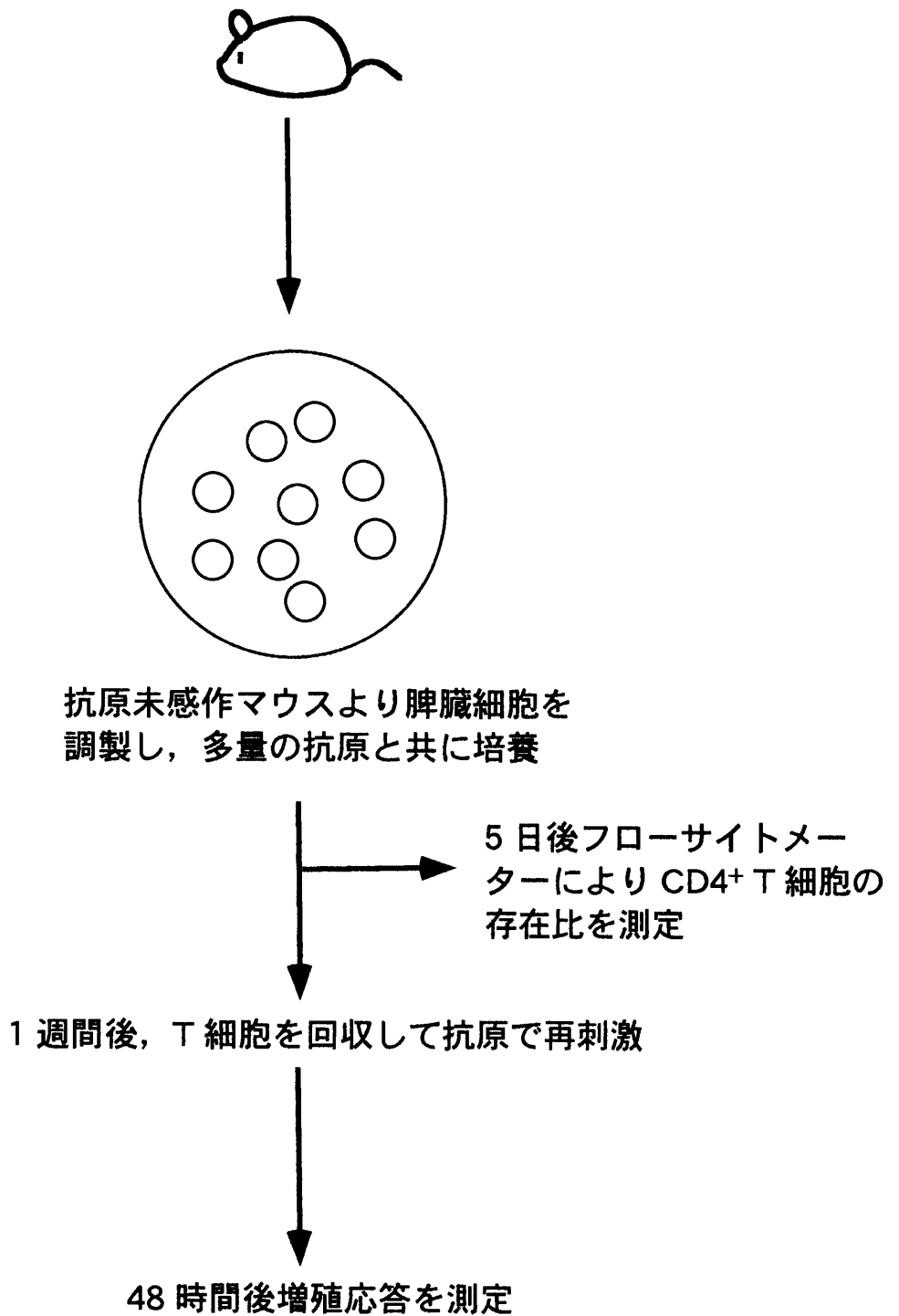


図 2-iv 多量の抗原による T 細胞不応答化誘導の評価方法

結果

経口投与された抗原は主にパイエル板および肝臓に取り込まれる一方で、脾臓、腸管膜リンパ節、鼠径部リンパ節にはほとんど取り込みが認められなかった

免疫系による経口投与抗原の認識機構を明らかにするために、蛍光標識したタンパク質抗原（FITC-OVA）を経口投与したマウスの各器官における抗原の取り込みを細胞レベルで検討した。FITC-OVA の経口投与の 1 時間後に各器官を摘出し、フローサイトメトリーに共した。その結果、抗原の経口投与量が増加するにつれパイエル板、肝臓細胞の蛍光強度が増大した（図 2-1）。一方で、脾臓、腸管膜リンパ節、鼠径部リンパ節ではこのような変化は認められなかった（図 2-1）。これらの器官の蛍光強度は抗原の経口投与の 3, 5 時間後においても変化は見られなかった（データ省略）。また、パイエル板における蛍光強度の変化は一部の細胞のみに認められるのではなく、全ての細胞で認められることが明らかとなった。この結果は、パイエル板ではドーム領域など一部の部位に存在している細胞だけでなく、ほぼ全ての細胞が経口抗原に接触していることを示している。

経口投与された抗原を *in vivo* で獲得したパイエル板細胞は抗原未感作 T 細胞の増殖応答を誘導した

パイエル板において強い抗原の取り込みが認められたので、次に実際に *in vivo* で抗原を獲得したパイエル板細胞が抗原未感作 T 細胞の活性化を誘導できるかどうか検討した。250 mg の OVA を経口投与した BALB/c マウスより経口投与の 1, 3 時間後にパイエル板および脾臓細胞を調製し、さらなる抗原を添加すること無しに TCR トランスジェニックマウス由来の抗原未感作 CD4⁺ T 細胞とともに培養した。その結果、

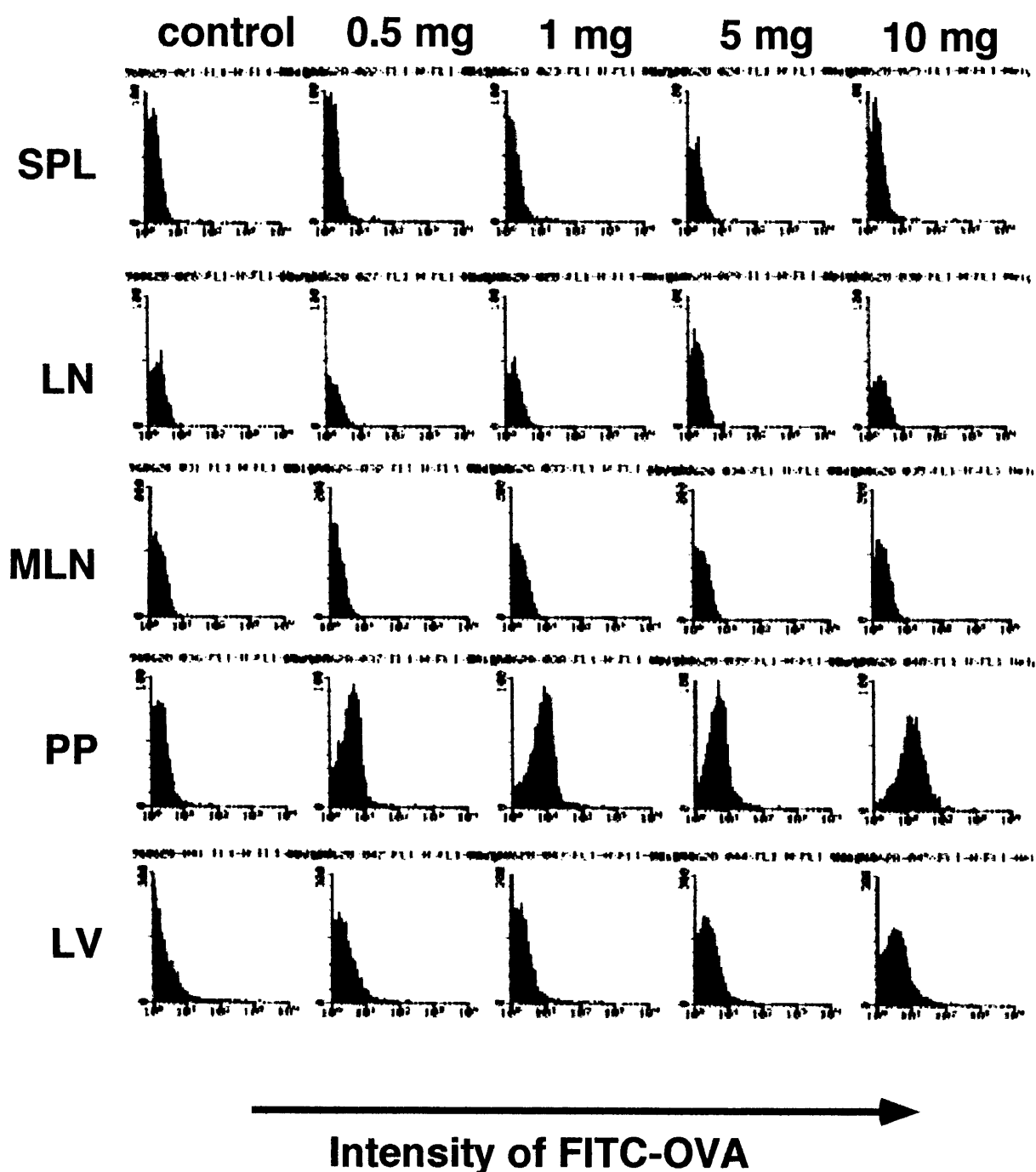


図 2-1 FITC-OVA を経口投与したマウスより調製した細胞の蛍光強度の測定

FITC-OVA を PBS に溶解し BALB/c マウスに0.5-10 mg ずつ経口ゾンデで経口投与した。経口投与の 1 時間後に脾臓 (SPL), 鼠径部リンパ節 (LN), 腸管膜リンパ節 (MLN), パイエル板 (PP) および肝臓 (LV) より細胞を調製し, フローサイトメーターにより細胞の蛍光強度を測定した。

抗原を経口投与したマウスのパイエル板細胞と共培養した T 細胞は抗原非投与マウスのパイエル板と共培養した対照群と比較して、強い増殖応答が誘導された（図 2-2）。この増殖応答は抗原投与の 1 時間後でも認められたものの、3 時間後ではより強く誘導された。一方、抗原投与の 5 時間後は 3 時間後よりも低く抗原投与 3 時間後が最大であった（データ省略）。本研究により、パイエル板細胞による抗原提示によって抗原未感作 T 細胞の活性化が *in vivo* でも誘導されていることを強く示唆するとともに、パイエル板細胞による経口抗原の抗原提示を *in vitro* で再構築することに成功した。一方、脾臓細胞と共培養した T 細胞は抗原の経口投与の有無に関わらずほとんど増殖応答を示さなかった（図 2-2）。

パイエル板と脾臓細胞による抗原提示によっては異なった T 細胞分化が誘導された

上記の実験系を用いて経口投与抗原の抗原提示が T 細胞の分化に与える影響を検討した。250 mg の OVA を経口投与したマウスより調製したパイエル板細胞および未処理マウスより調製したパイエル板細胞、脾臓細胞を TCR トランスジェニックマウスの未感作 CD4⁺ T 細胞と共培養して T 細胞の分化を誘導し、1 週間後に抗原で再刺激した後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。未処理マウスから調製した細胞を用いる場合には一次刺激時に 1 μ M の濃度で抗原を培養中に添加した。これは、未処理マウスから調製したパイエル板細胞によって 250 mg の抗原を経口投与したマウスから調製したパイエル板細胞と同程度の T 細胞の増殖応答が誘導される抗原濃度である（図 2-3）。その結果、パイエル板細胞によって抗原提示を受けた T 細胞は IFN- γ を強く産生し、若干の IL-4 を産生する細胞へ分化した（図 2-4）。この際、パイエル板細胞が抗原を *in vitro* および *in vivo* のいずれで獲得してもサイトカイン産生パターンにほとんど違いは認められなかった。一方で、脾臓細胞を抗原提示細胞

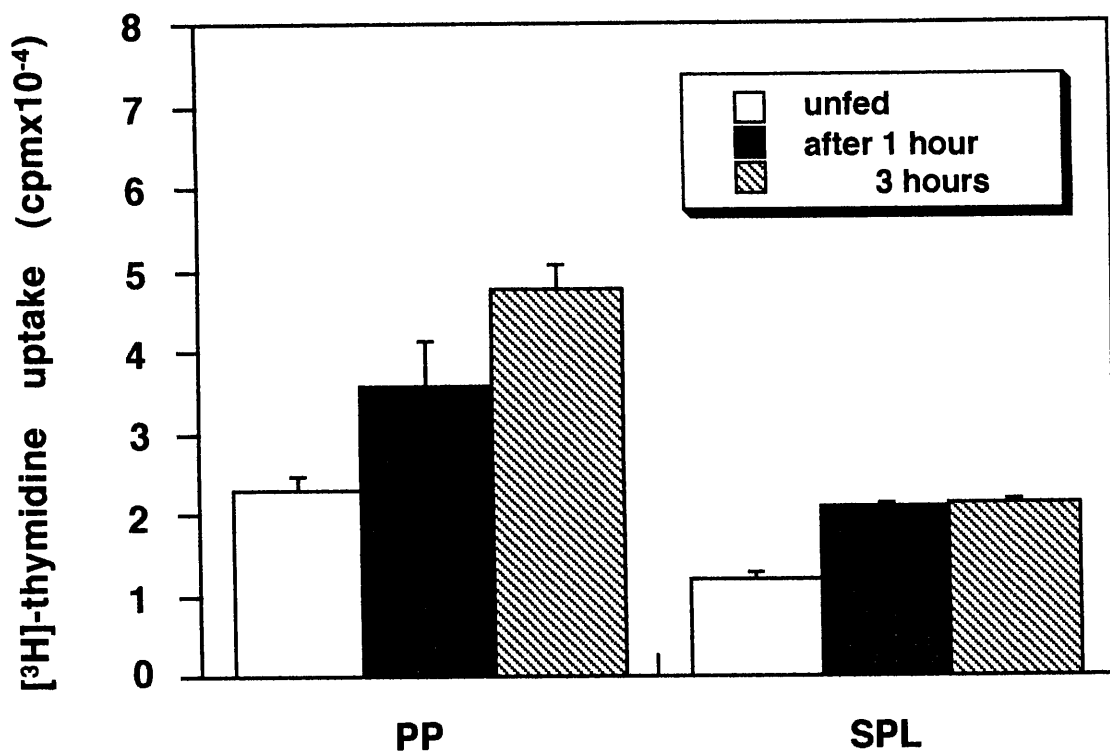


図 2-2 抗原を経口投与したマウスより調製した抗原提示細胞が誘導する T 細胞増殖応答

OVA を PBS に溶解し, BALB/c マウスに経口ゾンデで 250 mg 投与した. 投与の 1-3 時間後にパイエル板および脾臓細胞を調製し, TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と共培養した. 2 日後 T 細胞の増殖応答を $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みにより測定した.

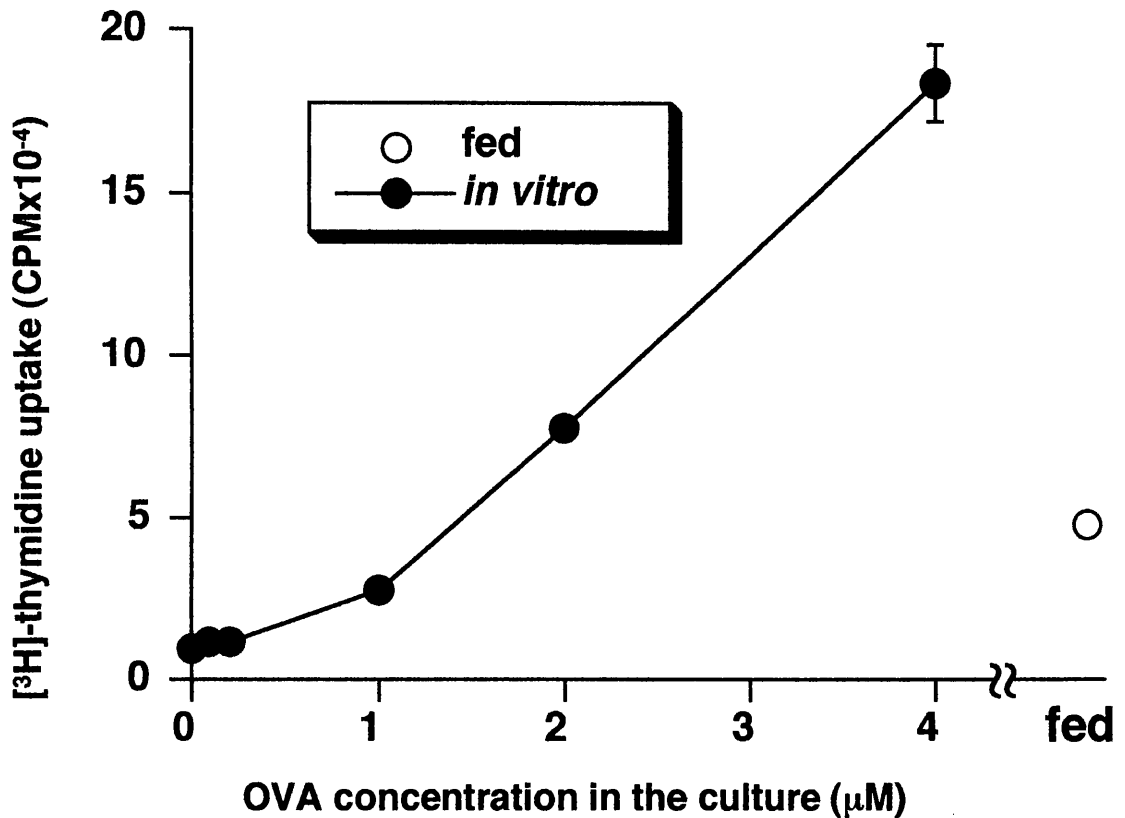


図 2-3 抗原を経口投与したマウスより調製したパイエル板細胞が誘導する T 細胞増殖応答と *in vitro* で添加された抗原に対する増殖応答の比較

OVA を PBS に溶解し, BALB/c マウスに経口ゾンデで 250 mg 投与した. 投与の 1 時間後にパイエル板細胞を調製した. 同様に未処理マウスよりパイエル板細胞を調製した. これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と共培養した. 未処理マウスのパイエル板細胞を用いる場合は抗原として OVA を図に示した濃度で添加した. 2 日後 T 細胞の増殖応答を [³H]-thymidine の取り込みにより測定した.

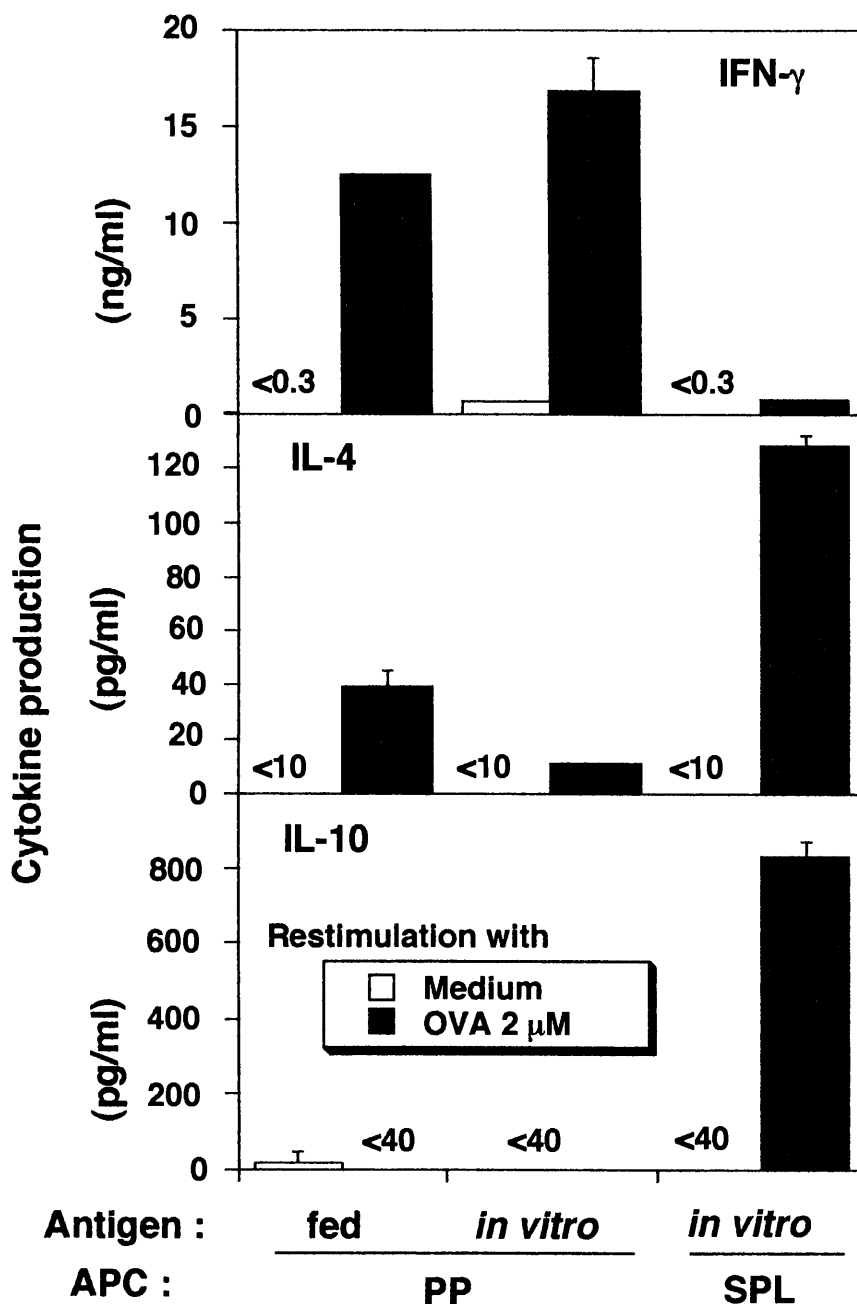


図 2-4 *in vivo* で獲得した経口投与抗原および *in vitro* で添加された抗原が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化

OVA を PBS に溶解し、BALB/c マウスに経口ゾンデで 250 mg 投与した。投与の 1 時間後にパイエル板細胞を調製した。同様に未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と共培養した。未処理マウスの細胞を用いる場合は抗原として OVA 1 μM を添加した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、抗原提示細胞と抗原で再刺激した。2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。

に用いた場合は、IL-4, IL-10 産生細胞への分化が強く誘導されたのに対し、IFN- γ の産生はほとんど認められなかった (図 2-4). これにより、経口抗原と *in vitro* で添加した抗原では T 細胞分化への違いはないものの、パイエル板細胞と脾臓細胞による抗原提示では異なった影響を持つことが示唆された.

パイエル板細胞と脾臓細胞による抗原提示では、同濃度の抗原で T 細胞を刺激した場合でも、誘導する T 細胞増殖応答は大きく異なる. そこで、一次刺激時にパイエル板および脾臓細胞が同程度の T 細胞増殖応答を誘導する抗原濃度を検討し、当該濃度における T 細胞分化の誘導を解析した. その結果、0.1 および 0.2 μM の抗原により脾臓細胞が誘導する T 細胞増殖応答はそれぞれ 0.2 および 1 μM の抗原によりパイエル板細胞が誘導する増殖応答と同程度であった (図 2-5). また、これらの抗原濃度においてもパイエル板細胞によっては Th1 型のサイトカインパターンが誘導され、一方で脾臓細胞によっては Th2 型の分化が誘導された (図 2-6). これらの結果より、パイエル板および脾臓細胞の抗原提示により誘導される T 細胞分化は明らかに異なっていることが示された.

一方で、二次刺激後の T 細胞増殖応答に関しては両群間において差がなく、パイエル板細胞による抗原提示による T 細胞の不応答化の誘導は認められなかった (図 2-7).

パイエル板非 B 細胞は抗原未感作 T 細胞の Th1 細胞への分化を強く誘導したのに対し、脾臓非 B 細胞は Th2 細胞への分化を弱く誘導した

Iwasaki と Kelsall はパイエル板より DC を分離して抗原提示能を解析している (63, 67). DC は高い抗原提示能を持ち未感作 T 細胞の活性化に重要な役割を持つと考えられているが (112), 一方でパイエル板には DC 以外にも B 細胞やマクロファージなど MHC クラス II 分子を発現する細胞が存在する. これらの細胞がパイエル板における抗原提示においてそ

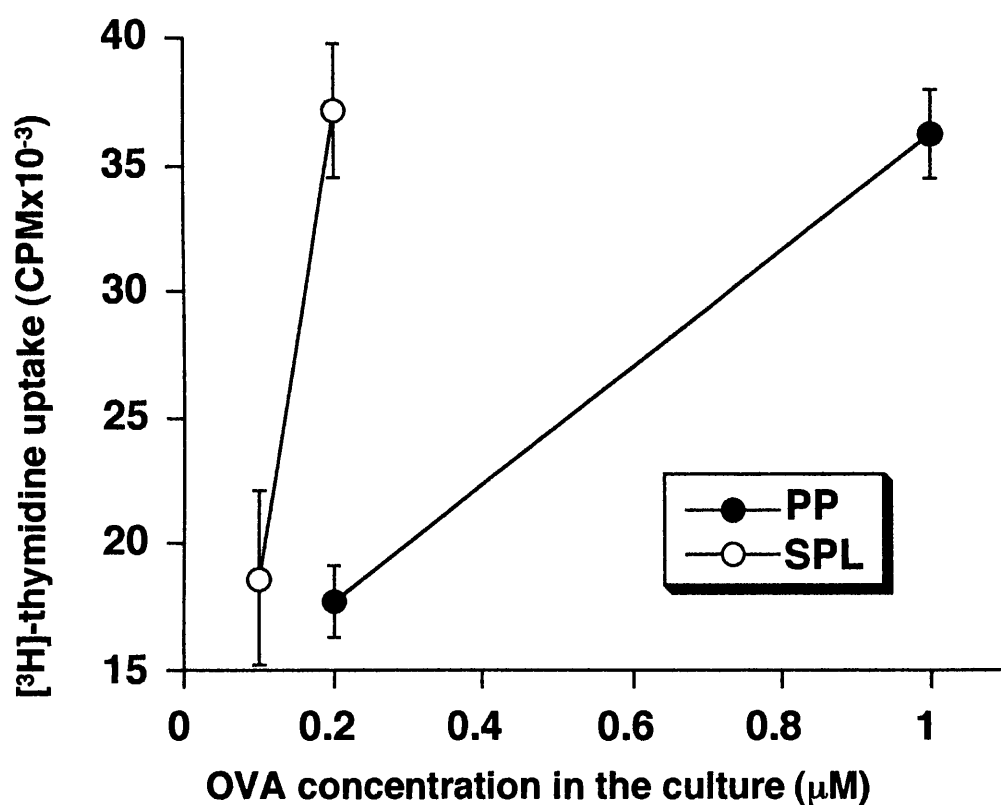


図 2-5 パイエル板および脾臓細胞が誘導する T 細胞増殖応答の比較

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で共培養した。2 日後 T 細胞の増殖応答を [3H]-thymidine の取り込みにより測定した。

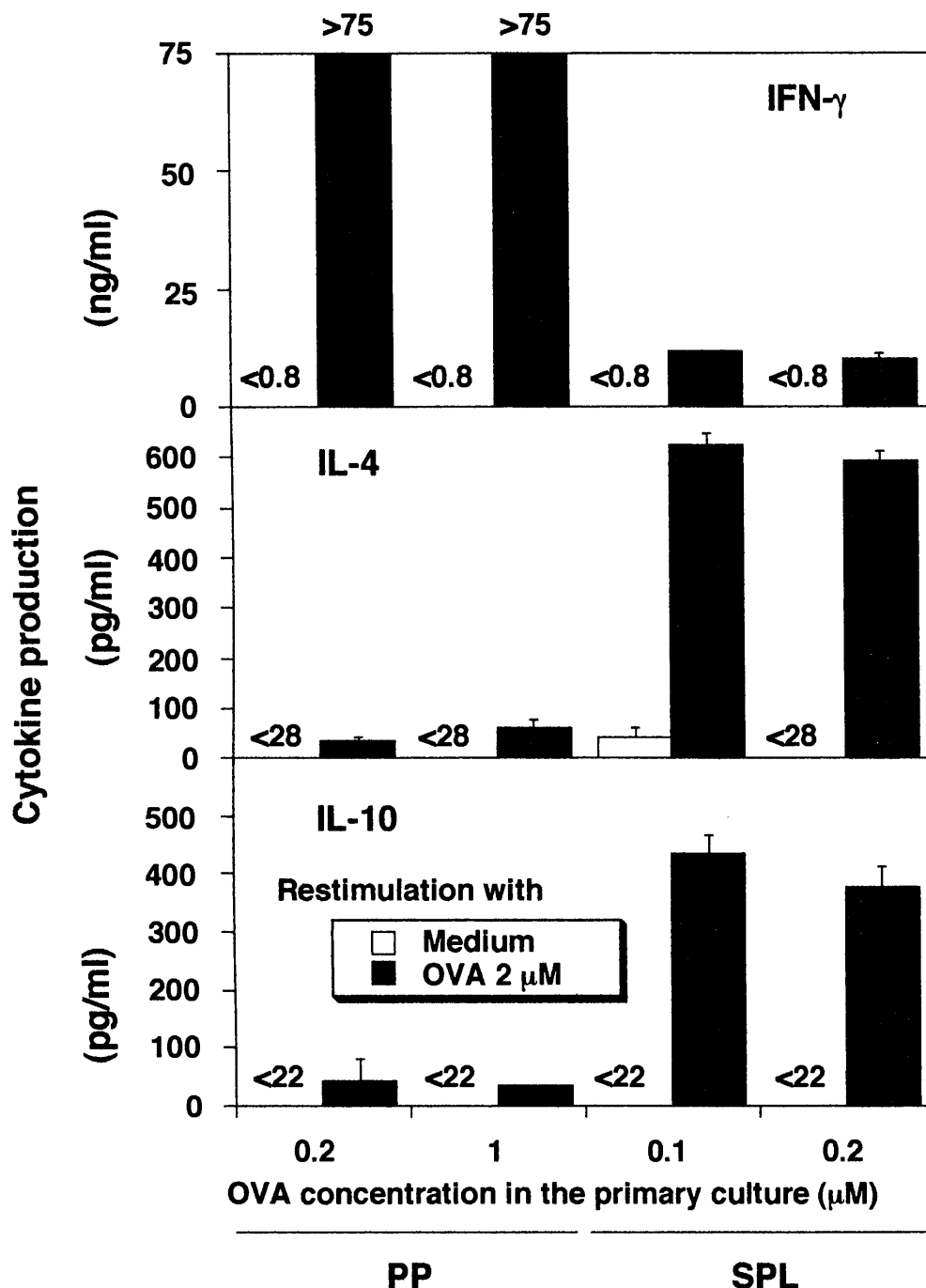


図 2-6 パイエル板および脾臓細胞が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化（サイトカイン産生）

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で共培養した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、抗原提示細胞と抗原で再刺激した。2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。

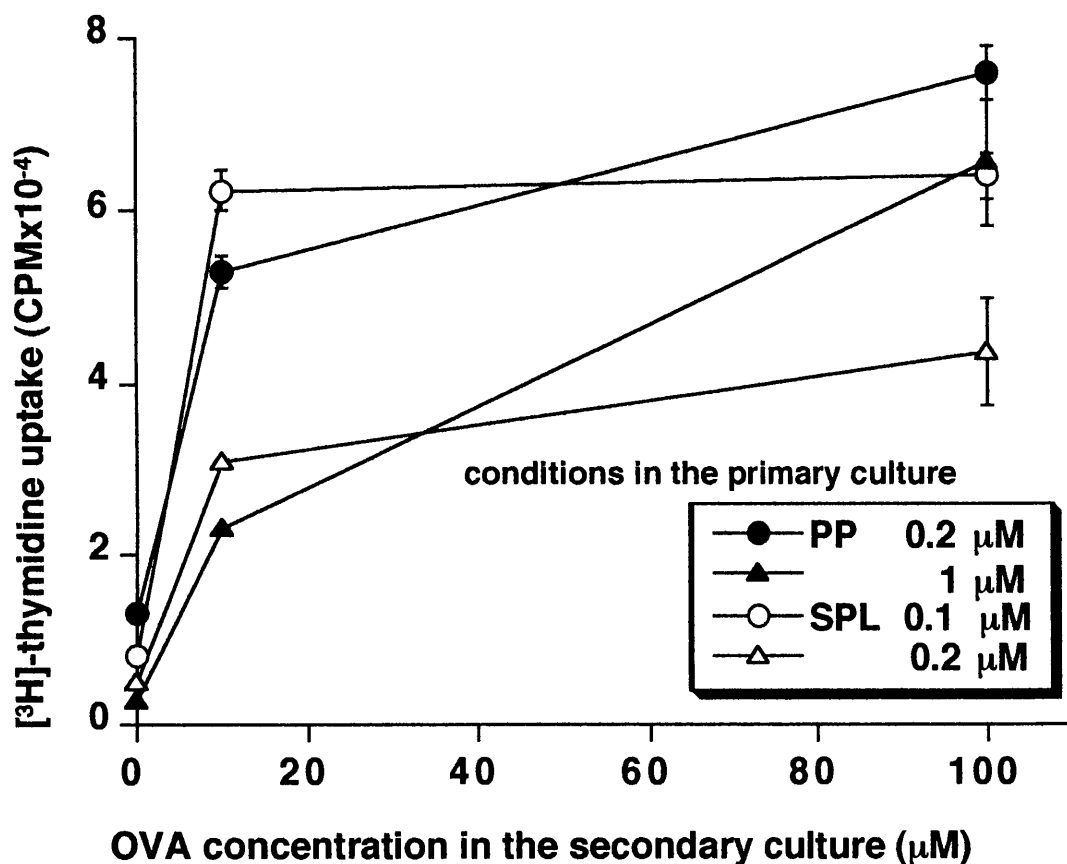


図 2-7 パイエル板および脾臓細胞が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化 (増殖応答)

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で共培養した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、抗原提示細胞と抗原で再刺激した。2 日後 T 細胞の増殖応答を [³H]-thymidine の取り込みにより測定した。

れそれぞれの様な役割を持っているか検討した．まず，パイエル板細胞を MACS ビーズを用いて B 細胞と非 B 細胞に分画した．脾臓細胞についても同様に分画し，一次刺激時にこれらの細胞を抗原提示細胞に用いて T 細胞を抗原刺激した．抗原濃度は上述の実験と同様に 1 μ M で行った．その結果，全パイエル板細胞を用いた場合と同様にパイエル板由来の非 B 細胞は Th1 細胞への分化を強く誘導した（図 2-8）．一方で，B 細胞は Th2 細胞を誘導した（図 2-8）．全脾臓細胞および脾臓由来の B 細胞は強い Th2 細胞への分化を，非 B 細胞は弱い Th2 細胞を誘導した（図 2-8）．また，非常に興味深いことにパイエル板の B 細胞と脾臓の非 B 細胞またはパイエル板の非 B 細胞と脾臓の B 細胞を混合して用いた場合にはどちらの組み合わせにおいても Th1 細胞を誘導した（図 2-8）．

高濃度の抗原によっても *in vitro* での T 細胞の不応答化は誘導されなかった

パイエル板細胞による T 細胞の不応答化の誘導が認められなかったことから，T 細胞不応答化の誘導には腸管特有な抗原提示細胞の機能ではなく，大量の抗原の侵入が重要である可能性が考えられる．実際に，経口免疫寛容以外にも抗原の静脈投与など多量の抗原の投与により免疫寛容が誘導されることが報告されている（113, 114）．そこで，次に高濃度の抗原による T 細胞の不応答化を検討した．TCR トランスジェニックマウスの脾臓細胞を *in vitro* での抗原刺激に一般的に用いられる濃度（2 μ M）および極めて高い濃度の抗原（200 μ M）とともに，または抗原非存在下で培養した．刺激の 5 日後にフローサイトメーターにより CD4⁺T 細胞の存在比を解析した結果，抗原の濃度に依存して存在比は高くなった（図 2-9）．また，1 週間培養後細胞を回収し，細胞数を揃えて，BALB/c の脾臓細胞を抗原提示細胞に用いて抗原により二次刺激を行った．二次刺激の 2 日後に増殖応答を測定した．その結果，1 週間培養後の回収率

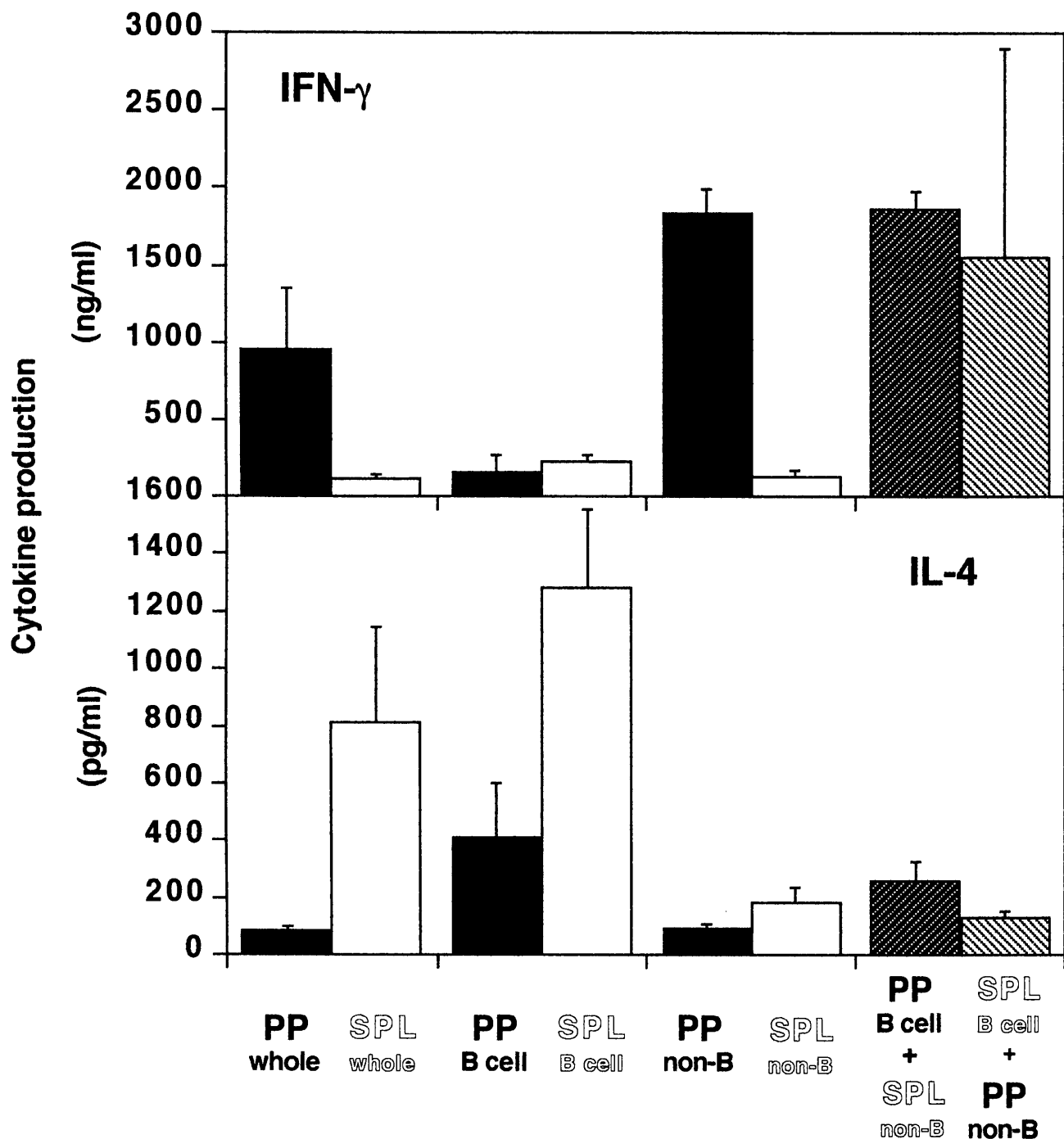


図 2-8 パイエル板および脾臓細胞より分離した B 細胞，非 B 細胞が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を採取し，MACS 法により B 細胞および非 B 細胞に分画した．これらの細胞を単独もしくは混合して TCR トランスジェニックマウス由来の脾臓未感作 T 細胞と抗原の存在下で共培養した．1 週間培養後 T 細胞を回収し，抗原提示細胞と抗原で再刺激した．2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した．

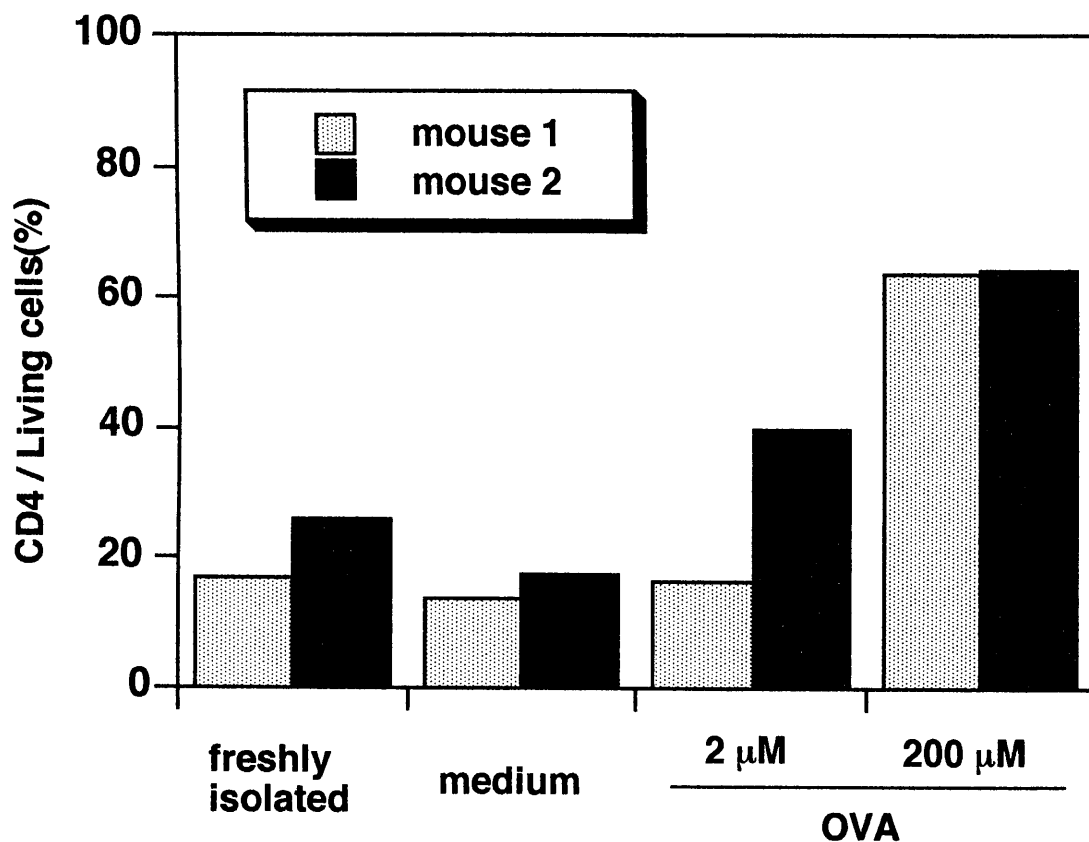


図 2-9 高濃度の抗原で刺激した脾臓細胞中の CD4⁺ T 細胞の存在比

TCR トランスジェニックマウスより脾臓細胞を調製した。得られた細胞を 2 または 200 μ M の抗原の存在下および非存在下で培養した。5 日間培養後細胞を回収し、フローサイトメーターによって CD4⁺ T 細胞の存在比を測定した。

は抗原の濃度に依存して高くなり（図 2-10）、さらに二次刺激後の増殖応答も抗原濃度に依存して強くなっていた（図 2-11）。これらの結果は、多量の抗原による刺激のみでは T 細胞に不応答化を誘導することはできないことを示している。

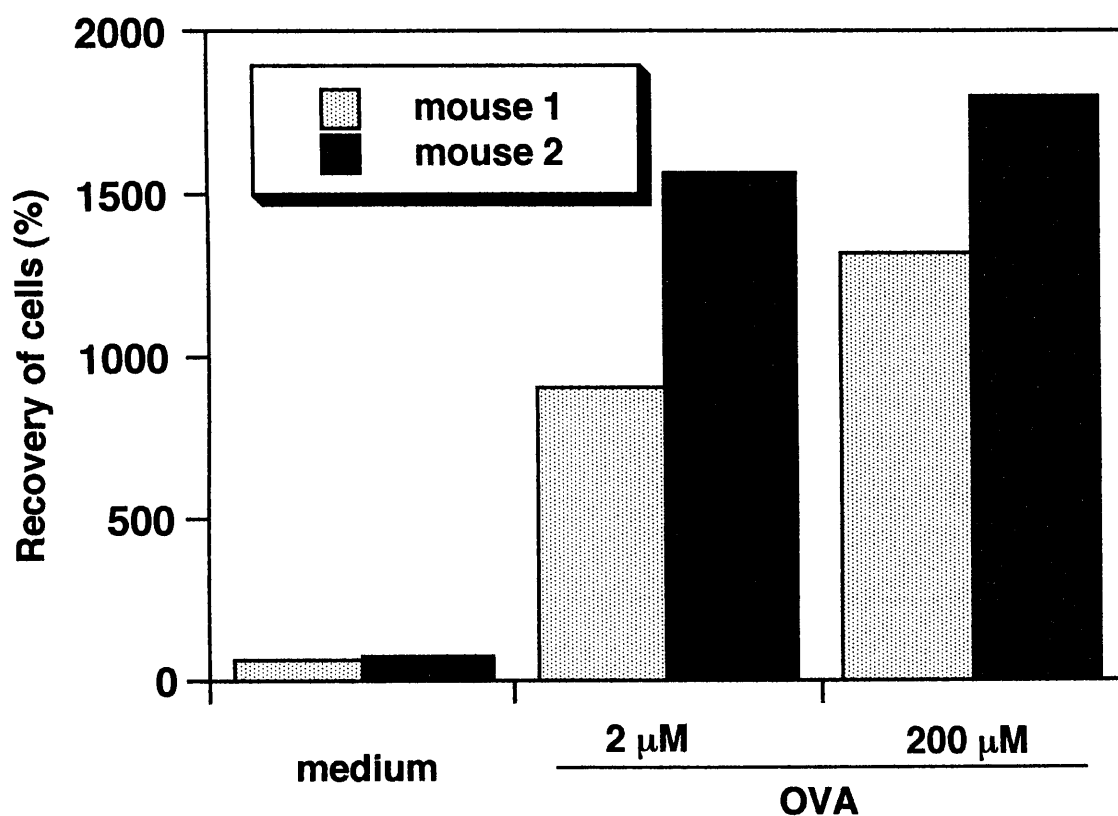


図 2-10 高濃度の抗原で刺激した脾臓細胞の培養後の細胞回収率

TCR トランスジェニックマウスより脾臓細胞を調製した。得られた細胞を 2 または 200 μM の抗原の存在下および非存在下で培養した。1 週間培養後細胞を回収し、回収された細胞数を計測した。

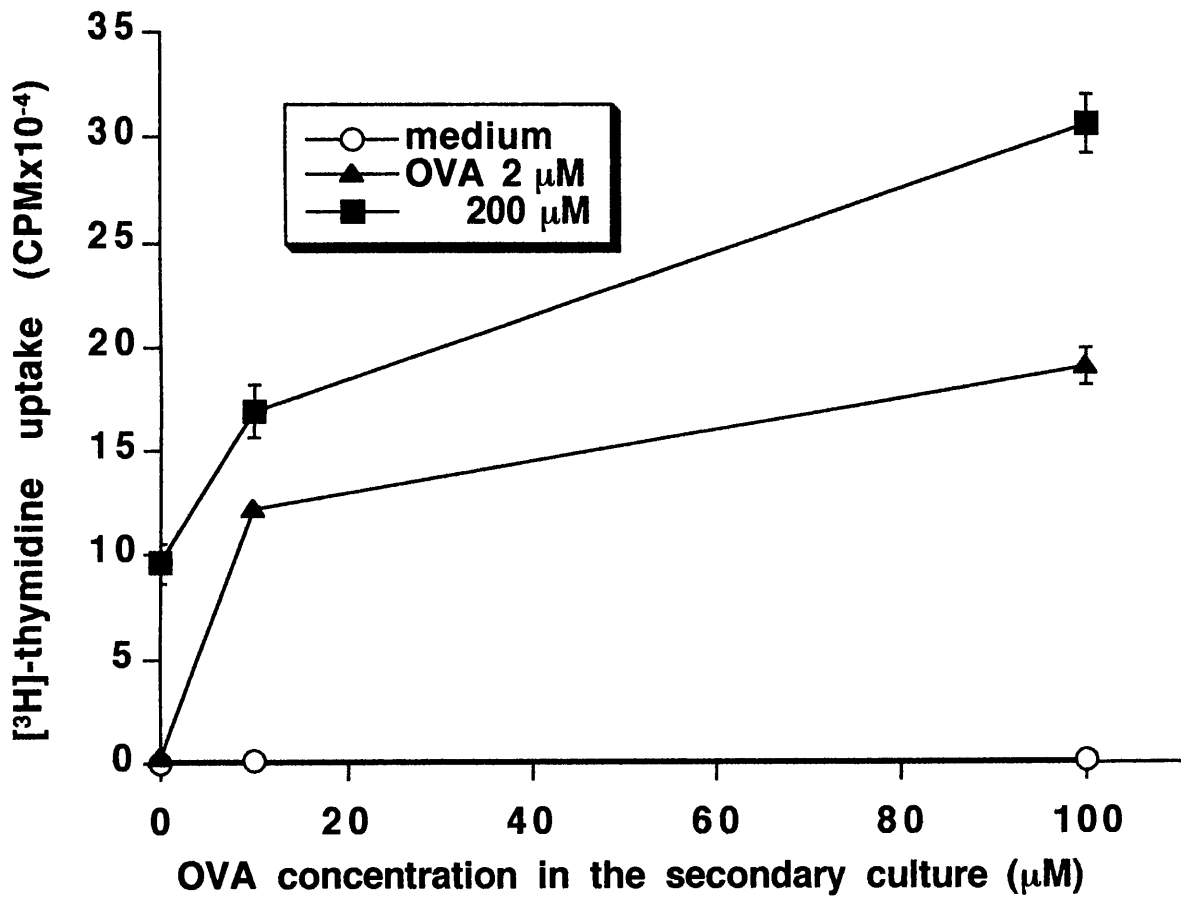


図 2-11 高濃度の抗原で刺激した脾臓細胞の二次刺激に対する増殖応答
TCR トランスジェニックマウスより脾臓細胞を調製した. 得られた細胞を 2 または 200 μM の抗原の存在下および非存在下で培養した. 1 週間培養後細胞を回収し, 抗原提示細胞および抗原によって再刺激した. 再刺激の 2 日後に [3H]-thymidine の取り込みにより増殖応答を測定した.

考察

腸管は食品や微生物など経口的に摂取した抗原に対する免疫応答の誘導部位として様々なリンパ器官を備えている。中でもパイエル板は腸内抗原と腸管免疫系の接触部位であり腸管免疫応答の誘導器官として重要な役割を果たしていると考えられている。抗原特異的な免疫応答は抗原提示細胞上に提示された抗原ペプチドを抗原特異的な T 細胞が認識することにより誘起される。T 細胞は抗原刺激を受ける条件により様々な機能を獲得して分化する (115)。特に、抗原未感作 T 細胞が初めて抗原を認識するときの条件が T 細胞分化の方向性に極めて重要な影響を与えることが知られている (116)。すなわち、経口投与された抗原に対してどのような免疫応答が誘導されるかという方向性はパイエル板における抗原提示によってその大部分が決定される可能性が高いと考えられる。そこで本章ではパイエル板における抗原提示細胞の機能を解析し、経口抗原に対する免疫応答の誘導機構を検討した。

免疫器官による経口抗原の取り込み

はじめに、パイエル板における経口抗原の取り込みについて検討した。これまで、パイエル板における抗原の取り込みに関してはさまざまな報告がされている (76, 117, 118)。しかしながら、可溶性抗原の取り込みについて経時的に、さらに他の器官も含めて同時に解析した例は少ない。本研究では食品由来の可溶性タンパク質抗原である OVA を蛍光標識し、マウスに経口投与することによってパイエル板およびその他の器官におけるタンパク質抗原の取り込みを細胞レベルで経時的に解析することに成功した。抗原の経口投与量が増加するに連れパイエル板細胞および肝臓非実質細胞の蛍光強度が増大し、これらの器官における経口抗原の取り込みや流入が確認された。また、経口抗原を取り込んだパイエル板細胞

胞によって実際に *in vitro* における T 細胞応答を誘起することが出来ることを確認した。一方で，脾臓，腸管膜リンパ節，鼠径部リンパ節においては蛍光強度に変化は認められず，これらの器官における経口抗原に対する免疫応答の誘導はそれほど活発ではないことが示唆された。しかしながら，脾臓においては経口投与抗原による T 細胞のアポトーシスの誘導や抗原特異的 T 細胞の活性化なども報告されており (119, 120)，他の部位で抗原を獲得した抗原提示細胞の移行や極微量の抗原の流入が生じている可能性が考えられる。

また，経口抗原の取り込みが活発に認められたパイエル板では，細胞種やパイエル板内の三次元的な細胞の局在に関わらずほぼ全ての細胞において抗原の取り込みまたは少なくとも細胞表面へ接触していることが明らかとなった。この結果はパイエル板内に存在する全ての抗原提示細胞上に抗原が提示されている可能性を示唆している。これまでパイエル板においてはドーム領域に存在するマクロファージや樹状細胞が M 細胞が取り込んだ腸内抗原を受け取って T 細胞に抗原提示すると考えられて来たが，少なくとも可溶性抗原を多量に摂取した場合はパイエル板内の全ての細胞の表面に抗原が接触することが明らかとなった。すなわち，経口抗原に対する免疫応答はパイエル板の様々な細胞により様々な部位で誘起されると考えられる。後に詳しく述べるが，パイエル板内には部位により異なった性質を持つ抗原提示細胞が存在していることが示されており (121, 122)，これらの細胞が実際に生体内でユニークな免疫応答を誘導している可能性が示唆された。また，これまであまり報告の無かった肝臓において抗原の取り込みが認められた。肝臓には免疫寛容誘導能を持った細胞の存在が報告されていることから，このような細胞が経口抗原に対する免疫寛容の誘導において何らかの役割を持っている可能性も考えられる。

パイエル板における抗原提示細胞の特性

さらに、パイエル板と脾臓の抗原提示細胞による T 細胞応答、特に Th1/Th2 分化誘導能を検討した結果、両者において大きな差異が認められた。この際、同程度の T 細胞増殖応答を誘導する濃度の抗原で刺激した場合、パイエル板細胞による抗原提示は *in vivo* で経口抗原を獲得した場合も *in vitro* で抗原を添加した場合も同様な応答を誘導した。このようにパイエル板においては経口抗原の取り込みと抗原提示および T 細胞応答の誘導が活発に行われていることが強く示されたので、パイエル板細胞による抗原提示は経口投与抗原に対する免疫応答の質を決定する上で重要な役割を果たしていると考えられる。パイエル板細胞を抗原提示細胞に用いた場合、IFN- γ 産生細胞すなわち Th1 細胞の強い誘導が認められたのに対し、IL-4、IL-10 などの Th2 型サイトカイン産生細胞の誘導は低レベルであった。一方で、脾臓細胞を用いた場合、IL-4 や IL-10 などのサイトカインを産生する Th2 細胞の分化が強く誘導され、IFN- γ 産生細胞の誘導はほとんど認められなかった。これらの結果は、パイエル板と脾臓では存在する抗原提示細胞の能力が異なっていることを示した過去の報告と一致している (65-68)。

しかしながら、過去の報告の多くは本研究の結果と異なりパイエル板において Th2 応答の誘導が、脾臓においては Th1 応答の誘導が顕著であることを示している (65-67)。このように異なった結果が得られた原因として、用いた細胞種の違いが考えられる。本研究においては、出来る限り生体内での応答を反映したいと考えたため、パイエル板や脾臓から得られた細胞をそれ以上分画することなく用いた。ただし、調製の過程で臓器の三次元的な構造は破壊されたことを考慮すると完全に *in vivo* の応答を再現しているとは言えない。近年パイエル板においてはドーム領域や濾胞間領域などに異なった機能を持つ DC が存在していることが報告されており、三次元構造がさまざまな T 細胞応答の誘導に重要な役

割を担っている可能性が考えられる。しかし、実際は細胞の産生するサイトカインなどは組織内に拡散し、また細胞自体も移動すると考えられるため、本実験で用いた系はパイエル板内に存在する因子をある程度は網羅し、パイエル板の環境を再構築出来ていると考えている。一方で、このような系では実際にどのような細胞が応答に関与しているかを明らかにすることは出来ない。これまでの多くの報告では、DC に着目してその抗原提示機能が研究されている (63, 65-67)。DC は強い抗原提示能を持つことが知られ、抗原未感作 T 細胞を活性化する能力に富んでいることが報告されている抗原提示細胞である。Iwasaki と Kelsall はパイエル板や脾臓よりフローサイトメーターを用いて Fresh な状態で DC を分離することに成功した (67)。得られた DC を用いた実験により、パイエル板の DC は IL-10 を産生し T 細胞の Th2 細胞への分化を誘導することを示している。また、Everson らも同様にパイエル板由来の DC による抗原提示が Th2 細胞への分化を誘導することを報告している (65, 66)。本研究で用いたのは未分画な細胞であったため、DC を単独で用いた場合とは異なった結果がえられたのかもしれない。

一方で、パイエル板には DC 以外にも B 細胞やマクロファージなど MHC クラス II 分子を発現する細胞が存在する。これらの細胞がパイエル板における抗原提示においてそれぞれどのような役割を持っているか興味深い。そこで本研究ではパイエル板や脾臓から B 細胞やその他の細胞を分画し、それらを様々な組み合わせで用いて実験を行った。その結果、未分画パイエル板細胞を用いた場合と同様にパイエル板由来の非 B 細胞は Th1 細胞の分化を強く誘導した。一方で、B 細胞は Th2 細胞を誘導した。未分画脾臓細胞および脾臓由来の B 細胞は強く Th2 細胞の分化を誘導し、非 B 細胞は Th2 細胞を弱く誘導した。また、パイエル板の B 細胞と脾臓の非 B 細胞またはパイエル板の非 B 細胞と脾臓の B 細胞を混合して用いた場合にはどちらの組み合わせにおいても Th1 細胞を誘導

した。この結果は、単独で用いた場合には Th1 細胞の分化を誘導しない性質を持つ抗原提示細胞同士（パイエル板の B 細胞と脾臓の非 B 細胞）でも、混合することによって Th1 細胞を誘導できることを示している。すなわち、様々な細胞を組み合わせる用いることにより、個々の細胞とは異なった抗原提示能を発揮することを示している。これは共存するサイトカインなどの液性因子や補助刺激分子により相互に影響を与えあっている為に、個々の細胞の持つ抗原提示能とは異なった機能が現れるものと考えられる。しかしながらこれらの実験においてもこれまでの報告と異なり、本研究においてはパイエル板由来の非 B 細胞画分（DC が含まれる）では Th2 細胞の誘導は認められなかった。

このような差異は用いているマウスの系統に起因する可能性が考えられる。本研究で用いたマウスは抗原として OVA の 323-339 残基に当たるペプチドを I-A^d 拘束的に認識する TCR トランスジェニックマウスであり、これまでの多くの報告で用いられているマウス(DO11.10)と同様である。しかしながら、実際に用いられている TCR の遺伝子は異なった T 細胞クローンから得られたものであり、厳密には異なっている。また、これまでの研究で OVA の 323-339 のペプチド中には T 細胞エピートとなりうる部位が少なくとも 3 カ所含まれていることが明らかになっており (123)、これら 2 系統のマウスにおいて異なった部位を認識している可能性も否定できない。すなわち、用いる T 細胞によって Th1 細胞および Th2 細胞への分化が異なって誘導される可能性がある。さらに、抗原刺激の条件によっても異なった応答が誘導される可能性がある。本研究においては抗原としてインタクトなタンパク質を用いているが、Iwasaki と Kelsall は合成ペプチドを抗原として用いている。タンパク質は抗原提示細胞内に取り込まれると、プロテアーゼにより消化を受け抗原ペプチドにプロセッシングされた後に MHC クラス II 分子と結合し細胞表面に提示されるのに対し、ペプチド抗原はプロセッシングを受けない。

ことなく MHC 分子上に結合する。プロセッシングに用いられる酵素やタンパク質の消化部位などによって、生成されるペプチドが異なりそれによって異なった応答が誘導されることが知られており (124), 本研究でタンパク質を抗原として用いたことが以前の研究の結果との差異として現れたのかもしれない。実際に佐藤らはパイエル板から精製した DC を用いて OVA23-3 マウスの T 細胞を OVA タンパク質で抗原刺激した場合, 脾臓細胞由来の DC と比較して一次応答における IFN- γ 産生およびその後の Th1 細胞への分化を優位に誘導することを報告している (125, 126)。また, 用いた抗原の濃度によっても異なった応答が誘導される事が知られており, タンパク質とペプチドでは厳密に抗原濃度を比較することは出来ないが, 用いた抗原の濃度の違いが異なった応答が誘導された原因の一つである可能性も考えられる。本研究で用いた抗原濃度は 250 mg の抗原を経口投与したマウスから調製したパイエル板細胞によって誘起される T 細胞増殖応答と同等な応答を誘導する濃度であるため, 実際に生体内で抗原の摂取により日常的に起こりうる応答であると考えられる。抗原濃度とパイエル板細胞による抗原提示の関係は第三章において詳しく検討している。

パイエル板の抗原提示細胞が誘導する免疫応答の意義

本研究で述べてきたようにパイエル板は経口抗原の誘導部位として重要な役割を担っていると考えられる。抗原提示細胞の T 細胞分化誘導能も脾臓とは異なっていた。パイエル板細胞の抗原提示において Th1 細胞の誘導が認められたことは, パイエル板における免疫応答の様々な機能との関連が考えられるが, 最も良く知られている腸管免疫応答である IgA 抗体の産生とも深く関与していることが推測される。IgA 抗体は TGF- β や IL-5 などのサイトカインによって誘導される抗体であるが (28-30), その腸管への分泌には腸管上皮細胞から産生される分泌成分と

いうタンパク質と複合体を形成することが必要であることが知られている。Th1 細胞の産生する IFN- γ は腸管上皮細胞に作用して分泌成分の産生を促進する働きを持つため、分泌型 IgA の産生に貢献しているものと考えられる (127)。

橋口らの研究により、パイエル板の T 細胞もまた脾臓 T 細胞と異なり特有の性質を持っていることが明らかとなっている (109)。橋口らの報告によると Th1 応答の誘導条件（抗 IL-4 抗体および IL-12 存在下）での培養後も IL-5 の産生が維持される一方で IL-4 の産生は低下することが示されている。IL-5 は IgA 産生の誘導に関与している可能性があり、本研究で報告したパイエル板の抗原提示細胞の持つ Th1 応答の誘導活性と併せて考えると、パイエル板細胞による抗原提示はパイエル板において IgA を産生しやすい環境を作り出すために重要な役割を持っている可能性が示唆された。

また、腸管は食物抗原と共に病原性のある微生物やウィルスなどの感染にも常にさらされており、これらの排除に有効な T 細胞免疫応答の活性化にも IFN- γ が必要であることから、パイエル板で誘導された Th1 細胞は感染防御にも重要な役割を果たしているものと考えられる。さらに、パイエル板には大量の食物抗原が取り込まれるため過剰な Th2 応答は IgE の産生を誘導し、食品アレルギーの発症の引き金となる危険性を持つ。パイエル板細胞の持つ Th1 細胞誘導能は食品アレルギーの発症を防ぐためにも重要なメカニズムであると考えられる。第一章に示したように、本研究では実際に抗原を経口投与したマウスのパイエル板に Th1 型の細胞が誘導されることを明らかにしている。

抗原提示と経口免疫寛容

経口投与抗原の誘導する免疫応答として経口免疫寛容が知られている (1-3)。パイエル板は経口抗原の取り込みおよび免疫応答の誘導部位とし

て大きな役割を占めていることから、経口免疫寛容の誘導部位としての働きも備えている可能性が考えられる。経口免疫寛容は経口投与された抗原に特異的な T 細胞に対して不応答化や細胞死によるクローン排除が誘導されることにより成立する (11, 13, 128)。これらの T 細胞寛容は抗原特異的に誘導される応答であることから、その誘導には抗原提示細胞による抗原提示の過程が重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、本研究の結果からはパイエル板細胞による抗原提示では T 細胞の不応答化などの免疫寛容の誘導は認められなかった。また、T 細胞の不応答化や排除は食物摂取などによる多量の抗原による強い刺激によって誘導されるという可能性も考えられたが、本研究の結果からは生体内の条件と比較して過剰な濃度の抗原を用いた場合でも T 細胞の不応答化の誘導は認められなかった。さらに、第一章に示したように、本研究では少量の抗原の経口投与によって T 細胞の活性化に引き続き、寛容の誘導が認められた。この結果はやはり、経口免疫寛容の誘導には単なる抗原の量だけでなく、T 細胞に寛容を誘導する何らかのメカニズムが存在していることを示唆している。また、先述のように経口投与抗原を *in vivo* で捕捉したパイエル板細胞においても、T 細胞の不応答化は誘導されなかった。消化等による抗原性の変化が寛容を誘導するという仮説 (129-132) も、本研究においては成立しなかった。

このように、本研究ではパイエル板細胞によっては T 細胞の不応答化は誘導されなかった。先に述べた蛍光標識タンパク質を用いた実験からパイエル板と同様に肝臓においても強い抗原の取り込みが認められている。肝臓には免疫抑制作用のある細胞の存在を示唆する報告もあり (133, 134)、経口免疫寛容の誘導に肝臓における抗原提示や T 細胞の活性化がなんらかの役割を果たしている可能性も考えられる。一方で、本実験系では再現できなかった組織の立体構造などの生体内の特有の環境が寛容誘導に重要である可能性もある。経口免疫寛容の誘導部位や誘導に関わ

る細胞に関しては食品アレルギーの治療や予防とも密接に関わってくるため、今後の研究課題として非常に興味深い。

第二章の結果をまとめると、パイエル板では経口投与抗原の積極的な取り込みが行われ、脾臓細胞とは異なった特有な抗原提示細胞による抗原提示及びT細胞応答の誘導が行われていることが示唆された。その際、抗原提示細胞の細胞種によって異なったT細胞分化が誘導され、さらに他の細胞種と共存することによって個々の細胞の持つ抗原提示能とは全く異なった抗原提示能を発揮することが明らかとなった。また、腸管免疫応答の一つの大きな特徴である経口免疫寛容の誘導に関しては、パイエル板および脾臓のいずれの細胞を抗原提示細胞に用いた場合でも *in vitro* で再現することは出来なかった。これは寛容の誘導には単なる細胞同士の相互作用ではなく、他の未知なる要素が必要である可能性があり、またパイエル板や脾臓以外の器官、例えば本研究で経口投与抗原の取り込みが多く認められた肝臓などに存在する細胞が重要な役割を担っている可能性も考えられた。

本研究においてパイエル板細胞が誘導した Th1 型の応答は細胞性免疫の活性化や IgA 分泌の亢進などの腸管特有な免疫応答の誘導に関与していると考えられる。

第三章

パイエル板の抗原提示細胞は抗原濃度に依存して全身免疫系の抗原提示細胞とは異なった T 細胞分化を誘導する

序

抗原量はさまざまな免疫応答に影響を与えることが知られている (12, 70-73). なかでも T 細胞の分化に与える影響は古くから検討されてきた (72, 73). TCR トランスジェニックマウス由来の未感作 T 細胞を用いて行われたこれまでの多くの報告により, 低濃度の抗原刺激によっては Th2 細胞への分化が, 高濃度の抗原刺激によっては Th1 細胞への分化が誘導されることが示唆されているものの (70, 73), 別の報告ではさらに高濃度条件においては再び Th2 細胞に分化することが示されている (72). このように, 抗原量の違いが分化に与える影響のメカニズムやその容量依存性に関しては未だに明らかな解明はなされていない. また, *in vivo* においても抗原量が T 細胞の Th1/Th2 分化に影響を与えることが報告されている (71, 135).

従来, このような Th1/Th2 の分化は TCR から伝わる刺激の強さによって細胞内のシグナル伝達が変化する為であり, 用いる抗原提示細胞によってあまり影響を受けないと考えられていた. このような現象は抗原にアナログペプチドを用いた場合にも観察され, 用いるペプチドによって Th1/Th2 の分化が影響を受けることが知られている (136, 137). さらに, アナログペプチドによる刺激によっては CD3 のリン酸化など細胞内シグナルがアゴニストで刺激した場合とは異なっていることも報告されている (138-140). 一方で, 最近になって Rogers と Croft および Ruedl らの報告により, 抗原濃度による Th1/Th2 分化誘導の制御において抗原提示細胞側から伝えられるサイトカインや細胞表面分子による副刺激が重要な役割を果たしていることが示された (74, 75).

第二章の結果より, パイエル板と脾臓という異なった部位から調製した抗原提示細胞を用いた場合, その抗原提示能が異なっていることが明らかとなった. このような差異は, これらの抗原提示細胞の発現するサ

イトカインや細胞表面分子の種類や量が異なっていることにより生じると考えられる。これらの異なった機能を持つ抗原提示細胞は抗原濃度による T 細胞分化の制御において異なった働きを持つ可能性が考えられた。第一章で示された抗原量の変化による Th1/Th2 応答の制御機構にも、パイエル板に存在する抗原提示細胞の持つ固有の機能が関与している可能性がある。そこで、本章では脾臓およびパイエル板由来の抗原提示細胞による抗原濃度依存的な Th1/Th2 分化の誘導と応答の制御に関わる分子を解析し、これらの抗原提示細胞の機能の差異を検討した。

材料と方法

マウス

第二章と同様に BALB/c および OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスを用いた。

抗原

第二章に記した OVA を用いた。

抗体

FITC 標識抗マウス CD3 抗体 (145-2C11) は Phirmingen より購入した。抗マウス CD80 (RM80 (141)) および CD86 (PO3 (141)) 抗体は順天堂大学医学部八木田秀雄博士，奥村康博士より供与していただいたハイブリドーマより，マウス腹水から当研究室においてプロテイン G カラム (MAb Trap GII, Amarcham Pharmacia Biotech) を用いて精製したものを用いるか，または抗 CD80 (16-10A1) および CD86 (PO3.1) 抗体を eBioscience (San Diego, CA, U.S.A.) より購入して用いた。ビオチン化抗マウス CD80 (RM80) および CD86 (PO3) 抗体は順天堂大学より供与していただいたものを用いるか，または抗 CD80 (16-10A1) および CD86 (PO3) 抗体を Phirmingen より購入して用いた。抗マウス IL-12 抗体 (C17.8) は Genzyme から購入した。

細胞培養

第二章に記したのと同様な方法で T 細胞の分化を誘導した。その際，培養中に抗原を 0.01-100 μ M の濃度で添加した。第二章と同様に二次刺激を行い，二次刺激の 2 日後に上清を回収して上清中のサイトカイン量を ELISA 法により測定した。

また実験によっては抗 IL-12, CD80 または CD86 抗体を一次培養中に 10 µg/ml の濃度で添加した. 図 3-3 の実験においては一次培養開始 2 日後の上清中の IL-12 産生量を測定した.

サイトカイン産生量の測定

第二章に記したのと同様な方法で行った. ただし, これに加え IL-12 (p40) の測定には一次抗体としてラット抗マウス IL-12 抗体 (C15.6, PharMingen), 二次抗体としてビオチン化ラット抗マウス IL-12 抗体 (C17.8, PharMingen) を用いた.

フローサイトメトリー

一次培養開始 24 時間後に, 細胞を回収しビオチン化抗 CD80 または CD86 抗体で標識した. 洗浄後 FITC 標識抗 CD3 抗体およびストレプトアビジン標識 Red670 (Gibco BRL) で染色し, フローサイトメトリーにより抗原提示細胞 (非 CD3 画分) 上に発現する CD80 および CD86 の発現量を解析した.

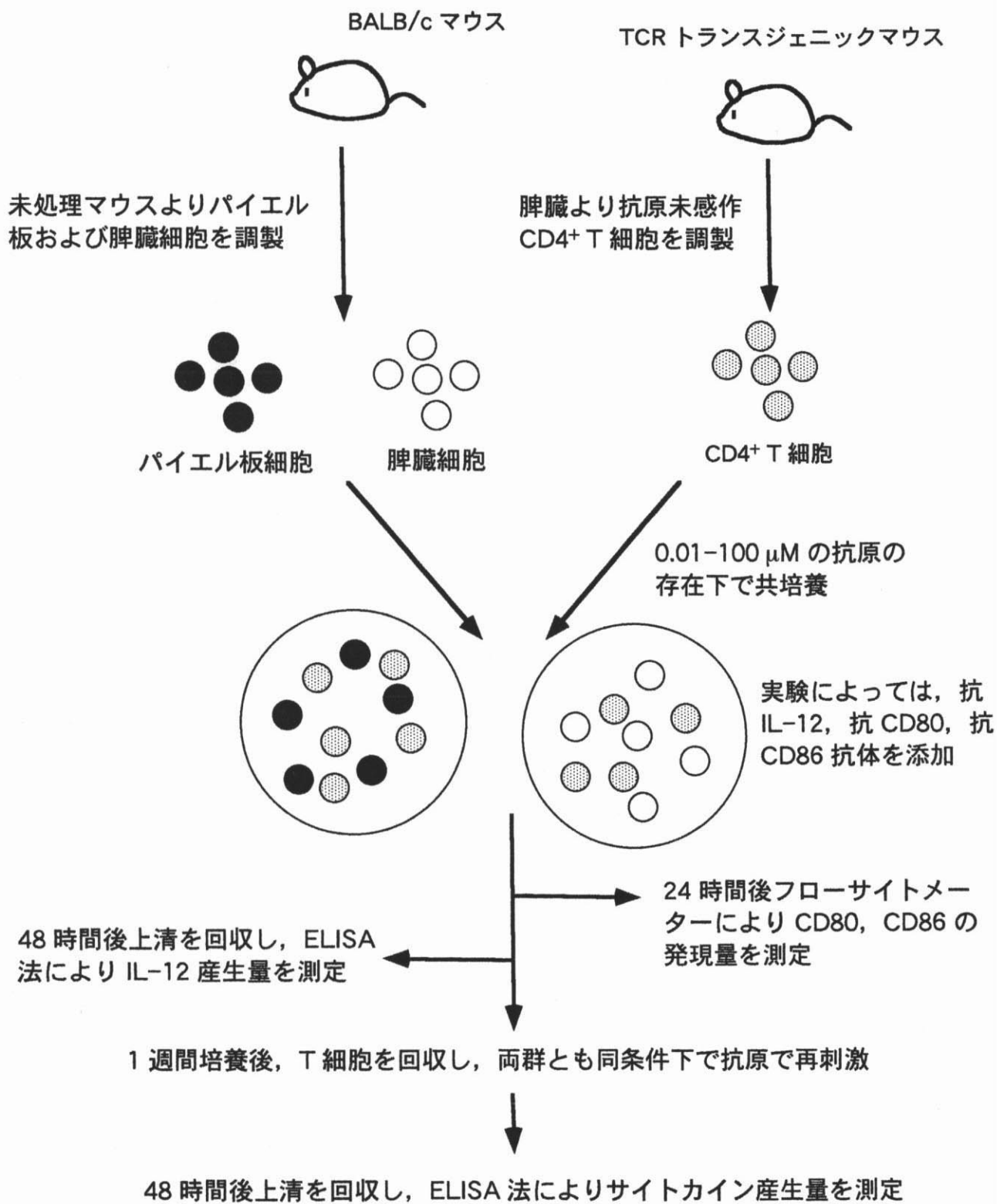


図 3-i パイエル板および脾臓細胞の抗原提示による抗原濃度依存的な T 細胞分化誘導能の評価方法

結果

パイエル板および脾臓細胞による抗原提示は抗原濃度によって異なった T 細胞分化を誘導した。また、その抗原濃度依存性はパイエル板細胞と脾臓細胞では異なっていた

第二章で示したようにパイエル板細胞と脾臓細胞では異なった T 細胞分化を誘導することが明らかとなった。以前より、抗原提示の際の抗原濃度が T 細胞分化に重要な役割を持つことが知られていたが (70, 72, 73), 近年 Rogers と Croft の報告によりこのような抗原濃度依存的な T 細胞分化の誘導に抗原提示細胞の機能が関与していることが明らかとなった (74)。これは、パイエル板と脾臓など異なった機能を持つ抗原提示細胞が存在する器官では、誘導される免疫応答が異なった抗原濃度依存性を示す可能性を示唆している。

そこで本章では、パイエル板および脾臓の細胞を抗原提示細胞に用い、様々な濃度の抗原で刺激することによって T 細胞に誘導される分化とその誘導機構を解析した。未処理 BALB/c マウスより調製したパイエル板および脾臓細胞を TCR トランスジェニックマウス由来未感作 CD4⁺ T 細胞とともに培養した。その際、0.01-100 μ M の OVA を培養中に添加した。1 週間後細胞を回収し、第二章で述べたように二次刺激を行い、さらに 2 日後の培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。その結果、低濃度 (0.01-1 μ M) および高濃度 (100 μ M) の抗原刺激によっては脾臓細胞による抗原提示と比較してパイエル板細胞による抗原提示の方が Th1 細胞への分化を優位に誘導した (図 3-1)。一方、10 μ M の抗原濃度においてはパイエル板細胞の方が Th2 細胞への分化を強く誘導した。

また、パイエル板細胞と 100 μ M の抗原によって誘導される IFN- γ 産生は脾臓細胞によって 0.01-100 μ M のいずれの濃度において誘導される IFN- γ 産生よりも高く、逆に脾臓細胞と 1 μ M の抗原によって誘導され

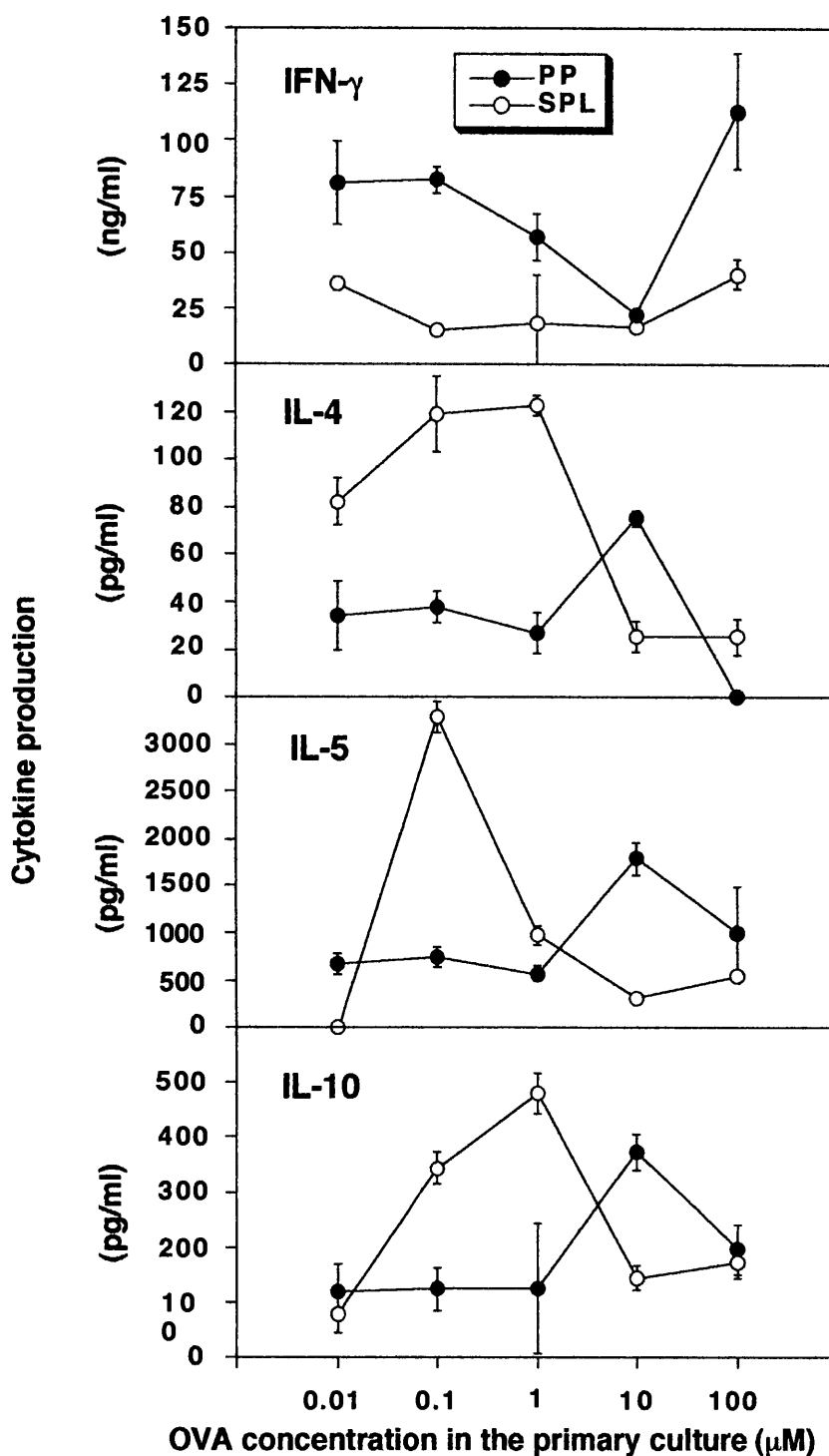


図 3-1 様々な濃度の抗原での刺激によりパイエル板および脾臓の抗原提示細胞が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で培養した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、抗原提示細胞および 2 μ M の抗原で再刺激した。2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。

る IL-4 産生はパイエル板細胞によっていずれの濃度において誘導される IL-4 産生よりも高かった。すなわち、パイエル板および脾臓細胞によって誘導される Th1/Th2 分化は単にその抗原濃度依存性がシフトしているだけではないことが示された。

この結果は、Rogers と Croft が示したように抗原濃度依存的な T 細胞分化には抗原提示細胞の機能が重要な役割をはたしており、抗原濃度依存的な T 細胞分化の誘導においてパイエル板の抗原提示細胞は脾臓とは異なった固有の機能を持っていることを示している。

IL-12 は抗原濃度依存的な Th1 細胞への分化の誘導には必須であったが、Th2 細胞の分化における抗原濃度依存性には関与していなかった

上記で示されたパイエル板および脾臓細胞による抗原濃度依存的な T 細胞分化の誘導機構を解析した。まず、強力な Th1 細胞の分化誘導因子である IL-12 の役割について検討した。図 3-1 と同様な実験系において、一次刺激時に培養中に抗 IL-12 抗体を添加し、T 細胞分化誘導時における IL-12 の働きを阻害した。その結果、抗 IL-12 抗体の添加によってパイエル板および脾臓細胞による Th1 細胞への分化の誘導がいずれもすべての抗原濃度において阻害された（図 3-2）。一方、抗 IL-12 抗体の添加により Th2 細胞への分化の誘導は促進されたものの、その抗原濃度依存性には影響を与えなかった。また、IL-5 産生細胞に関しては他の Th2 サイトカイン産生細胞と異なり、抗 IL-12 抗体の添加によりパイエル板と脾臓細胞に対して異なった影響を与えた（図 3-2、後述）。

これらの結果は IL-12 は抗原濃度依存的な Th1 細胞の分化に必須であるものの、Th2 細胞の分化の抗原濃度依存的な誘導には関与していないことを示している。実際に、パイエル板および脾臓細胞によって培養上清中に分泌される IL-12 量と抗原濃度依存的に誘導される Th1/Th2 分化との相関関係は認められなかった（図 3-3）。パイエル板および脾臓細胞

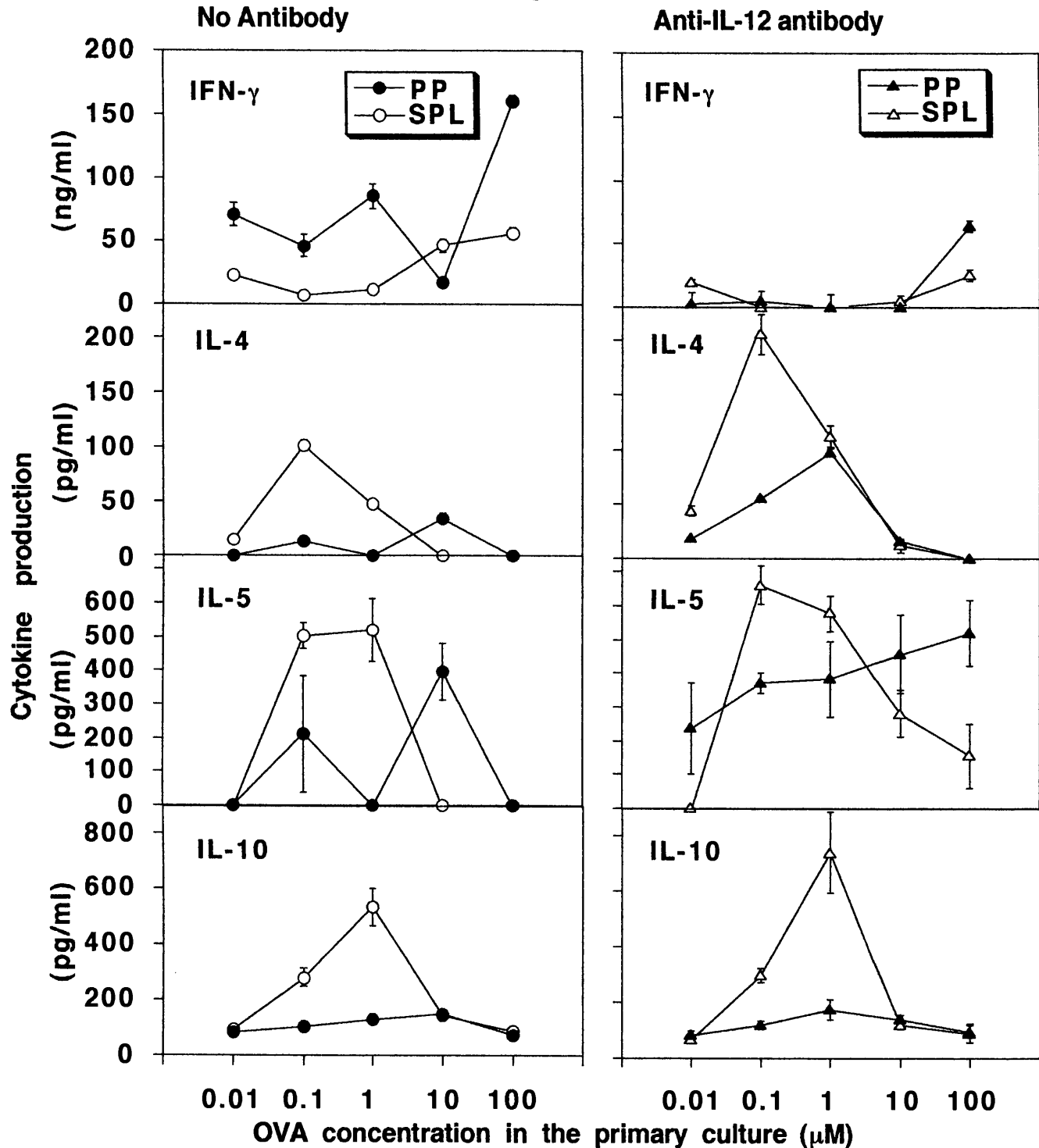


図 3-2 様々な濃度の抗原での刺激によりパイエル板および脾臓の抗原提示細胞が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化における IL-12 の役割

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で抗 IL-12 抗体を添加して培養した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、図 3-1 と同様に再刺激した。2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。

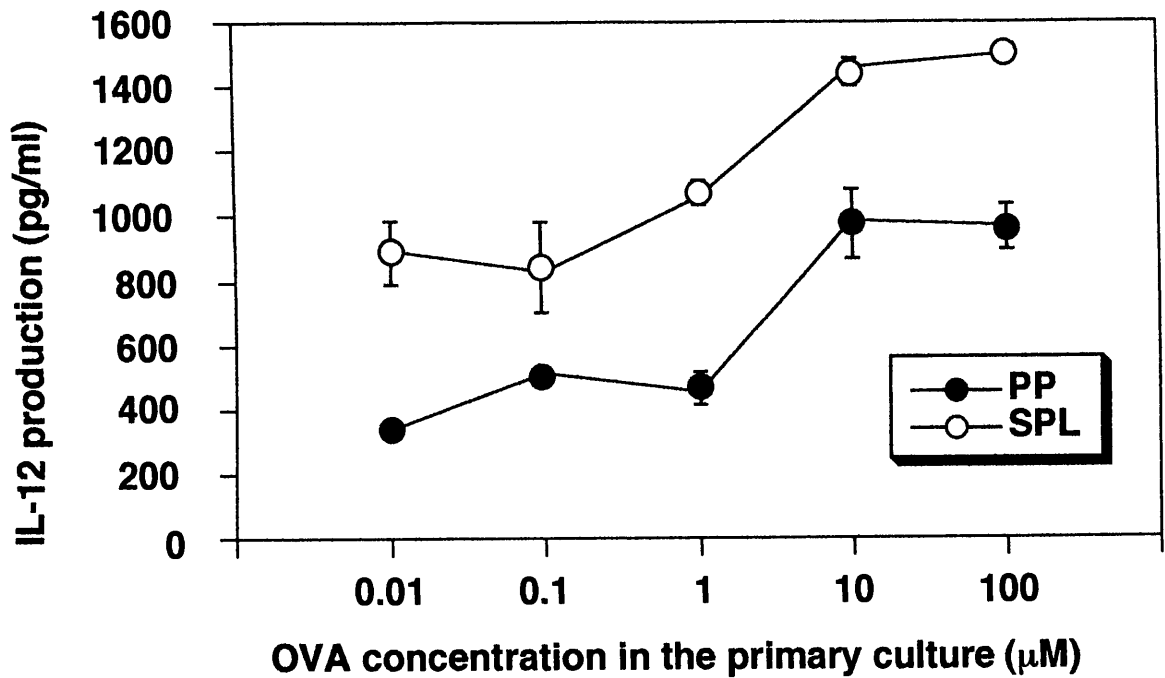


図 3-3 様々な濃度の抗原での刺激によりパイエル板および脾臓細胞が産生する IL-12

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で培養した。3 日後 培養上清中の IL-12 産生量を ELISA 法により測定した。

はいずれも抗原濃度に依存した IL-12 産生を示し、その産生量はすべての抗原濃度においてパイエル板細胞よりも脾臓細胞の方が多かった。

非常に興味深いことに、先述のように脾臓細胞によって誘導される IL-5 産生細胞の分化における抗原濃度依存性は抗 IL-12 抗体によってもほとんど影響を受けなかったのに対し、パイエル板細胞によって誘導される IL-5 産生細胞への分化は抗 IL-12 抗体の存在下では抗原濃度に依存して一次元的に誘導された (図 3-2)。これは IL-5 産生細胞の分化は他の Th2 型サイトカインとは異なった制御を受けていることを示している。

CD86 は Th2 細胞への分化を促進したが、抗原濃度依存的な Th2 細胞への分化の誘導に必須ではなかった

次に、T 細胞の活性化や分化に大きな影響を持つ共刺激分子である CD80 および CD86 について検討した。前述の実験と同様な系を用いて、一次培養中に抗 CD80 または CD86 抗体を添加して、CD80 または CD86 の機能を阻害した。その結果、CD80 の阻害によってはパイエル板および脾臓細胞のいずれの抗原提示によって誘導される T 細胞分化にもほとんど影響を与えなかった (図 3-4)。一方で、CD86 を阻害することによって、パイエル板および脾臓細胞によって誘導される Th1 細胞への分化における抗原濃度依存性がいずれも認められなくなった (図 3-5)。IFN- γ 産生細胞の誘導はすべての抗原濃度において高く維持され、パイエル板および脾臓細胞による誘導に差異が認められなくなった。また、抗 CD86 抗体の存在下ではパイエル板および脾臓細胞によって誘導される Th2 細胞の分化は低下していたものの、脾臓細胞によって誘導される IL-4、IL-5 および IL-10 産生細胞の分化における抗原濃度依存性は抗 CD86 抗体非存在下と変化していなかった。しかしながら、パイエル板細胞の誘導する Th2 型サイトカイン産生細胞への分化はいずれのサイトカインにおいても認められなかったことから、抗 CD86 抗体により完全に阻害さ

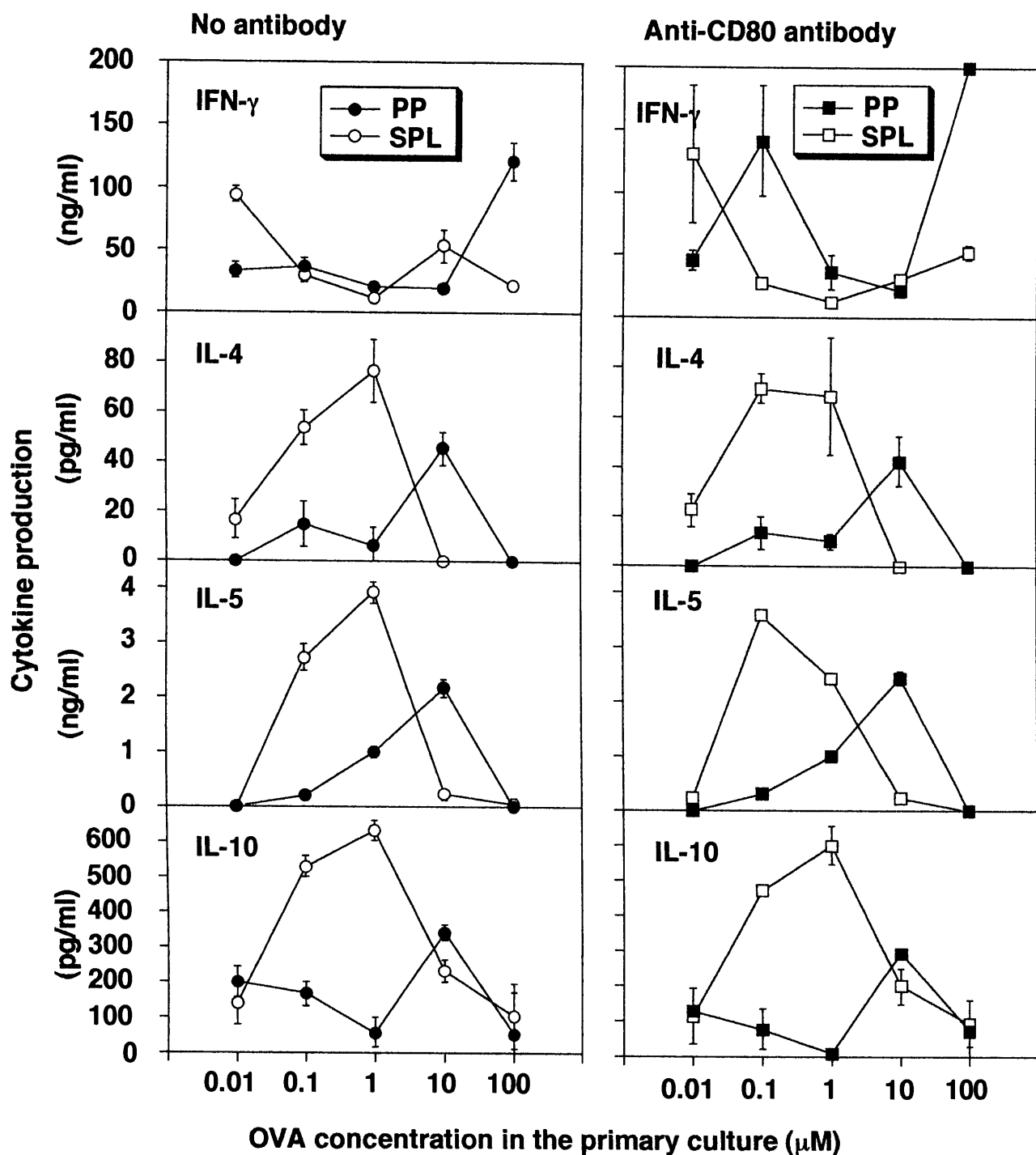


図 3-4 様々な濃度の抗原での刺激によりパイエル板および脾臓の抗原提示細胞が誘導する CD4^+ T 細胞の分化における CD80 の役割

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で抗 CD80 抗体を添加して培養した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、図 3-1 と同様に再刺激した。2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。

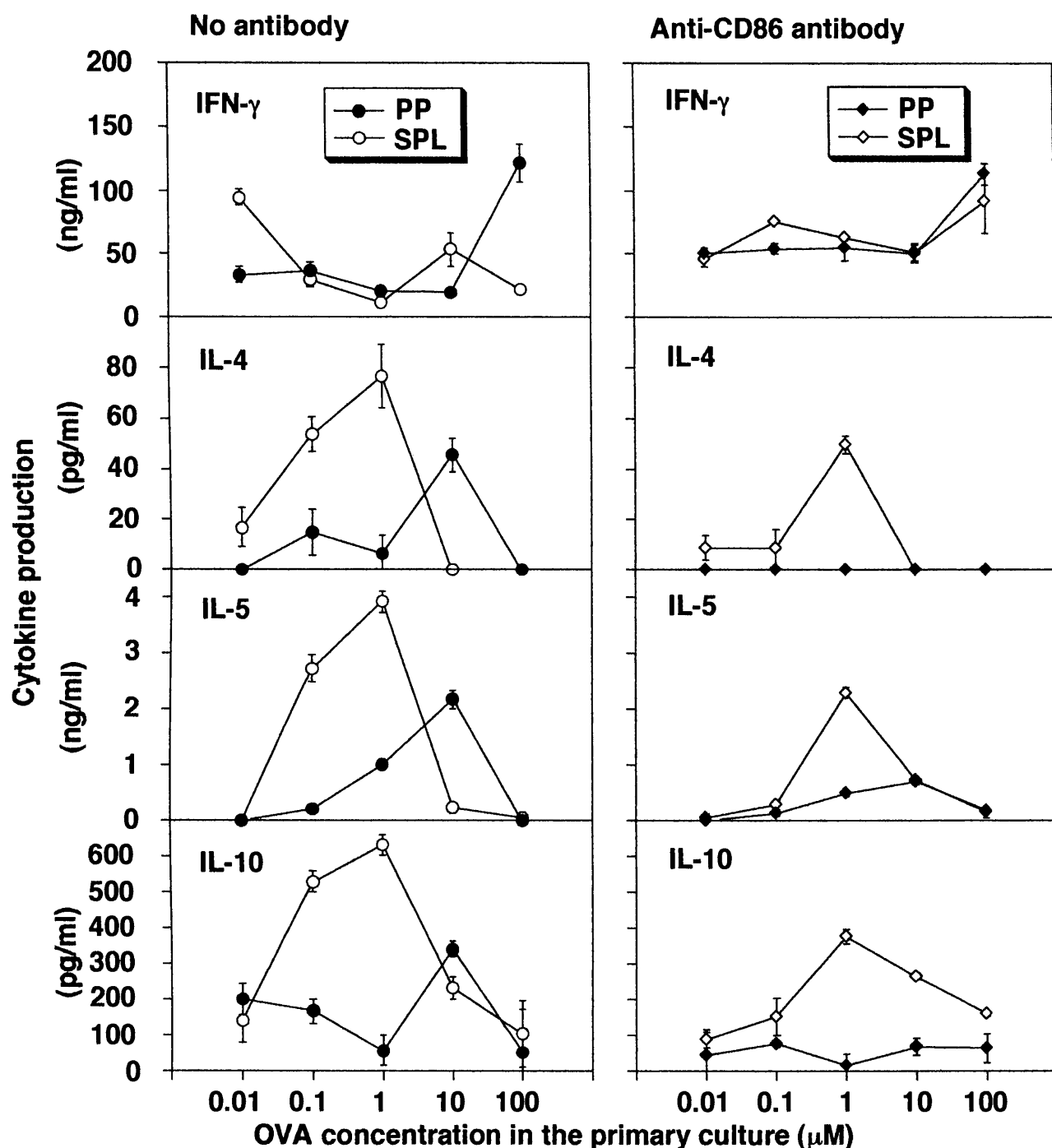


図 3-5 様々な濃度の抗原での刺激によりパイエル板および脾臓の抗原提示細胞が誘導する CD4⁺ T 細胞の分化における CD86 の役割

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で抗 CD86 抗体を添加して培養した。1 週間培養後 T 細胞を回収し、図 3-1 と同様に再刺激した。2 日後培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。

れてしまったか，もともと脾臓細胞に比べて誘導能が弱かったために検出限界以下に低下した可能性が考えられる．これらの結果は，Th1 細胞および Th2 細胞への分化誘導は互いに抑制しあうものの，抗原濃度依存性はそれぞれが独立して制御されていることを示している．また，Th2 細胞への分化を抗原濃度依存的に制御している因子が CD86 や IL-12 以外に存在していることも示唆された．

さらに，CD80 および CD86 の発現についても検討した．一次刺激の 24 時間後の抗原提示細胞上の CD80 および CD86 の発現をフローサイトメーターで解析した．CD86 の発現量はパイエル板および脾臓細胞のいずれにおいても抗原濃度に依存して増加していた（図 3-6B）．また，発現量は全ての抗原濃度においてパイエル板細胞よりも脾臓細胞の方が高かった．この結果は，CD86 の発現量はそれぞれの細胞による Th1/Th2 分化の誘導を反映していないことを示している．この結果からも Th1/Th2 分化誘導を抗原濃度依存的に制御する他の因子が存在していることが強く示唆された．一方，CD80 の発現量はパイエル板および脾臓細胞とも，すべての抗原濃度において変化が認められなかった（図 3-6A）．

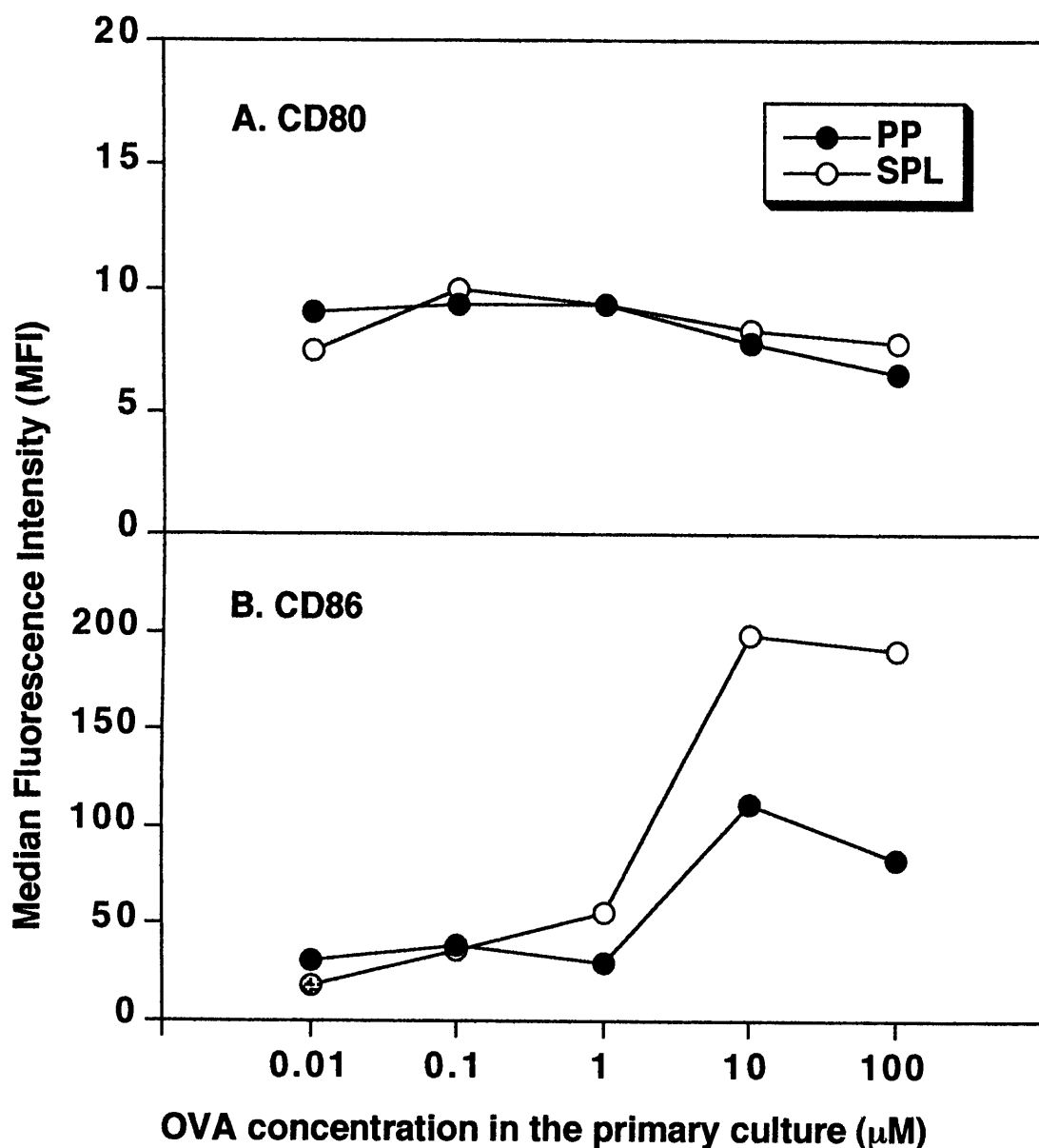


図 3-6 様々な濃度の抗原での刺激によりパイエル板および脾臓の抗原提示細胞上に発現する CD80 および CD86

未処理 BALB/c マウスよりパイエル板および脾臓細胞を調製した。これらの細胞を TCR トランスジェニックマウス脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞と図に示した濃度の抗原の存在下で培養した。1 日後培養中より細胞を回収し、フローサイトメーターにより CD80 (A) および CD86 (B) の発現量を測定した。

考察

第二章で示したように、本研究において BALB/c マウスのパイエル板および脾臓より調製した細胞を抗原提示細胞に用いて OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスの脾臓より調製した抗原未感作 CD4⁺T 細胞を抗原刺激することにより、パイエル板細胞は脾臓細胞に比べ IL-4, IL-10 産生が低く IFN- γ 産生が高い Th1 型の T 細胞分化を誘導することを見いだした。この結果は、Iwasaki と Kelsall (67) や Everson ら (65, 66) の結果とは矛盾するものであった。一方で、第一章でも示したとおり、実際の *in vivo* での応答は Th2 型のみでなく Th1 型の応答も誘導されることが明らかである。第二章で得られた結果は、このような Th1 細胞の誘導を説明する手がかりとなるのではないかと考えた。これまでにいくつかの報告により経口抗原に対する TGF- β 産生細胞および IFN- γ 産生細胞の誘導には投与する抗原量が大きな影響を及ぼすことが示唆されている (12, 19, 142, 143)。また、本研究でも第一章において経口抗原の量によって Th1 応答と Th2 応答の活性化や寛容の誘導が制御されることを示した。すなわち、存在する抗原の量がパイエル板における抗原提示に影響を与える可能性が考えられる。

以前より、抗原提示の際の抗原濃度が T 細胞分化に重要な役割を持つことは知られているが (70, 72, 73)、近年の報告によりこのような抗原濃度依存的な T 細胞分化の誘導に抗原提示細胞の機能が関与していることが明らかとなった (74)。これは、パイエル板と脾臓など異なった機能を持つ抗原提示細胞が存在する器官では、抗原濃度による免疫応答の制御が異なった機構によって行われている可能性を示唆している。

パイエル板における抗原提示と抗原濃度

そこで本研究ではパイエル板および脾臓の細胞を抗原提示細胞に用い、

様々な濃度の抗原で刺激して T 細胞に誘導される分化を解析した。その結果、低濃度 (0.01-1 μM) および高濃度 (100 μM) の抗原刺激によってはパイエル板細胞による抗原提示の方が脾臓細胞による抗原提示と比較して Th1 型の応答を優位に誘導した。一方、10 μM の抗原濃度においてはパイエル板細胞の方が強い Th2 型の応答を誘導した。これまでの研究で Iwasaki と Kelsall は 3 μM の抗原ペプチドを用いており、本研究では 1 μM のタンパク質を抗原に用いた。前章の考察にも述べたように、ペプチドとタンパク質では抗原の形態も異なり、また用いた TCR トランスジェニックマウスの発現する TCR も異なるため単純に濃度を比較することは出来ないが、このような限られた濃度のみでの解析であったため Th2 型応答または Th1 型応答のみが誘導されるという相反する結果が得られていた可能性がある。

パイエル板の抗原提示細胞が誘導する抗原濃度依存的な免疫応答の意義

本研究によってパイエル板細胞の抗原提示によって抗原濃度に依存して Th1 型および Th2 型のいずれの T 細胞分化も誘導されることが明らかとなった。Nagata らはヒトのパイエル板において IL-12 を産生する細胞が存在し、Th1 応答を誘導していることを報告している (144)。彼らはこの結果をヒト特有の応答として結論付け、マウスなどの齧歯類とは異なった特徴であると報告している。しかしながら本研究の結果により、マウスにおいてもパイエル板細胞による抗原提示によって Th1 細胞の応答が誘導されることが示され、齧歯類におけるパイエル板抗原提示細胞の新たな役割が明らかとなった。これはこれまで報告されている *in vivo* での免疫応答と良く一致した結果である。

また、Th1 細胞を誘導する抗原の濃度範囲と比較して Th2 細胞を誘導する濃度範囲は非常に狭いことが明らかとなった。これは、感染や抗原の侵入から排除までの期間中における抗原量の変化と対応させると、よ

り長い期間にわたって Th1 応答が誘導されることを意味しているのかもしれない。第二章でも述べたように、粘膜への IgA 抗体の分泌や病原体の排除などに Th1 細胞が産生する IFN- γ が大きな役割を果たしている。その為に、感染や抗原投与の初期には Th1 細胞の応答が誘導されると考えられる。一方、Th2 細胞の産生する IL-4 や IL-6 など抗体産生細胞への分化誘導に必須であるが、過剰な Th2 型の応答は IgE 産生を誘導しアレルギーを発症する危険性も併せ持つので、その誘導は狭い濃度範囲、すなわち短期間に限定されている可能性が考えられる。

また、脾臓細胞の抗原提示によっては比較的広い抗原濃度の範囲において Th2 細胞への分化の強力な誘導が認められた。脾臓は B 細胞プールとして大きな役割を果たしている器官であり、抗体産生細胞への分化誘導において Th2 細胞の産生するサイトカインが必要である一方で、パイエル板のように一度に大量の抗原にさらされる可能性が少なく過剰な Th2 型応答が誘導される危険性が少ないことから、Th2 細胞の分化を誘導する抗原提示細胞が多く存在する可能性が考えられる。しかしながら、Th2 細胞の産生する IL-4 はアレルギーの発症に関与する IgE の誘導因子であり、脾臓細胞における広範囲な抗原濃度に対する Th2 細胞の誘導がアレルギー疾患に何らかの影響を与えている可能性も考えられる。本研究の第二章で述べたように、タンパク質抗原を経口投与した場合、パイエル板に大量の抗原が取り込まれたのに対し、脾臓にはほとんど抗原の移行は認められなかった。その一方で、いくつかの報告では脾臓における経口投与抗原特異的な T 細胞応答や T 細胞のアポトーシスが示されており (119, 120)、脾臓における Th2 細胞の応答の積極的な誘導が食品アレルギーの発症にも関与しているかも知れない。

さらに、パイエル板細胞と異なり Th1 細胞の応答の顕著な誘導はいずれの抗原濃度においても認められなかった。これは脾臓においては Th1 細胞の応答を誘導する濃度が極限られた範囲に限定されており、本研究

で設定した濃度がその範囲に入っていなかった可能性が考えられる。もしくは、脾臓においてはパイエル板のように大量のウィルスや細菌にさらされる危険性は非常に低く、分泌型 IgA の産生にも関与しないと考えられるので、パイエル板の様な Th1 応答の誘導は必要ないのかもしれない。第一章においては少量の抗原の経口投与により、脾臓での Th1 細胞の活性化が認められた。本実験の結果とあわせて考えると、誘導された Th1 細胞はパイエル板などの他の部位から移行して来たものかもしれない。実際、同じマウスにおいてパイエル板でも同様な Th1 細胞の誘導が認められており、さらに本章の結果からもパイエル板では低濃度の抗原により Th1 細胞の誘導が示されている。

Th1 と Th2 の分化における相互作用

本研究では顕著な Th1 細胞の誘導が認められなかった脾臓細胞による抗原提示においても、すべての濃度で同様な Th2 細胞の分化が誘導される訳ではなく、抗原濃度に依存して Th2 細胞の誘導能に大きな変化が見られた。これは、Th1 細胞と Th2 細胞の誘導は独立したメカニズムによって制御されていることを示している。また、後述するが本研究においては抗 IL-12 抗体や抗 CD86 抗体を用いた阻害実験においても Th1 と Th2 細胞の分化は独立に制御されていた。一般的に Th1 と Th2 細胞は相互に抑制することによって生体内でのバランスを保っていると考えられている。しかしながら、本研究の結果は Th1 細胞への分化を誘導する因子が存在しなければ Th2 細胞の応答が強く誘導され、Th2 細胞への分化を誘導する因子が存在しなければ Th1 細胞の応答が強く誘導されるという訳ではなく、それぞれの分化には固有な誘導因子が必須である可能性を示唆している。このようにして生体は Th1 応答と Th2 応答のバランスを厳密に制御していると考えられる。

パイエル板の抗原提示細胞の持つ抗原濃度による T 細胞分化の制御機構

パイエル板細胞と脾臓細胞による抗原提示は異なった抗原濃度依存性を持って Th1/Th2 分化を誘導することが明らかとなった。さらに、本研究の結果よりこの濃度依存性の差異が単なる濃度のずれではなく、全く異なったメカニズムを有することも示された。先述のように、脾臓細胞によっては明らかな Th1 細胞への分化の誘導は認められなかったのに対し、パイエル板細胞によっては Th1 細胞の誘導能を強く発揮する抗原濃度が存在した。一方で、脾臓細胞が 1 μ M の抗原の存在下で誘導した T 細胞による IL-4 や IL-10 産生はパイエル板細胞によって誘導されるいずれの濃度におけるものよりも高い値であった。また、第二章に示したように、同程度の細胞増殖応答を示す抗原濃度においても、パイエル板細胞と脾臓細胞は異なった T 細胞分化を誘導した。これらの結果を総合して考えると、パイエル板細胞と脾臓細胞の抗原提示による抗原濃度依存的な Th1/Th2 分化の誘導には異なった分子機構が関与していると考えられる。

そこで本研究ではさらにパイエル板細胞および脾臓細胞の抗原提示による抗原濃度依存的な T 細胞分化の誘導機構を検討した。その結果、抗原濃度依存的な Th1/Th2 誘導における IL-12 および CD86 の働きを明らかにすることが出来た。

IL-12 の役割

Ruedl らは多量の抗原により活性化された T 細胞は強く CD40L を発現し、その刺激を受けた DC やマクロファージによって産生される IL-12 が抗原濃度依存的な Th1 分化の誘導に必須であると報告している (75)。そこで本研究では培養中に抗 IL-12 抗体を添加し IL-12 の活性を阻害する実験を行った。その結果、Th1 細胞誘導の指標である IFN- γ 産生細胞の誘導はパイエル板および脾臓のどちらの細胞を抗原提示細胞に用いた

場合でも全ての抗原濃度においてほとんど認められなくなった．すなわち抗原提示細胞の種類に関係なく IL-12 は Th1 細胞の誘導に必須であると考えられる．一方で，Th2 型のサイトカインである IL-4, IL-5, IL-10 は抗 IL-12 抗体の存在下においても濃度依存的に誘導され，パイエル板および脾臓の細胞を用いた場合ではその誘導パターンは異なったままであった．この結果は，抗原濃度による Th2 細胞の高誘導や低誘導の制御には IL-12 は必須ではないことを示している．

また，培養上清中に産生された IL-12 の量はパイエル板，脾臓ともに抗原濃度に依存して単純に増加し，さらにすべての濃度において脾臓細胞の方が高い産生量を示しており，Th1/Th2 分化の誘導パターンとは一致しなかった．このことから，パイエル板細胞と 10 μ M の抗原および脾臓細胞と 0.1 μ M の抗原によって Th2 型サイトカイン産生細胞が誘導されるのに対して，他の濃度では誘導されなくなることは IL-12 以外の分子が関与していることが推測される．

CD80 および CD86 の役割

次に補助刺激分子であり T 細胞の活性化や分化に重要な機能を持つと考えられる CD86 および CD80 の役割について検討した．CD86 の機能を抗体により阻害することにより Th1 細胞の誘導における濃度依存性が消失した．また，全ての濃度において高いレベルで Th1 細胞の分化が誘導された．これは，CD86 が Th1 細胞の誘導を抑制していることを示している．さらに，パイエル板細胞および脾臓細胞を抗原提示細胞に用いた場合でも，全く同様な Th1 細胞の誘導が認められるようになった．これは，パイエル板細胞と脾臓細胞でその発現パターンが異なっていることを示唆している．実際，CD86 の発現量を解析した結果，パイエル板細胞および脾臓細胞のいずれにおいても抗原濃度に依存して発現量が増加していたものの，全ての抗原濃度においてその発現量は脾臓細胞の方

が高い値を示した。この結果は、パイエル板細胞を用いた場合に脾臓細胞を用いた場合と比べて強く Th1 細胞への分化が誘導されることおよび、Th1 細胞の誘導が低下する抗原濃度がより高濃度であることと関係している可能性が考えられた。しかしながら、さらに高濃度になると CD86 の発現はさらに高くなるのに対し、パイエル板細胞および脾臓細胞のどちらを用いた場合でも再び Th1 細胞の誘導が認められ、特にパイエル板細胞を用いた場合は Th1 細胞の誘導が非常に強く認められたことから、CD86 の発現は Th1 細胞への分化を低下させる重要な要因であるものの IL-12 など他の因子とのバランスによって最終的な分化が決定されていると考えられる。

一方、CD86 を阻害した場合には Th2 細胞の誘導は抑制された。このことは CD86 が Th1 細胞の誘導を阻害すると同時に Th2 細胞の誘導を促進していることを示唆している。しかしながら、脾臓細胞を用いた場合においては阻害前と比べて弱いながらも Th2 細胞の誘導が認められており、さらにその抗原濃度依存性は阻害前と全く同じであることから CD86 は Th2 細胞の誘導を促進するものの必須ではないこと、および抗原濃度依存的な Th2 細胞の誘導を制御する因子は他にあることが示された。パイエル板細胞を用いた場合には CD86 のブロッキングにより Th2 細胞の誘導がほとんど認められなくなってしまうため、このような因子が存在しているのかどうか明らかではないが、パイエル板細胞を用いた場合も CD86 の発現パターンからだけでは濃度依存的な Th2 細胞の高誘導と低誘導を説明できないことからおそらく同様な因子が関与していると考えられる。またパイエル板および脾臓細胞の CD86 を阻害した状態でもパイエル板細胞による Th2 細胞の誘導が脾臓よりも弱いことから、パイエル板細胞では脾臓細胞よりも Th2 細胞の誘導を促進する因子の発現が低いか、抑制する因子の発現が高い可能性が考えられる。

CD86 が Th2 細胞の誘導に関与しているという報告はこれまでもあ

る (145, 146). 一方で、対立する報告もあり未だはっきりしないが、本研究の結果からはパイエル板細胞および脾臓細胞いずれを用いた場合も CD86 は Th2 細胞の分化を促進する働きを持つことが示された。また別の可能性として、このように CD86 が Th2 細胞の誘導を促進する効果を持っていたことから、CD86 の阻害により Th2 応答の誘導が弱まり Th1 細胞への分化を抑制するためには不十分なものとなった可能性も考えられる。すなわち、Th1 細胞の誘導の濃度依存性が消失したのは CD86 の直接的な影響ではなく、Th2 応答の誘導を介したものである可能性も考えられる。抗原濃度依存的な Th1 細胞への分化の低誘導に Th2 応答の誘導が必須であるかどうかは現在のところ明らかではない。Th2 細胞の誘導に関しては、Constant らは低濃度の抗原で誘導される Th2 の分化には内因性の IL-4 産生は必要ないと報告しており (73)、逆に Hosken らは低濃度と高濃度で誘導される Th2 細胞の分化に抗原刺激初期に産生される IL-4 が必要であるとしている (72)。

Rogers と Croft は様々な細胞表面分子に対する抗体を用いた阻害実験によって、抗原濃度依存的な Th1/Th2 分化の誘導におけるこれらの分子の役割について報告している (74)。彼らの報告によると、個々の分子がそれぞれ固有の働きをしているというよりは、むしろこれらの分子全体と抗原濃度のアビディティの総和により Th1/Th2 分化が決定されることが示唆されている。しかしながら本研究の結果は、パイエル板細胞および脾臓細胞のいずれを用いた場合も CD86 の阻害は Th1/Th2 誘導における抗原濃度依存性をシフトさせた訳ではなく、CD86 が濃度依存性に影響を与えることなく Th2 細胞への分化を促進したり、濃度依存的な Th1 細胞の低誘導に関与するという特徴的な働きを持つことを示している。この結果は Rogers と Croft の報告と異なるものであった。

本研究においては CD80 の発現量は抗原濃度および用いた細胞の由来によってほとんど変化しなかった。さらに阻害実験においてもほとんど

影響を与えなかった。このことは用いた抗体の活性が弱かった可能性が懸念されるが、予備実験において抗 CD86 抗体のみでは阻害されない T 細胞の活性化が抗 CD86 と抗 CD80 抗体の共存下においては完全に阻害されることを確認していることから、抗 CD80 抗体による阻害は明らかに効果を発揮していると判断できる。すなわち少なくとも CD86 が同時に発現してるような状況下では CD80 は抗原濃度依存的な Th1/Th2 分化の誘導にほとんど関与していないと考えられる。一方、CD86 の非存在下（すなわち抗 CD86 抗体の存在下）では CD80 は T 細胞の活性化の誘導を補助していると考えられたが、これまで詳しく述べてきたようにその機能は CD86 とは異なっていた。

パイエル板における IL-5 産生誘導の特殊性

興味深いことに抗体により IL-12 の機能を阻害した場合、脾臓細胞を用いた系では IL-4, IL-5, IL-10 の全ての Th2 型サイトカインにおける抗原濃度依存性は阻害前とほとんど変化が無かったのに対し、パイエル板細胞を用いた系では IL-5 産生細胞の誘導が抗原濃度に依存して高くなった。パイエル板細胞を用いた場合も IL-4 や IL-10 産生細胞の誘導はほとんど影響を受けなかったことから、IL-5 に特有な現象であった。すなわち IL-5 誘導は他の Th2 型サイトカインとは異なった制御を受けており、誘導能はパイエル板細胞と脾臓細胞では大きく異なっていることが明らかとなった。

パイエル板細胞と高濃度の抗原による抗原提示によっては強力に IL-5 産生細胞が誘導されるものの IL-12 存在下ではそれが抑制されている可能性が考えられた。または、IL-12 存在下ではパイエル板細胞および脾臓細胞ともに高濃度での IL-5 誘導を阻害する因子を発現しているが、IL-12 を阻害することによりパイエル板細胞においてのみその発現が抑制される可能性も考えられる。パイエル板は腸管免疫応答の誘導器官で

あり、IgA 産生細胞の分化に重要な役割を持っていると考えられている。本研究で見いだされた特徴的な IL-5 産生細胞の誘導に関する特徴的な性質が、*in vivo* における IgA 産生に何らかの意味を持つ可能性が考えられる。

パイエル板における抗原濃度依存的な免疫応答の誘導と抗原提示細胞の細胞種

本実験ではパイエル板および脾臓の細胞を未分画の状態 で用いた。これは、パイエル板や脾臓に存在する全ての細胞を用いることにより出来る限り *in vivo* での応答を再現しようと考えたからである。一方で、このような系では実際にどのような細胞が応答に関与しているかを明らかにすることは出来ない。

近年の報告により、パイエル板には異なった機能を持った DC が数種類存在しており、それぞれが抗原提示により異なった T 細胞応答を誘導することが明らかとなった。第二章に示したように、本研究ではパイエル板や脾臓から B 細胞やその他の細胞を分画し、それらを様々な組み合わせで用いることにより、個々の細胞とは異なった抗原提示能を発揮することを示す知見を得ている。Moser は CD86 はマクロファージが発現すると Th2 細胞への分化を促進し、DC が発現すると Th1 細胞への分化を促進すると報告している (147)。これは共存するその他の因子によって CD86 の機能は正反対に変化するということを示唆している。本実験では先に述べたように CD86 はパイエル板細胞および脾臓細胞においていずれも Th2 細胞の誘導を促進する働きを持っていた。しかしながら、用いる細胞を細かく分画した場合、CD86 がどのような働きを持つかは明らかではない。すなわち、用いる細胞によって Th1/Th2 分化誘導の抗原濃度依存性も異なってくると考えられる。実際、パイエル板、腸管膜リンパ節および脾臓由来の DC を用いた実験により、DC が抗原濃度依存

的な T 細胞応答の誘導に関与しており，さらにそのポピュレーションにより誘導する応答が異なっていることが明らかになっている (148)．パイエル板や脾臓の T 細胞応答が実際 *in vivo* でどのような濃度依存性を持っているのかは今後の検討課題である．

第三章の結果をまとめると，パイエル板細胞と脾臓細胞は異なった抗原濃度依存性を持って Th1 細胞および Th2 細胞の分化を誘導した．その際，IL-12 は Th1 細胞の誘導には必須であったが，抗原濃度による Th2 細胞分化の高誘導と低誘導の制御には関与していなかった．また，パイエル板細胞と脾臓細胞による Th2 細胞への分化誘導の抗原濃度依存性の差異は IL-12 非存在下においても解除されなかった．CD86 は Th1 細胞の抗原濃度依存的な低誘導に必須であった．CD86 の機能を阻害することによって Th1 細胞の誘導は常に高いレベルで保たれ，さらにパイエル板細胞と脾臓細胞における差異が認められなくなった．一方，CD86 は Th2 細胞の誘導に関して促進効果を持つものの，少なくとも脾臓細胞を用いた場合に関しては必須では無いことが明らかとなった．すなわち，抗原濃度依存的な Th2 細胞の誘導に関わる分子が他に存在していることが示唆された．また，この分子は少なくとも単独では抗原濃度による Th1 細胞の高誘導や低誘導を導くことは出来ないことも示された．

このように抗原濃度依存的な Th1/Th2 分化の誘導は抗原提示の際に共存する細胞の発現するさまざまな因子によって複雑に制御されていることが明らかとなった．これは，*in vivo* では同じ抗原に対しても抗原の存在する部位によって異なった濃度依存性をもって免疫応答が誘導されることを示している．経口抗原の投与量による免疫応答の制御においてもパイエル板などに存在する抗原提示細胞の機能が深く関わっている可能性が強く示唆された．今後さらに関与する分子を同定し，さまざまな部位および条件において，どの様な抗原濃度依存性で T 細胞分化が誘導さ

れるかを検討したい.

総合討論

粘膜組織は「内なる外」と呼ばれるように、外界と生体との接点である。さらに、体表に存在する皮膚組織と異なり、外界から様々な物質を生体内へと導入する取り込み口であるという点で非常に重要かつ複雑な役割を果たしている。特に、腸管内には細菌が菌叢を形成している他、食物由来の様々な外来物質が存在し、常に多量の異物（抗原）にさらされている。食物抗原については生体に無害なものがほとんどであり、それらを排除する免疫応答の誘導は不必要である。そのため、食物抗原に対する免疫応答は経口免疫寛容の誘導により抑制されている。しかしながら、食品といえども細菌やウイルスその他の病原性を有するものが混入する可能性もあるため、それらを見分け必要に応じて排除に働く免疫応答を誘導しなくてはならない。従来、免疫系は自己非自己を識別して非自己を排除する機構であると考えられてきたが、腸管では非自己をさらに細かく識別して抗原に応じて異なった免疫応答を誘起するという極めて高度なメカニズムを想定できる。胸腺で見られる自己非自己の識別とは別の機構が存在していると考えられるが、腸管の免疫器官がどのようにして抗原を識別しているのかは未だ明らかになってはいない。

腸管における免疫応答の誘導とその制御は生体の恒常性の維持に重要な役割を持ち、その破綻は食品アレルギーなどの疾患を起こしかねない。また、腸管における免疫応答の誘導と抑制を制御するメカニズムの解明は、腸炎のような自己免疫疾患の治療や予防法の解明にも繋がるのが期待される。あるいは、経口免疫寛容を利用して、全身免疫系の過剰な免疫応答を抑えて自己免疫疾患の治療や予防ができる可能性がある。本研究では抗原提示に着目して異なった抗原濃度によって誘導される応答を解析することによって、腸管における免疫応答の制御機構を検討した。

経口投与抗原の抗原量による免疫応答と免疫寛容の制御

第一章では、経口投与抗原に対しては免疫応答と免疫寛容が同時に誘導されることを明らかにした。少量の抗原の経口投与に対しては、T 細胞の抗原特異的な活性化に引き続いて寛容が誘導された。一方で、多量の抗原の経口投与に対しては、活性化は認められず寛容の誘導のみが観察された。また、経口投与抗原により免疫系の活性化を誘導するためには少量ずつ多数回にわたって抗原を投与し、逆に免疫系の活性化を伴わずに経口免疫寛容を誘導したい場合には一度に多量の抗原を投与した方が効果的であることが示唆された。これにより本研究では、経口投与する抗原量を調節することによって免疫系の活性化と寛容のバランスを制御することが可能であることを明らかにした。

近年、従来行われてきた注射によるワクチン接種に変わる新たな方法として、経粘膜ワクチンの開発が盛んに行われている。経粘膜ワクチンは全身の粘膜面における免疫応答を活性化するため病原体からの予防効果が高く、さらに苦痛がなく人手も必要とせずに投与できるため大きな期待を集めている。このような経粘膜ワクチンにおける大きな問題点として、免疫寛容の誘導あるいはワクチンに対する免疫応答の非効率的な誘導があげられる。接種したワクチンに対する免疫応答が免疫寛容の誘導によって抑制されてしまうため、強い応答を効果的に誘導することが困難となっている。また、寛容が誘導されなくても、IgA 応答などの粘膜免疫応答を強く誘導するのは困難である。本研究で得られた結果から、このような経粘膜ワクチンによって誘導される免疫応答を接種する抗原の量を調節することによって、免疫寛容よりも免疫応答を優位に誘導することが可能になると考えられる。一方で、食品アレルギーや自己免疫疾患など過剰な免疫応答が原因となって発症する疾患の治療においては、免疫系の活性化を誘導することなく寛容を誘導し免疫応答を抑制することが望まれる。このような場合も抗原の摂取量を調節することで、疾患

の悪化を伴わずに免疫寛容を誘導し過剰な免疫応答を抑制することが可能となることが期待できる。

本研究ではいずれの投与量によってもアクティブサプレッションに関与する調節性 T 細胞の誘導は認められなかった。この結果から、本研究で見られた経口免疫寛容の機構の大部分は抗原特異的 T 細胞の不応答化によるものであると考えられた。しかしながら、これまでに T 細胞の不応答化の誘導が抗原量によって影響を受けるという報告はあるものの、抗原量がどのようにして免疫寛容の誘導を制御しているのかは全く解析されていない。

一つの可能性として存在する抗原の量が多い場合は、T 細胞に強く、しかも持続的に刺激を伝えるために T 細胞に不応答が誘導される可能性が示唆されている。抗原提示の際に存在する抗原量が T 細胞応答や分化の誘導に大きな影響を与えることは古くから知られており、多量の経口抗原による免疫寛容の誘導も、同様な機構が働いていることが考えられた。しかしながら、本研究では少量の抗原の経口投与によっても活性化に引き続き Th1 細胞に寛容が誘導された。さらに、第二章に示したように *in vitro* では多量の抗原の存在下においても T 細胞に不応答化は誘導できなかった。これらの結果は単に多量の抗原が存在するのみでは免疫寛容は誘導されず、未解明な機構が存在することを示唆している。

また別の可能性として、抗原の量が増加することによって抗原が腸管から取り込まれた後に到達する部位が異なることによると考えられた。すなわち、少量の抗原によっては腸管内あるいは近くの部位において免疫応答が誘導され、多量の抗原によっては血流を介してより遠くに存在する免疫器官にまで抗原が移行し、そこで免疫寛容が誘導される可能性が考えられる。異なった免疫器官には異なった性質を持つ T 細胞や抗原提示細胞が存在することが報告されており、本研究で得られた経口投与する抗原量を変化させることにより免疫応答と免疫寛容の誘導の balan

スが変化するという結果と何らかの関係がある可能性が推測される。第三章で示したように、脾臓細胞の抗原提示によっては 10 および 100 μM といった比較的高い抗原濃度の存在下において Th1 および Th2 のいずれの細胞も低いレベルでしか誘導されなかった。このような現象は脾臓細胞における寛容誘導の関与を示唆している可能性が考えられるが、一方で第二章に示したようにこれらの抗原濃度においても増殖応答においては T 細胞の不応答化は誘導できなかった。高濃度の抗原の存在下で脾臓細胞の抗原提示により誘導される T 細胞の機能に関する詳細な検討が必要である。さらに、本研究ではパイエル板以外にも肝臓に比較的多量の抗原が移行することが明らかとなっている。これまでも肝臓は免疫応答の抑制に関与しているという報告もあり、今後は経口投与抗原に対して肝臓において誘導される免疫応答の解析が必要となる。

また、*in vitro* の実験では何らかの理由により、*in vivo* において組織・器官で誘導される T 細胞の不応答化が誘導されない可能性も残されている。

パイエル板における抗原提示細胞の機能

第二章では、パイエル板では非常に多量の経口抗原を効率よく取り込むことを明らかにした。一方、脾臓では比較的多量の抗原を摂取した場合でもパイエル板と比較して極めて少量の抗原しか存在しないことが明らかとなった。また、いずれの細胞によっても T 細胞の不応答化の誘導は認められなかったものの、パイエル板と脾臓の細胞による抗原提示は異なった T 細胞分化を誘導した。さらに、詳細に細胞種を分画して検討した結果、細胞種ごとに、また、異なった細胞種が共存する場合はそれぞれ単独の場合とはさらに異なった T 細胞分化誘導能を持つことが明らかとなった。

また、第三章では刺激に用いる抗原濃度を様々に変化させた結果、パ

イエエル板と脾臓細胞による抗原提示では、異なった濃度依存性に従って異なった T 細胞分化を誘導することが明らかとなった。このようなパイエル板の細胞が持つ特徴的な T 細胞分化の誘導能は腸管免疫応答を制御する上で重要な役割を持つと考えられる。すなわち、IgA 産生を積極的に誘導するような T 細胞分化やウィルスや細菌感染からの防御を行う応答、さらには食品アレルギーを誘起するような応答などの誘導が抗原提示細胞によって制御される可能性がある。第一章では、経口投与する抗原量を変化させることによって、Th1 細胞や Th2 細胞の活性化や寛容の誘導に異なった影響を与えることを示した。このような経口投与抗原の抗原量の変化による免疫応答の制御にパイエル板の抗原提示細胞の持つ固有の機能が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

抗原提示細胞による抗原濃度に依存した免疫応答の制御機構

先に述べたように、異なった量の抗原は抗原提示細胞の機能を制御することによって異なった免疫応答を誘導している可能性が示唆された。この制御機構を明らかにするために、パイエル板および脾臓の細胞が誘導する抗原濃度に依存した T 細胞分化における抗原提示能の差異に関与する分子を検討した。

第三章では、パイエル板細胞と脾臓細胞では細胞表面に発現する副刺激分子である CD86 の発現量や Th1 細胞分化の誘導性サイトカインである IL-12 の分泌量が異なっていることを示した。また、これらの分子はそれぞれの細胞による抗原濃度に依存した Th1/Th2 分化の制御に重要な役割を果たしていた。さらに、パイエル板および脾臓細胞のいずれの抗原提示においても Th1 細胞および Th2 細胞への分化はそれぞれ独立に制御されていることが明らかとなった。これらの結果は抗原濃度による免疫応答の制御には抗原提示細胞の機能が重要であり、抗原提示細胞の機能を制御することによって経口抗原に対しても Th1 型と Th2 型の応

答を独立に制御出来る可能性を示唆している（図 vi）。

本研究では、投与する抗原量を調節することによって免疫応答が制御できることを示した。また、そのような応答の誘導には抗原提示細胞が重要な役割を果たしており、パイエル板の抗原提示細胞と脾臓の抗原提示細胞ではその制御機能が異なることが明らかとなった。経口摂取される抗原の量の変化によって免疫応答と免疫寛容の誘導を制御する因子や、Th1/Th2 分化を制御する因子は同定することが出来なかったが、今後これらの応答の誘導過程における遺伝子やタンパク質などの発現量の推移の網羅的解析や *in situ* 解析の技術などを用いた、より生体内に近い環境での直接的な解析を行うことによってこれらの因子が同定できると考える。それにより、免疫寛容や様々なタイプの免疫応答の誘導が任意に制御可能となり、食品アレルギーを含むさまざまな疾患の治療や予防に貢献することが期待される。

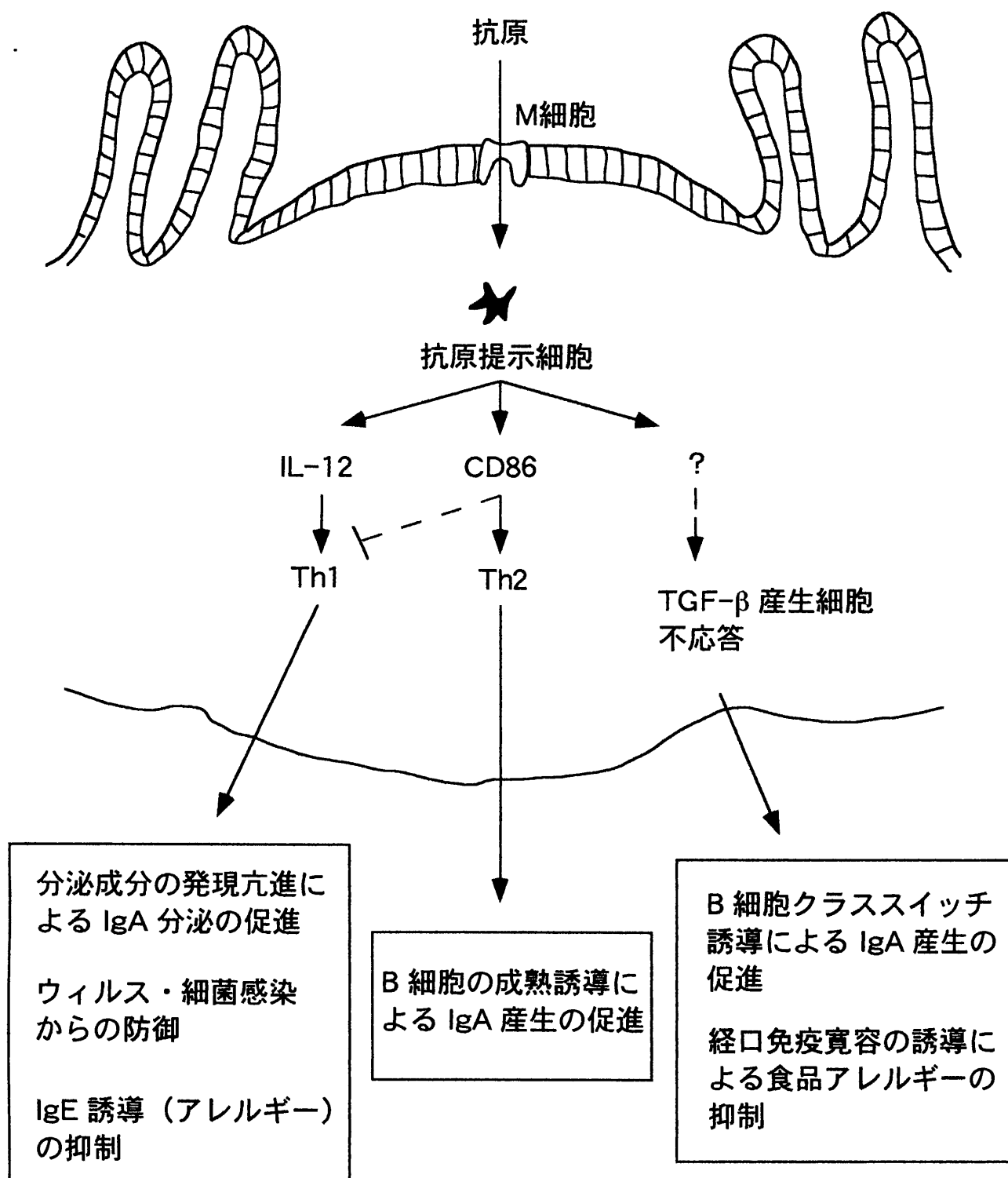


図 vi パイエル板抗原提示細胞の機能と腸管免疫応答の誘導

参考文献

1. Kaminogawa, S., 1996. Food allergy, Oral tolerance and immunomodulation - Their molecular and cellular mechanism. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**: 1749-1756.
2. Mowat, A.M., 1987. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol. Today*, **8**: 93-98.
3. Weiner, H.L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S.J., Al-Sabbagh, S.A., Santos, L., Sayegh, M., Nussenblatt, R.B., Trentham, D.E., Hafler, D.A., 1994. Oral tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**: 809-837.
4. Strobel, S., Mowat, A.M., 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today*, **19**: 173-181.
5. Weiner, H.L., 1997. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu. Rev. Med.*, **48**: 341-351.
6. Weiner, H.L., 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.*, **182**: 207-214.
7. Richman, L.K., Graeff, A.S., Yarchoan, R., Strober, W., 1981. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J. Immunol.*, **126**: 2079-2083.
8. Kiyono, H., Mosteller, L.M., Eldridge, J.H., Michalek, S.M., McGhee, J.R., 1983. IgA responses in xid mice: oral antigen primes Peyer's patch cells for *in vitro* immune responses and secretory antibody production. *J. Immunol.*, **131**: 2616-2622.

9. Ngan, J., Kind, L.S., 1978. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. Immunol.*, **120**: 861-865.
10. Mattingly, J.A., Waksman, B.H., 1978. Immunologic suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. *J. Immunol.*, **121**: 1878-1883.
11. Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 1995. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, **376**: 177-180.
12. Friedman, A., Weiner, H.L., 1994. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 6688-6692.
13. Melamed, D., Friedman, A., 1993. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 935-942.
14. Marino, M., Ippolito, A., Fassina, G., 1999. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice by oral administration of retro-inverso derivative of encephalitogenic epitope P87-99. *Eur. J. Immunol.*, **29**: 2560-2566.
15. Enomoto, A., Konishi, M., Hachimura, S., Kaminogawa, S., 1993. Milk whey protein fed as a constituent of the diet induced both oral tolerance and a systemic humoral response, while heat-denatured whey protein induced only oral tolerance. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **66**: 136-142.
16. Hirahara, K., Hisatsune, T., Nishijima, K., Kato, H., Shiho, O., Kaminogawa, S., 1995. CD4⁺ T cells anergized by high dose feeding

establish oral tolerance to antibody responses when transferred in SCID and nude mice. *J. Immunol.*, **154**: 6238-6245.

17. Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., Weiner, H.L., 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, **265**: 1237-1240.
18. Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Weiner, H.L., 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 421-425.
19. Santos, L.M.B., Al-Sabbagh, A., Londono, A., Weiner, H.L., 1994. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF- β -secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell. Immunol.*, **157**: 439-447.
20. Melamed, D., Friedman, A., 1994. *In vivo* tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur. J. Immunol.*, **24**: 1974-1981.
21. Melamed, D., Fishman-Lobell, J., Uni, Z., Weiner, H.L., 1996. Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Int. Immunol.*, **8**: 717-724.
22. Nishijima, K., Hisatsune, T., Kato, H., Shiho, O., Kaminogawa, S., 1995. α s1-casein-specific CD8⁺ T cell clone that inhibits its own interferon- γ production by producing interleukin-10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**: 2274-2276.
23. Schwartz, R.H., Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Quill, H., 1989. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **54**: 605-610.
24. Kuhn, L.C., Kraehenbuhl, J.P., 1979. Role of secretory component, a secreted glycoprotein, in the specific uptake of IgA dimer by epithelial

- cells. *J. Biol. Chem.*, **254**: 11072-11081.
25. Mestecky, J., Russell, M.W., 1997. Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms: an overview. *Biochem. Soc. Trans.*, **25**: 457-462.
 26. Lowell, G.H., Smith, L.F., Griffiss, J.M., Brandt, B.L., MacDermott, R.P., 1980. Antibody-dependent mononuclear cell-mediated antimeningococcal activity. Comparison of the effects of convalescent and postimmunization immunoglobulins G, M, and A. *J. Clin. Invest.*, **66**: 260-267.
 27. Kimman, T.G., Daha, M.R., Brinkhof, J.M., Westenbrink, F., 1989. Activation of complement by bovine respiratory syncytial virus-infected cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **21**: 311-325.
 28. Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Ishii, T., Sugimoto, M., Araki, S., Tominaga, A., Yamaguchi, N., Takatsu, K., 1989. Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.*, **170**: 1415-1420.
 29. Coffman, R.L., Lebman, D.A., Shrader, B., 1989. Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **170**: 1039-1044.
 30. Murray, P.D., McKenzie, D.T., Swain, S.L., Kagnoff, M.F., 1987. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.*, **139**: 2669-2674.
 31. Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S., McGhee, J.R., 1993. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in

- mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.*, **178**: 1309-1320.
32. Xu-Amano, J., Aicher, W.K., Taguchi, T., Kiyono, H., McGhee, J.R., 1992. Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patch by oral immunization. *Int. Immunol.*, **4**: 433-445.
 33. Wilson, A.D., Bailey, M., Williams, N.A., Stokes, C.R., 1991. The *in vitro* production of cytokines by mucosal lymphocytes immunized by oral administration of keyhole limpet hemocyanin using cholera toxin as an adjuvant. *Eur. J. Immunol.*, **21**: 2333-2339.
 34. Hoyne, G.F., Callow, M.G., Kuhlman, J., Thomas, W.R., 1993. T-cell lymphokine response to orally administered proteins during priming and unresponsiveness. *Immunology*, **78**: 534-540.
 35. VanCott, J.L., Staats, H.F., Pascual, D.W., Roberts, M., Chatfield, S.N., Yamamoto, M., Coste, M., Carter, P.B., Kiyono, H., McGhee, J.R., 1996. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant Salmonella. *J. Immunol.*, **156**: 1504-1514.
 36. Nakagawa, I., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J., Hamada, S., 1996. Oral immunization with the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* induces early Th1 and late Th2 cytokine expression in Peyer's patches. *J. Infect. Dis.*, **173**: 1428-1436.
 37. Gagliardi, M.C., Sallusto, F., Marinaro, M., Langenkamp, A., Lanzavecchia, A., De Magistris, M.T., 2000. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.*, **30**: 2394-2403.
 38. Braun, M.C., He, J., Wu, C.Y., Kelsall, B.L., 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor β 1 and β 2

chain expression. *J. Exp. Med.*, **189**: 541-552.

39. Pierre, P., Denis, O., Bazin, H., Mbongolo Mbella, E., Vaerman, J.P., 1992. Modulation of oral tolerance to ovalbumin by cholera toxin and its B subunit. *Eur. J. Immunol.*, **22**: 3179-3182.
40. Hoyne, G.F., Thomas, W.R., 1995. T-cell responses to orally administered antigens. Study of the kinetics of lymphokine production after single and multiple feeding. *Immunology*, **84**: 304-309.
41. Marth, T., Strober, W., Kelsall, B.L., 1996. High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: Systemic neutralization of IL-12 augments TGF- β secretion and T cell apoptosis. *J. Immunol.*, **157**: 2348-2357.
42. Arulanandam, B.P., O'Toole, M., Metzger, D.W., 1999. Intranasal interleukin-12 is a powerful adjuvant for protective mucosal immunity. *J. Infect. Dis.*, **180**: 940-949.
43. Boyaka, P.N., Marinaro, M., Jackson, R.J., Menon, S., Kiyono, H., Jirillo, E., McGhee, J.R., 1999. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J. Immunol.*, **162**: 122-128.
44. Zhang, Z.J., Davidson, L., Eisenbarth, G., Weiner, H.L., 1991. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 10252-10256.
45. Wang, Z.Y., Qiao, J., Link, H., 1993. Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by oral administration of acetylcholine receptor. *J. Neuroimmunol.*, **44**: 209-214.
46. Nussenblatt, R.B., Caspi, R.R., Mahdi, R., Chan, C.C., Roberge, F., Lider, O., Weiner, H.L., 1990. Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance

- with S-antigen. *J. Immunol.*, **144**: 1689-1695.
47. Brod, S.A., Al-Sabbagh, A., Sobel, R.A., Hafler, D.A., Weiner, H.L., 1991. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin antigens: IV. Suppression of chronic relapsing disease in the Lewis rat and strain 13 guinea pig. *Ann. Neurol.*, **29**: 615-622.
 48. Thompson, H.S., Staines, N.A., 1986. Gastric administration of type II collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. *Clin. Exp. Immunol.*, **64**: 581-586.
 49. Nussenblatt, R.B., Whitcup, S.M., De Smet, M.D., Caspi, R.R., Kozhich, A.T., Weiner, H.L., Vistica, B., Gery, I., 1996. Intraocular inflammatory disease (uveitis) and the use of oral tolerance: a status report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **778**: 325-337.
 50. Barnett, M.L., Combitchi, D., Trentham, D.E., 1996. A pilot trial of oral type II collagen in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **39**: 623-628.
 51. Weiner, H.L., Mackin, G.A., Matsui, M., Orav, E.J., Khoury, S.J., Dawson, D.M., Hafler, D.A., 1993. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science*, **259**: 1321-1324.
 52. Totsuka, M., Ametani, A., Kaminogawa, S., 1997. Fine mapping of T-cell determinants of bovine β -lactoglobulin. *Cytotechnology*, **25**: 101-113.
 53. 和田吉弘, 1995. α s1-カゼインおよびその部分ペプチドの経口投与による免疫寛容の誘導. 東京大学修士論文.
 54. Sun, J.B., Li, B.L., Czerkinsky, C., Holmgren, J., 2000. Enhanced immunological tolerance against allograft rejection by oral

administration of allogeneic antigen linked to cholera toxin B subunit. *Clin. Immunol.*, **97**: 130-139.

55. Sun, J.B., Holmgren, J., Czerkinsky, C., 1994. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10795-10799.
56. Sun, J.B., Xiao, B.G., Lindblad, M., Li, B.L., Link, H., Czerkinsky, C., Holmgren, J., 2000. Oral administration of cholera toxin B subunit conjugated to myelin basic protein protects against experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing transforming growth factor- β -secreting cells and suppressing chemokine expression. *Int. Immunol.*, **12**: 1449-1457.
57. Kweon, M.N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., Van Ginkel, F.W., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., Kiyono, H., 2002. A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J. Infect. Dis.*, **186**: 1261-1269.
58. Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T., Yuki, Y., 2001. Nasal immunization with E. coli verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine*, **19**: 2061-2070.
59. Yamamoto, S., Kiyono, H., Yamamoto, M., Imaoka, K., Fujihashi, K., Van Genkel, F.W., Noda, M., Takeda, Y., McGhee, J.R., 1997. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** 5267-5272.

60. Campbell, N., Yio, X.Y., So, L.P., Li, Y., Mayer, L., 1999. The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol. Rev.*, **172**: 315-324.
61. Abu-El-Asrar, A.M., Al-Kharashi, S.A., Al-Mansouri, S., Missotten, L., Geboes, K., 2001. Langerhans' cells in vernal keratoconjunctivitis express the costimulatory molecule B7-2 (CD86), but not B7-1 (CD80). *Eye*, **15**: 648-654.
62. Ford, A.L., Foulcher, E., Lemckert, F.A., Sedgwick, J.D., 1996. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J. Exp. Med.*, **184**: 1737-1745.
63. Iwasaki, A., Kelsall, B.L., 2001. Unique functions of CD11b⁺, CD8 α ⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**: 4884-4890.
64. Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G., Adorini, L., 1999. Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4⁺ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur. J. Immunol.*, **29**: 2705-2714.
65. Everson, M.P., McDuffie, D.S., Lemak, D.G., Koopman, W.J., McGhee, J.R., Beagley, K.W., 1996. Dendritic cells from different tissues induce production of different T cell cytokine profiles. *J. Leukoc. Biol.*, **59**: 494-498.
66. Everson, M.P., Lemak, D.G., McDuffie, D.S., Koopman, W.J., McGhee, J.R., Beagkey, K.W., 1998. Dendritic cells from Peyer's patch and spleen induce different T helper cell responses. *J. Interferon Cytokine Res.*, **18**: 103-115.
67. Iwasaki, A., Kelsall, B.L., 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the

- differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.*, **190**: 229-239.
68. Harper, H.M., Cochrane, L., Williams, N.A., 1996. The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance. *Immunology*, **89**: 449-456.
 69. Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A., Paul, W.E., 1986. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.*, **136**: 4538-4541.
 70. Ise, W., Totsuka, M., Sogawa, Y., Ametani, A., Hachimura, S., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., Kaminogawa, S., 2002. Naive CD4⁺ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J. Immunol.*, **168**: 3242-3250.
 71. Hashiguchi, M., Hachimura, S., Ametani, A., Kaminogawa, S., 2000. Th2 polarization enhanced by oral administration of higher doses of antigen. *Cytotechnology*, **33**: 237-245.
 72. Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A.O., 1995. The effect of antigen dose on CD4⁺ T helper cell phenotype development in a T cell receptor- $\alpha\beta$ -transgenic model. *J. Exp. Med.*, **182**: 1579-1584.
 73. Constant, S., Pfeiffer, C., Pasqualini, T., Bottomly, K., 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, **182**: 1591-1596.
 74. Rogers, P.R., Croft, M., 2000. CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen. *J. Immunol.*, **164**: 2955-2963.
 75. Ruedl, C., Bachmann, M.F., Kopf, M., 2000. The antigen dose

- determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. *Eur. J. Immunol.*, **30**: 2056-2064.
76. Owen, R.L., Pierce, N.F., Apple, R.T., Cray, W.C., Jr., 1986. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: A mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J. Infect. Dis.*, **153**: 1108-1118.
77. Owen, R.T., 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: An ultrastructural study. *Gastroenterology*, **72**: 440-451.
78. Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., Abbas, A.K., 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*, **6**: 411-417.
79. Eagar, T.N., Karandikar, N.J., Bluestone, J.A., Miller, S.D., 2002. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.*, **32**: 972-981.
80. Fowler, S., Powrie, F., 2002. CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance. *Eur. J. Immunol.*, **32**: 2997-3006.
81. Chen, Y., Ma, Y., 2002. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. *Immunology*, **105**: 171-180.
82. Samoilova, E.B., Horton, J.L., Zhang, H., Khoury, S.J., Weiner, H.L., Chen, Y., 1998. CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance. *Int. Immunol.*, **10**: 491-498.
83. Calvo, C.R., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., 1997. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-

- regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor ζ and ZAP70. *J. Exp. Med.*, **186**: 1645-1653.
84. Yoshida, T., Hachimura, S., Kaminogawa, S., 1997. The oral administration of low-dose antigen induces activation followed by tolerization, while high-dose antigen induces tolerance without activation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **82**: 207-215.
 85. Yoshida, T., Hachimura, S., Ishimori, M., Kinugasa, F., Ise, W., Totsuka, M., Ametani, A., Kaminogawa, S., 2002. Antigen presentation by Peyer's patch cells can induce both Th1- and Th2-type responses depending on antigen dosage, but a different cytokine response pattern from that of spleen cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**: 963-969.
 86. Yoshida, T., Hachimura, S., Ishimori, M., Ise, W., Totsuka, M., Ametani, A., Kaminogawa, S., (in press). Interleukin 12 and CD86 regulate Th1 and Th2 development induced by a range of antigen doses presented by Peyer's patch and spleen cells. *Cytotechnology*
 87. Wells, H.G., 1911. Studies on the chemistry of anaphylaxis (III). Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. *J. infect. dis.*, **9**: 147.
 88. Zittle, C.A., Cerbulis, J., Pepper, L., Della Monia, E.S., 1959. Preparation of calcium-sensitive α -casein. *J. Dairy Sci.*, **42**: 1897.
 89. Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D., Mosmann, T.R., 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.*, **166**: 1229-1244.
 90. Spitalny, G.L., Havell, E.A., 1984. Monoclonal antibody to murine

- gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities. *J. Exp. Med.*, **159**: 1560-1565.
91. Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Fiorentino, D.F., Leverah, J., Moore, K.W., Bond, M.W., 1990. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6 and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. *J. Immunol.*, **145**: 2938-2945.
 92. Abrams, J.S., Roncarolo, M.G., Yssel, H., Andersson, U., Gleich, G.J., Silver, J.E., 1992. Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: Immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples. *Immunol. Rev.*, **127**: 5-24.
 93. Dialynas, D.P., Wilde, D.B., Marrack, P., Pierres, A., Wall, K.A., Havran, W., Otten, G., Loken, M.R., Pierres, M., Kappler, J., et al., 1983. Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol. Rev.*, **74**: 29-56.
 94. Ledbetter, J.A., Herzenberg, L.A., 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.*, **47**: 63-90.
 95. Miller, A., Lider, O., Weiner, H.L., 1991. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J. Exp. Med.*, **174**: 791-798.
 96. Cripps, A.W., Dunkley, M.L., Clancy, R.L., Kyd, J., 1997. Vaccine strategies against *Pseudomonas aeruginosa* infection in the lung. *Behring Inst. Mitt.*, 262-268.
 97. Bae, S.J., Tanaka, Y., Hakugawa, J., Katayama, I., 1999. Interleukin-5

- involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. *J. Dermatol. Sci.*, **21**: 1-7.
98. Yokomizo, Y., Watanabe, F., Imada, Y., Inumaru, S., Yanaka, T., Tsuji, T., 2002. Mucosal immunoadjuvant activity of the low toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by *Bacillus brevis* for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **87**: 291-300.
99. Hsieh, C.-S., Macatonia, S.E., O'Garra, A., Murphy, K.M., 1995. T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. *J. Exp. Med.*, **181**: 713-721.
100. Murray, J.S., Madri, J., Tite, J., Carding, S.R., Bottomly, K., 1989. MHC control of CD4⁺ T cell subset activation. *J. Exp. Med.*, **170**: 2135-2140.
101. Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z.E., Stowring, L., Locksley, R.M., 1994. *Leishmania promastigotes* evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.*, **179**: 447-456.
102. Carreno, B.M., Collins, M., 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**: 29-53.
103. Kobata, T., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., 2000. Role of costimulatory molecules in autoimmunity. *Rev. Immunogenet.*, **2**: 74-80.
104. Salomon, B., Bluestone, J.A., 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*, **19**: 225-252.
105. Burstein, H.J., Shea, C.M., Abbas, A.K., 1992. Aqueous antigens induce *in vivo* tolerance selectively in IL-2- and IFN- γ -producing (Th1) cells. *J.*

Immunol., **148**: 3687-3691.

106. Karpus, W.J., Peterson, J.D., Miller, S.D., 1994. Anergy *in vivo*: down-regulation of antigen-specific CD4⁺ Th1 but not Th2 cytokine responses. *Int. Immunol.*, **6**: 721-30.
107. Williams, M.E., Shea, C.M., Lichtman, A.H., Abbas, A.K., 1992. Antigen receptor-mediated anergy in resting T lymphocytes and T cell clones. Correlation with lymphokine secretion patterns. *J. Immunol.*, **149**: 1921-1926.
108. Gilbert, K.M., Hoang, K.D., Weigle, W.O., 1990. Th1 and Th2 clones differ in their response to a tolerogenic signal. *J. Immunol.*, **144**: 2063-2071.
109. 橋口昌章, 2000. パイエル板細胞の免疫応答特性に関する研究. 東京大学博士論文.
110. Kellermann, S.-A., McEvoy, L.M., 2001. The Peyer's patch microenvironment suppresses T cell responses to chemokines and other stimuli. *J. Immunol.*, **167**: 682-690.
111. Sato, T., Sasahara, T., Nakamura, Y., Osaki, T., Hasegawa, T., Tadakura, T., Arata, Y., Kumagai, Y., Katsuki, M., Habu, S., 1994. Naive T cells can mediate delayed-type hypersensitivity response in T cell receptor transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, **24**: 1512-1516.
112. Lambrecht, B.N., 2001. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **1**: 51-59.
113. Hirahara, K., Hisatsune, T., Choi, C.Y., Kaminogawa, S., 1995. Profound immunological tolerance in the antibody response against bovine α s1-casein induced by intradermal administration of a dominant T cell determinant. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **76**: 12-18.
114. Miller, A., Zhang, Z.J., Sobel, R.A., Al-Sabbagh, A., Weiner, H.L., 1993.

Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. VI. Suppression of adoptively transferred disease and differential effects of oral vs. intravenous tolerization. *J. Neuroimmunol.*, **46**: 73-82.

115. Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**: 145-173.
116. Constant, S.L., Bottomly, K., 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 297-322.
117. Van Der Lubben, I.M., Konings, F.A., Borchard, G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 2001. *In vivo* uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. *J. Drug. Target.*, **9**: 39-47.
118. Hussain, N., Jaitley, V., Florence, A.T., 2001. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **50**: 107-142.
119. Ueda, Y., Hachimura, S., Somaya, T., Hisatsune, T., Kaminogawa, S., 2001. Apoptosis of antigen-specific T cells induced by oral administration of antigen: comparison of intestinal and non-intestinal immune organs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**: 1170-1174.
120. Shida, K., Hachimura, S., Ametani, A., Ishimori, M., Ling, M., Hashiguchi, M., Ueda, Y., Sato, T., Kumagai, Y., Takamizawa, K., Habu, S., Kaminogawa, S., 2000. Serum IgE response to orally ingested antigen: A novel IgE response model using allergen-specific T cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**: 788-795.

121. Kelsall, B.L., Strober, W., 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.*, **183**: 237-247.
122. Iwasaki, A., Kelsall, B.L., 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J. Exp. Med.*, **191**: 1381-1394.
123. Robertson, J.M., Jensen, P.E., Evavold, B.D., 2000. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J. Immunol.*, **164**: 4706-4712.
124. Maekawa, Y., Himeno, K., Ishikawa, H., Hisaeda, H., Sakai, T., Dainichi, T., Asao, T., Good, R.A., Katunuma, N., 1998. Switch of CD4⁺ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental Leishmaniasis. *J. Immunol.*, **160**: 2120-2127.
125. 佐藤あゆ子, 2003. パイエル板樹状細胞の免疫特性に関する研究. 東京大学博士論文.
126. Sato, A., Hachimura, S., Kaminogawa., (in press). Murine Peyer's patch dendritic cells prime naive CD4⁺ cells to produce interferon γ . *Cytotechnology*
127. Denning, G.M., 1996. IL-4 and IFN- γ synergistically increase total polymeric IgA receptor levels in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. *J. Immunol.*, **156**: 4807-4814.
128. Whitacre, C.C., Gienapp, I.E., Orosz, C.G., Bitar, D.M., 1991. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J. Immunol.*, **147**: 2155-2163.
129. Bruce, M.G., Ferguson, A., 1986. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen.

Immunology, **57**: 627-630.

130. Furrie, E., Turner, M.W., Strobel, S., 1994. Failure of SCID mice to generate an oral tolerogen after a feed of ovalbumin: a role for a functioning gut-associated lymphoid system. *Immunology*, **83**: 562-567.
131. Furrie, E., Turner, M.W., Strobel, S., 1995. Partial characterization of a circulating tolerogenic moiety which, after a feed of ovalbumin, suppresses delayed-type hypersensitivity in recipient mice. *Immunology*, **86**: 480-486.
132. Peng, H., Turner, M., Ferguson, A., 1990. The generation of a tolerogen after a feed of ovalbumin is time-dependent and unrelated to the serum level of immunoreactive protein. *Clin. Exp. Immunol.*, **81**: 510-515.
133. Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P.A., Hamann, A., Crispe, I.N., 2002. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN- γ -producing cells after intravenous protein immunization. *J. Immunol.*, **169**: 2407-2413.
134. Watanabe, T., Yoshida, M., Shirai, Y., Yamori, M., Yagita, H., Itoh, T., Chiba, T., Kita, T., Wakatsuki, Y., 2002. Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J. Immunol.*, **168**: 2188-2199.
135. Tsuji, N.M., Mizumachi, K., Kurisaki, J., 2001. IL-10 secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology*, **103**: 458-464.
136. Chaturvedi, P., Yu, Q., Southwood, S., Sette, A., Singh, B., 1996. Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells. *Int. Immunol.*, **8**: 745-755.
137. Ise, W., Totsuka, M., Takato, R., Hachimura, S., Sato, T., Ametani, A.,

- Kumagai, Y., Habu, S., Kaminogawa, S., 2000. Primary response of naive CD4(+) T cells to amino acid-substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns: Th1- and Th2-type cytokine secretion, and helper activity for antibody production without apparent cytokine secretion. *FEBS Letter*, **465**: 28-33.
138. Boutin, Y., Leitenberg, D., Tao, X., Bottomly, K., 1997. Distinct biochemical signals characterize agonist- and altered peptide ligand-induced differentiation of naive CD4⁺ T cells into Th1 and Th2 subsets. *J. Immunol.*, **159**: 5802-5809.
 139. Liu, H., Vignali, D.A., 1999. Differential CD3 ζ phosphorylation is not required for the induction of T cell antagonism by altered peptide ligands. *J. Immunol.*, **163**: 599-602.
 140. Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T.H., Allen, P.M., 1996. Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J. Exp. Med.*, **184**: 1525-1530.
 141. Nuriya, S., Yagita, H., Okumura, K., Azuma, M., 1996. The differential role of CD86 and CD80 co-stimulatory molecules in the induction and the effector phases of contact hypersensitivity. *Int. Immunol.*, **8**: 917-926.
 142. Gonnella, P.A., Chen, Y., Inobe, J., Komagata, Y., Quartulli, M., Weiner, H.L., 1998. *In situ* immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *J. Immunol.*, **160**: 4708-4718.
 143. Marth, T., Ring, S., Schulte, D., Klensch, N., Strober, W., Kelsall, B.L., Stallmach, A., Zeitz, M., 2000. Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, **30**: 3478-3486.

144. Nagata, S., McKenzie, C., Pender, S.L.F., Bajaj-Elliott, M., Fairclough, P.D., Walker-Smith, J.A., Monteleone, G., Macdonald, T.T., 2000. Human Peyer's patch T cells are sensitized to dietary antigen and display a Th cell type 1 cytokine profile. *J. Immunol.*, **165**: 5315-5321.
145. Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., Bernstein, G.M., Ke, X.Y., Rennert, P.D., Gray, G.S., Gribben, J.G., Nadler, L.M., 1995. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*, **2**: 523-532.
146. Ranger, A.M., Das, M.P., Kuchroo, V.K., Glimcher, L.H., 1996. B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. *Int. Immunol.*, **8**: 1549-1560.
147. Moser, M., 2001. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells *in vivo*. *Immunobiology*, **204**: 551-557.
148. Hibi, M., Hachimura, S., Ise, W., Sato, A., Yoshida, T., Takayama, T., Sasaki, K., Senga, T., Hashizume, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., (in press). Dendritic cells from spleen, mesenteric lymph node and Peyer's patch can induce both production of IL-4 and IFN- γ of naive CD4⁺ T cells in their primary culture, depending on antigen doses. *Cytotechnology*

要約

経口的に摂取した抗原に対しては、腸管に存在する免疫系細胞により、全身性の免疫系を刺激した場合とは異なった特徴的な免疫応答が誘導される。腸管は粘膜を介して極めて多量の抗原に常にさらされている。これらの抗原の中には食物のように生体に無害であり栄養源として積極的に体内に吸収するべきものと、ウィルスや細菌のように病原性を有し体内への侵入を防がなければならないものが混在している。免疫系は元来自己と非自己を識別し、非自己を排除するシステムであると考えられているが、腸管に存在する免疫系は自己・非自己のみでなく、無害と有害までも識別するための極めて高度な機構を備えている。

腸管免疫系において最も特徴的であるのは、全身性の免疫寛容現象である経口免疫寛容と局所的な免疫応答である IgA 産生の二面性である。経口免疫寛容とは経口的に摂取した抗原に対して誘導される全身性の免疫寛容である。経口免疫寛容は多量に摂取される食物抗原に対する過剰な免疫応答の誘導を抑制し、食品アレルギーを防ぐと考えられる。一方、IgA は血清中および粘膜上に分泌される抗体である。腸管においては微生物などの侵入を防ぐとともに、食品成分に対しても過剰な免疫応答を誘導する可能性のある抗原性が高い物質の侵入を妨げ、食品アレルギーを防ぐ働きを持つと考えられる。

このように経口抗原に対しては腸管で IgA の産生が誘導され、全身免疫系では経口免疫寛容の誘導により免疫応答が抑制される。しかし、経口抗原に対して免疫応答と免疫寛容の誘導がどのようにして制御されているかは未だ明らかになっていない。さらに、食品アレルギーの発症につながる IgE の産生を誘起するような免疫応答の誘導ではなく、粘膜防御に有効な IgA の産生を選択的に誘導するための制御機構に関しても未解明である。

これらの応答は全て投与された抗原に特異的に誘導されることから、抗原特異的な T 細胞が重要な役割を担っていると考えられる。抗原特異的な T 細胞の活性化には抗原提示細胞による抗原提示が必須であり、また抗原提示の条件によって T 細胞は様々な異なった機能を獲得して分化することが知られている。すなわち、経口抗原に対する免疫応答と寛容誘導の制御、さらには特徴的な免疫応答の誘導において抗原提示過程が重要であることが示唆される。また、これまでに経口抗原に対する免疫寛容の誘導に摂取する抗原量が大きな影響を与えることが示されているにもかかわらず、投与量の影響が系統的に調べられた研究は必ずしも多くはない。抗原提示の際に存在する抗原量がその後の T 細胞分化に影響を与えることが知られており、このことから経口抗原に対する特徴的な免疫応答の誘導に抗原提示が極めて重要であると考えられる。

近年、様々な免疫器官において異なった機能を持つ抗原提示細胞の存在が報告されている。これは、経口抗原に対して誘導される免疫応答や免疫寛容は腸管もしくは経口抗原が移行する他の免疫器官に存在する抗原提示細胞の持つ特徴的な機能によって制御されている可能性を示唆する。そこで、本研究では第一章において経口抗原の量を変化させることにより免疫応答と寛容誘導のバランスを制御出来ることを示すとともに、第二章および第三章で主要な腸管免疫器官であるパイエル板に存在する抗原提示細胞の機能を分子レベルで解析し、異なった量の抗原による腸管免疫応答の制御における抗原提示細胞の役割を検討した。

1. 抗原の少量経口投与は T 細胞の活性化後に免疫寛容を誘導するのに対し、多量経口投与は活性化を誘導せずに免疫寛容を誘導する

経口抗原の量が免疫寛容の誘導機構に影響を与えることが知られている。そこで、経口抗原に対する免疫応答と免疫寛容の誘導における抗原量の影響を明らかにするために、牛乳タンパク質である α s1-カゼインを、

投与量を変えてマウスに経口投与し、誘導される経口免疫寛容および免疫応答の活性化を詳細に検討した。

α s1-カゼインを生理食塩水に溶解し経口ゾンデを用いてマウスに 0.01-10 mg ずつ 2-3 日間隔で各群計 4 回経口投与した。その結果、0.01 および 0.1 mg といった少量の抗原を経口投与したマウスの脾臓に IFN- γ 産生細胞が誘導された。一方で、1 mg 以上の比較的多量の抗原の投与によっては投与量が増加するにつれて IFN- γ 産生細胞の誘導は減少した。少量の抗原で誘導された IFN- γ 産生は Th1 型の CD4⁺ T 細胞によるものであった。Th1 細胞はウィルスの排除や腸管粘膜への IgA 分泌に必須な分泌成分の合成促進に関与している。さらに、食品アレルギーには Th2 細胞の産生する IL-4 が関与しており、Th1 細胞は Th2 細胞の応答を抑制する働きを持つことも知られている。また、0.01 mg といった極めて少量の抗原を 4 回投与したマウスを含む全てのマウスにおいて経口免疫寛容が誘導されていた。これらの結果は、少量の抗原の経口投与は T 細胞の活性化と同時にもしくは活性化に引き続いて免疫寛容を誘導するのに対し、多量の抗原の経口投与は免疫系の活性化を伴わずに免疫寛容を誘導することを示している。また、これらの応答は投与する抗原の総量ではなく、一回の投与量により制御されていることも明らかにした。

本研究で得られた知見は、経口抗原の投与量を調節することにより、誘導される免疫応答と免疫寛容のバランスを制御出来ることを示している。このような経口抗原の量の変化による免疫応答と免疫寛容の制御に、抗原提示細胞の機能が重要な役割を持つと考えられることから、第二章、第三章では経口抗原を取り込み、抗原提示を行う抗原提示細胞の機能と、誘導される応答との関係を検討した。

2. パイエル板は経口投与抗原を効率的に取り込み、全身免疫系とは異なった機能を有する抗原提示細胞が特徴的な免疫応答を誘導する

はじめに、蛍光物質で標識したタンパク質抗原を、量を変化させてマウスに経口投与し、種々の免疫器官における抗原の取り込みを評価した。その結果、腸管免疫器官であるパイエル板において少量投与においても強い取り込みが認められた。一方、全身免疫系の主要な器官である脾臓には経口投与後も抗原の移行はほとんど認められなかった。しかし、これまでに経口抗原に対して脾臓においても抗原特異的 T 細胞の活性化やアポトーシスが報告されていることから、多量の抗原を経口投与した場合には極めて少量ながら抗原が存在するか、もしくは抗原を取り込んだ細胞が移行すると考えられる。

次に、腸管免疫器官であり経口抗原の取り込みが最も盛んであったパイエル板と全身免疫器官である脾臓の抗原提示細胞を用いて抗原提示機能を比較した。パイエル板および脾臓細胞によって T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニックマウスの脾臓より調製した抗原未感作 T 細胞に *in vitro* で抗原提示を行った。抗原未感作 T 細胞は抗原刺激の際の条件により様々な異なった機能を獲得してエフェクター細胞へ分化する性質を持つため、抗原提示細胞の機能を解析するために極めて有用な細胞である。TCR トランスジェニックマウスは抗原特異的な抗原未感作 T 細胞を多量に調製することができることから、本研究に不可欠であった。

実験の結果、パイエル板および脾臓のいずれの細胞によっても免疫寛容は誘導されなかったが、それぞれ異なった T 細胞の分化を誘導した。パイエル板細胞は脾臓細胞と比較して Th1 細胞への分化を優位に誘導した。また、これらの細胞をさらに B 細胞と非 B 細胞に分画した結果、パイエル板、脾臓由来 B 細胞は共に Th2 細胞を誘導したのに対し、非 B 細胞はパイエル板由来細胞は Th1 細胞を脾臓由来細胞は弱い Th2 細胞を誘導した。さらに、パイエル板 B 細胞と脾臓非 B 細胞または脾臓 B 細胞とパイエル板非 B 細胞を混合するといずれの組み合わせでも Th1 細胞を誘導し、単独の場合とは全く異なった機能を発揮することが明らか

となった。これらの結果は、パイエル板に存在する抗原提示細胞の持つ固有の機能が経口抗原に対する免疫応答の誘導に重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究では免疫寛容を誘導する抗原提示細胞を同定することは出来なかったが、蛍光標識タンパク質を用いた実験でパイエル板以外にも肝臓に抗原の取り込みが認められたことから、肝臓に存在する抗原提示細胞の機能が経口免疫寛容の誘導に何らかの役割を持っている可能性が考えられる。

3. パイエル板の抗原提示細胞は抗原濃度に依存して全身免疫系の抗原提示細胞とは異なった T 細胞分化を誘導する

パイエル板と脾臓の抗原提示細胞の機能は異なっており、それらの細胞が経口抗原に対する特徴的な免疫応答の誘導に関与すると考えられた。そこで経口抗原の量の変化による腸管免疫応答の制御におけるパイエル板と脾臓の抗原提示細胞の関与を検討した。第二章と同様な *in vitro* の実験系を用い様々な濃度の抗原存在下で抗原提示を行った。その結果、パイエル板および脾臓細胞は抗原濃度依存性は異なっているものの、抗原濃度の変化に伴い Th1 および Th2 のいずれの細胞への分化も誘導した。パイエル板細胞は 0.01-1 μM および 100 μM の抗原の存在下で Th1 細胞の分化を誘導し、10 μM では Th2 細胞を誘導した。一方、脾臓細胞は 0.1-1 μM で Th2 細胞を誘導し、100 μM では Th1 細胞を弱く誘導した。

この結果は、パイエル板では極めて高い濃度で抗原が存在する場合にのみ Th2 応答が強く誘導され、またその濃度範囲は狭く限定されている一方で、脾臓では比較的低濃度の抗原の存在下で広い範囲にわたって Th2 応答が誘導されることを示している。脾臓における経口抗原に対する Th2 応答の誘導が食品アレルギーに関与している可能性が考えられる。一方、パイエル板で誘導される Th1 応答は IgA 分泌に関わる分泌成分の

発現誘導に関与するかもしれない。

また、抗原提示細胞の産生する IL-12 はパイエル板および脾臓細胞のいずれにおいても Th1 細胞への分化の誘導には必須であったが、Th2 細胞の誘導における抗原濃度依存性にはほとんど影響を与えなかった。抗原提示細胞上に発現する補助刺激分子である CD86 は抗原濃度に依存した Th1 細胞の分化誘導に重要な役割を持ち、抗体により CD86 の機能を阻害するとパイエル板および脾臓細胞による Th1 細胞誘導能に差異がなくなり、全ての抗原濃度において同様に高レベルで誘導されるようになった。一方、Th2 細胞の分化に対しては CD86 は抗原濃度依存性に影響を与えることなく、全体的に分化を促進した。

これらの結果より、抗原濃度に依存した Th1 細胞および Th2 細胞の分化は独立に制御されており、抗原濃度の変化により抗原提示細胞の機能が変化することによって、異なった T 細胞分化が誘導されることが示された。

本研究により、経口投与抗原により誘導される免疫応答と免疫寛容は経口投与する抗原量を変化させることによって制御できることが示された。さらに、抗原量依存的な腸管免疫応答の誘導にパイエル板や、脾臓、肝臓などの抗原提示細胞の特有な機能が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これは、食品アレルギーの予防のみでなく、粘膜ワクチンの開発や経口免疫寛容の誘導を利用した自己免疫疾患の治療においても極めて有用な知見である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇切なるご指導と暖かい励ましのお言葉を賜りました，東京大学大学院農学生命科学研究科上野川修一教授に深く尊敬と感謝の意を表します。

研究開始当初より本論文をまとめるにいたるまで，免疫学の基礎から研究の方針，実験方法まで全ての面において懇切丁寧なるご指導をして頂きました，東京大学大学院農学生命科学研究科八村敏志助教授に心より感謝いたします。

論文作成に際し，貴重な時間を割いて多くのご指導と励ましのお言葉を頂きました，Department of Immune Regulation, Torrey Pines Institute for Molecular Studies の飴谷章夫博士に深く感謝いたします。

実験的手法や研究の指針について，的確なご指導を頂きました，東京大学大学院農学生命科学研究科戸塚護助教授に深く感謝いたします。

実験計画や実験結果に関する貴重なご助言をいただきました，東京大学大学院新領域創成科学研究科久恒辰博助教授に深く感謝の意を表します。

実験方法や実験結果に関して多くの相談に快く乗ってくれました，東京大学大学院農学生命科学研究科伊勢渉助手に深く感謝いたします。

多忙な中貴重な時間を割いて本論文の審査をしていただき，また適切なご指導を賜りました，東京大学大学院農学生命科学研究科清水誠教授ならびに田之倉優教授に心より感謝いたします。

本研究を遂行する上で不可欠であった OVA23-3 マウスを供与していただきました，東海大学医学部免疫学教室の垣生園子博士，佐藤健人博

士ならびに日本医科大学微生物免疫学教室の熊谷善博博士に深く感謝いたします。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマおよび精製モノクローナル抗体を供与していただいた，順天堂大学医学部奥村康博士ならびに八木田秀雄博士に深く感謝いたします。

フローサイトメーターの使用を許可して頂きました，東京大学大学院生物生産工学研究センターの方々に感謝いたします。

X 線照射装置を快く使用させて下さいました，東京大学大学院医学系研究科免疫学教室の諸先生方に感謝いたします。

本研究における実験の一部分を共同で行ってくれた，衣笠文貴さんならびに石杜美奈さんに感謝いたします。

研究者としての良いお手本となり，また私生活の上でも多くの励ましの言葉を下さった，高橋宜聖博士に深く感謝いたします。

実験手法や実験計画，さらには日常のことまで様々な相談につきあってくれました，橋口昌章博士に深く感謝いたします。

現職に就任後も，快く本研究を継続させて下さり，また数々のご指導や励ましのお言葉を頂きました，東京農工大学農学部高橋幸資教授ならびに服部誠助教授に心より感謝いたします。

最後に研究，生活すべてにおいてお世話になりました，東京大学食品生化学研究室の皆様ならびに東京農工大学食品化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

2003 年 3 月

好田 正