

修 士 論 文

食物アレルギーに対する経口免疫寛容に及ぼすストレスの影響の研究

Effect of stress on oral tolerance against ovalbumin as a food allergen
in mice

広島女学院大学大学院人間生活学研究科生活科学専攻

高松 寛子

Takamatsu Hiroko

目 次

緒 言	1
実験方法	4
実験結果	10
考 察	15
謝 辞	23
参考文献	24
要 約	29

【緒 言】

近年、日本では飛躍的な経済の発展と食生活の向上とともに、アレルギーを発症する人も急増している。アレルギーとは、ある特定の物質に対して免疫機構が異常に反応することをいい、アレルギーを引き起こす原因となる物質をアレルゲンという(1)。食物を摂取することにより、生体に様々な病的徴候を引き起こすことを“Adverse Reaction to Food”(ARF)とよび、このうち非毒性のもので免疫を介する反応が食物アレルギーとされている(2)。

食物アレルゲンの代表的なものには鶏卵、牛乳、小麦がある(3)。特に鶏卵は良質なタンパク質を含み、高い栄養価と消化吸収性を有する食品として評価されているが、乳幼児期に発症頻度の高い食物アレルゲンでもある(4)。しかし、食物アレルギーは誰にでも起こるものではない。本来、生体には経口的に摂取した食物成分に対して、免疫反応を抑制しようとする経口免疫寛容機構(oral tolerance)が腸管組織に備わっている(5,6)(図1)。経口から摂取した食物によって引き起こされる食物アレルギーの発症機構においては、この経口免疫寛容機構がうまく働いていないために引き起こされるとも考えられている(7)。従って、乳幼児期の食物アレルギーが学童期までに寛解することが多い理由として、成育に伴う消化管の成長と適切な経口免疫寛容の成立によるものが考えられている。

これまでの経口免疫寛容と栄養状態に関する研究では、中程度のタンパク質欠乏状態、および高タンパク質栄養状態が与える影響について調べられ、高タンパク質栄養状態においては血清中のIgEの産生能が亢進するという結果が得られている(8)。また、食物抗原であるオボアルブミン(卵白アルブミン)に対する免疫寛容に与える食餌タンパク質の影響についても調べ、通常のタンパク質食よりも低タンパク質食を与えたマウスにおいて卵白アルブミンに対する経口免疫寛容を誘導するという結果が得られている(9)。さらに、経口免疫寛容を誘導したマウスにおいて、誘導しなかったマウスと比較して、抗体産生量が1/100~1/1,000に低下するという報告もある(10)。このような背景から、経口免疫寛容を利用した治療が、最近、花粉症に対するものを中心に行われている。例えば、花粉症やダニアレルギーの治療において、これらの疾患の抗原

を薄めたカプセルを患者に経口的に投与することで抗原特異性 IgE の産生を抑制する試みである (11)。また、ミエリン塩基性蛋白 (myelin basic protein : MBP) やコラーゲンタイプ II を大量に経口投与することで全身系における自己抗原特異的免疫応答を抑制し、多発性硬化症や関節リウマチの予防もしくは疾病の進行を抑制しようという試みも展開されつつある (12)。

食物アレルギーを起こす人でも、アレルゲンが体内に進入すると、常にアレルギー反応を起こすわけではなく、そのときの体調によって起こしたり、起こさなかったりすることが知られている。このことは、アレルゲンの量的な暴露以外にもアレルギー症状の強さを決める要因となるものがあり、それを取り除くことで食物アレルギーを起こす割合を減少させる可能性があることを示唆している。その要因のひとつの可能性に、ストレスが挙げられる。ストレスは、体の内外から受けるストレス要因 (ストレッサー) により、肉体的、精神的な疲労が蓄積された状態である (13)。また、ストレスは、免疫力を低下させることが解明されており、アレルギーの発症において、重要な原因となっているものと考えられている (図 2)。

これまでのアレルギーとストレスに関する研究では、免疫系において、ヘルパー T 細胞活性が液性免疫優位に傾き、IL-4 産生の増強を経て、IgA、IgE 産生の亢進がもたらされやすい状況が存在することが示唆されている。また、ストレスは腸管免疫系と密接な関係を有することが知られており、抗原刺激によって粘膜上皮や血管の透過性が変化することも報告されている (14)。

しかし、ストレスと食物アレルギー、特に経口免疫寛容との関係についての研究は、ほとんどなされていない。そこで本研究では、日常的に多くの人を経験していると思われる軽度のストレス負荷を想定し、実験動物としてマウスを使用し、1 日 1 時間という軽度の拘束ストレスを負荷し、食物アレルギーに対する経口免疫寛容に及ぼす影響について、種々の免疫学的指標に加えて組織学的手法も加味して検討を行った。本研究では、経口免疫寛容を誘導した実験動物として、主要な食物アレルゲンであるオボアルブミンを用いてモデル動物を作成し、ストレス負荷を行うものを行わない群に分け、一定の飼育期間の終了後に採取した血清中の総 IgE 濃度およびオボアルブミンに対する特異的抗体価として IgE、IgG、IgG₁ および IgG_{2a} を測定した。また、脾臓リンパ球培養上清

中のオボアルブミンに対する IL-4、IFN- γ の産生量、さらに腸管組織におけるストレス負荷強度を小腸の空腸粘膜組織観察と小腸パイエル板のヘマトキシリン・エオジン染色による観察を行うことにより、食物アレルギーに対する経口免疫寛容の誘導能にストレスがどのように関与しているかを解析した。本研究で取り上げた経口免疫寛容機構は、喘息や花粉症の患者を対象に、アレルギー症状の寛解を図る免疫療法として展開してきている。そこで、経口免疫寛容を利用したアレルギー治療の最新の知見と今後の展望についても整理した。

【実験方法】

1. 実験動物

BALB/c AnNCrj マウス（初体重 12～17g、4 週齢、雌；日本チャールズ・リバー株式会社）を実験動物として使用した。

2. 実験動物の飼育

1 週間の予備飼育後、マウスを N 群、I 群、O 群、T 群の 4 群に分け、ストレス負荷を行う群と行わない群の計 8 群に分類した。実験中、ストレス負荷を与える群では、毎日、マウスを図 3 に示す細い管の中に、1 時間、閉じ込めることによる拘束ストレスを与えた。なお、実験期間中、飼料として MF と水は自由摂取させた（表 1）。また、摂食量は毎日、体重は 3 日に 1 回測定した。

3. 経口免疫寛容の誘導

オボアルブミンに対する経口免疫寛容の誘導は、図 4 に示す免疫スケジュールに従って行った。ストレス負荷の開始から 1 週間後に抗原タンパク質として 5 mg のオボアルブミンを含む水溶液（0.5ml）を 1 日 1 回、4 日間連続して胃内に強制的に経口投与した（図 5）。最初の経口投与から 1 週間後に硫酸カリウムアルミニウム 12 水和物をアジュバンドとした 5 μ g の卵白アルブミン（0.25 ml）を腹腔内に投与することにより免疫し（図 6）、さらにその 2 週間後に同様の方法で第 2 回目の腹腔免疫を行った。このように処置したマウスは、オボアルブミンに対して経口免疫寛容が誘導された動物となり、T 群とした。なお、対照群として蒸留水を経口投与し、オボアルブミンを腹腔免疫した群を I 群とした。また、腹腔免疫を行わず、蒸留水を経口投与した群を N 群とし、オボアルブミンを経口投与した群を O 群とした。

4. 解剖と採血

マウスの飼育終了後、麻酔下で解剖し、下大静脈より血液を採取した。採取した血液は、遠心により血球と血清に分離し、血清を - 80 で凍結保存した。

5. 小腸粘膜の組織観察、および小腸パイエル板の組織染色

マウスの小腸の空腸部分を採取し、解剖バサミで粘膜領域を開き、ストレスによる出血の有無を確認するためにデジタルカメラで写真撮影した。また、パイエル版を付属する小腸の一部は、リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液にて組織固定し、4℃で保存した。固定した組織は、アルコール・キシレン系で脱水し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した小腸組織は、ミクロトームにより 4 µm の超薄切片とし、ゼラチンコーティングしたスライドガラスに付着させた。スライドガラス上の組織切片は、ヘマトキシリンとエオジンにより染色した。組織染色した小腸パイエル板を光学顕微鏡下で写真撮影した。

6. 脾臓リンパ球の調製と培養

マウスから脾臓を採取し、7ml のハンクス液 (Sigma 社) を入れた 10cm の無菌シャーレの中に入れた。その後、クリーンベンチ内で、脾臓細胞をステンレス製のメッシュで磨砕し、浮遊細胞を調整した。そのようにして得られた脾臓細胞の懸濁液を 15ml 容のポリプロピレンチューブに入れ、1,200rpm で 10 分間遠心し、上澄み液を取り除いた。上澄み液を取り除いた脾臓細胞から赤血球を取り除くために、157mM の塩化アンモニウム溶液を 7ml 加え、室温で 5 分間静置することにより赤血球を溶血させた。その後 7ml のハンクス液を加え、1,200rpm で 10 分間遠心し、上澄み液を取り除いた。このようにして得られた脾臓細胞を、10% の FBS (Sigma 社) 、50 µM の 2 -メルカプタエタノール (Sigma 社) および 1/100 容 Antibiotic - Antimycotic Mixed Stock Solution (ナカライテスク) になるように添加した Hepes modified RPMI1640 培地 (RPMI164 培養培地) (Sigma 社) 2ml に浮遊させた。脾臓細胞浮遊液の細胞濃度は、25 µl をハンクス液で 20 倍に希釈し、その 75 µl に同量の 0.4% トリパンブルー溶液 (Sigma 社) を加え、トリパンブルーの色素を排除する生細胞を光学顕微鏡下でカウントすることにより求めた。各群から得られた脾臓細胞は、RPMI164 培養培地で 6×10^6 cell / ml になるように調整し、各 1ml を組織培養用マイクロプレート (24well ; IWAKI) の各穴に分注し、50 µl のオボアルブミン (8mg/ml) を添加し、5% CO₂ 37℃ 条件下で、無菌的に 72 時間培養した。

7. 栄養状態の評価

実験期間中のマウスの栄養状態を評価するため、血清中のアルブミン濃度と総タンパク質濃度をアルブミン・グロブリン比測定用 A/G B-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。アルブミン濃度は、検体（血清 0.01 ml + 発色試液 2.5ml）、標準（標準血清 0.01ml + 発色試液 2.5ml）および試薬盲検（発色試液 2.5ml）を室温に 10 分間放置し、試薬盲検を対照として検体および標準（1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0g/dl）の吸光度を 630nm で測定した。測定した標準の吸光度より検量線を作成し、検体のアルブミン濃度を算出した。総タンパク質濃度は、検体（血清 0.05ml + 発色試液 2.5ml）、標準（血清 0.05ml + 発色試液 2.5ml）および試薬盲検（蒸留水 0.05ml + 発色試液 2.5ml）を室温に 30 分間放置し、試薬盲検を対照として検体および標準（1.6、3.2、4.8、6.4、8.0、11.9g/dl）の吸光度を 540nm で測定した。測定した標準の吸光度より検量線を作成し、検体の総タンパク質濃度を算出した。

8. 血清中の総 IgE 濃度の測定

血清中の総 IgE 濃度は二抗体サンドイッチ ELISA 法（enzyme-linked immunosorbent assay）により測定した（図 7）。ELISA プレート（96 well；IWAKI）に一次抗体として 50 mM carbonate buffer（pH 9.6）で希釈した rat antimouse IgE（2 μ g/ml；Yamasa）100 μ l を添加し固相化させるために室温で 30 分間振とう後、4℃で一晩静置させた。その後 TBS-T で 4 回ウェル内を洗浄し、3% BSA 200 μ l で 1.5 時間の室温処理により、ブロッキングを行った。ウェル内を洗浄後、PMSF、EDTA・3Na および 10^{-5} M Leupeptin 含有の 20 mM Tris-HCl（pH 7.2）で希釈したマウスの血清（N 群および O 群；20 倍希釈、I 群および T 群；50 倍希釈）および monoclonal mouse IgE 標準液（0、6.25、12.5、25、50、100、200、400ng/ml；Yamasa）のそれぞれを 100 μ l 添加し、1.5 時間室温で反応させ、ウェル内を洗浄後、二次抗体として Biotinylated rat antimouse IgE（1 μ g/ml；Yamasa）100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Avidin-biotin-alkaline phosphate complex（Vectastain）100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Blue Phos Substrate solution（KPL）100 μ l を添加し発色反応を開始し、適切な発色が認められた

時点で Blue Phos Stop solution (KPL) 100 μ l を添加し反応を停止した。発色の程度はイムノミニ NJ-2300 (システムインスツルメンツ株式会社) を用いて 620nm で測定し、血清中の総 IgE 濃度を monoclonal mouse IgE 標準液の標準曲線より算出した。

9. オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE、IgG、IgG₁ および IgG_{2a} の測定

オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE、IgG、IgG₁ および IgG_{2a} は ELISA 法により測定した (図 7)。ELISA プレートに 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した 100 μ l のオボアルブミン (100 μ g/ml) を添加し、室温で 30 分間振とう後、4 で一晩静置させた。その後 TBS-T で 4 回ウェル内を洗浄し、3% BSA 200 μ l で 1.5 時間室温で処理することにより、ブロッキングを行った。ウェル内を洗浄後、PMSF、EDTA・3Na および 10^{-5} M Leupeptin 含有の 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) で希釈したマウスの血清 (オボアルブミンに特異的な血清中の抗体価 IgE; 20 倍希釈、IgG; 4000 倍希釈、IgG₁; 4000 倍希釈、IgG_{2a}; 50 倍希釈) 100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Biotinylated antimouse IgE rat monoclonal antibody (1 μ g/ml; Yamasa) antimouse IgG horse serum (1 μ g/ml; Vectastain) antimouse IgG₁ rat monoclonal antibody (1 μ g/ml; BD PharMingen) もしくは antimouse IgG_{2a} rat monoclonal antibody (1 μ g/ml; BD PharMingen) 100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。これ以降は血清中の総 IgE 濃度の測定と同様の手順で行い、イムノミニ NJ2300 を用いて 620nm で吸光度を求めた。

10. 脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する IL-4 産生量の測定

脾臓リンパ球培養上清中の IL-4 の産生量は二抗体サンドイッチ ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) により測定した (図 7)。脾臓リンパ球培養上清は、OVA で刺激したものと、OVA で刺激しなかったものを全ての群で測定した。ELISA プレート (96 well; IWAKI) に一次抗体として 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した Rat antimouse IL-4 (0.5mg/ml; PharMingen) を固相化させるために室温で 30 分間振とう後、4 で一晩静置させた。その後、TBS-T で 4 回ウェル内を洗浄し、3 % BSA 200 μ l で室温で 1.5 時間処理するこ

とにより、ブロッキングを行った。ウェル内を洗浄後、PMSF、EDTA・3Na および 10^{-5} M Leupeptin 含有の 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) で希釈した脾臓リンパ球培養上清と Monoclonal murine IL-4 標準液 (0、12.5、25、50、75、100ng/ml ; PEPRO TECH) のそれぞれを 100 μ l 添加し、4 で一晩静置させた。ウェル内を洗浄後、二次抗体として Biotinylated rat antimouse IL-4 (0.5mg/ml ; PharMingen) 100 μ l を添加し室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Avidin-biotin-alkaline phosphatase complex (Vectastain) 100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Blue Phos Substrate solution (KPL) 100 μ l を添加し、発色反応を開始し、適切な発色が認められた時点で Blue Phos Stop solution (KPL) 100 μ l を添加し反応を停止した。発色の程度はイムノミニ NJ-2300 (システムインスツルメンツ株式会社) を用いて 620nm で測定し、脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに反応する IL-4 の産生量を Monoclonal murine IL-4 標準液の標準曲線より算出した。

11. 脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに反応する INF- γ 産生量の測定

脾臓リンパ球培養上清中の INF- γ の産生量は二抗体サンドイッチ ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) により測定した (図 7)。脾臓リンパ球培養上清は、OVA で刺激したものと、OVA で刺激しなかったものを全ての群で測定した。ELISA プレート (96 well ; IWAKI) に一次抗体として 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した Purified rat anti-mouse INF- γ (0.5mg/ml ; BD Pharmingen) を固相化させるために室温で 30 分間振とう後、4 で一晩静置させた。その後、TBS-T で 4 回ウェル内を洗浄し、3 % BSA 200 μ l 室温で 1.5 時間ブロッキングを行った。ウェル内を洗浄後、PMSF、EDTA・3Na および 10^{-5} M Leupeptin 含有の 20mM Tris-HCl (pH 7.2) で希釈したマウスの脾リンパ球培養上清と RECOMBINANT MOUSE INF- γ 標準液 (0、12.5、25、50、75、100ng/ml ; serotec) のそれぞれを 100 μ l 添加し、4 で一晩静置させ、ウェル内を洗浄後、二次抗体として Biotinylated rat antimouse INF- γ (0.5mg/ml ; PharMingen) 100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、avidin-biotin-alkaline phosphatase complex (Vectastain) 100 μ l を添加し、室温で 1.5 時間反応させた。ウェル内を洗浄後、Blue Phos Substrate solution

(KPL)100 μ l を添加し発色反応を開始し、適切な発色が認められた時点で Blue Phos Stop solution (KPL) 100 μ l を添加し反応を停止した。発色の程度はイムノミニ NJ-2300 (システムインスツルメンツ株式会社) を用いて 620 nm で測定し、脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに対する応答性としての INF- γ の産生量を RECOMBINANT MOUSE INF- γ 標準液の標準曲線より算出した。

【実験結果】

1. 実験動物の摂食量および体重変化

実験期間中における各群のマウス 1 群当たりの 1 日の摂食量を図 8 に示す。ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに、腹腔免疫を行った群（I 群、T 群）で腹腔免疫後に摂食量の低下が認められた。一方、腹腔免疫を行っていない群（N 群、O 群）においては、摂食量に変化は認められなかった。各群のマウスの体重変化を図 9 に示す。ストレス負荷を行った群、行っていない群ともにゆるやかな体重の増加が認められた。また、実験終了時には、I 群と O 群で、ストレス負荷を行った群がストレスを行っていない群に比べて、わずかに体重が低かった。

2. 実験動物の栄養状態

実験動物の飼育期間中の栄養状態を評価するため、血清中の総タンパク質濃度およびアルブミン濃度を測定し、その結果を図 10 に示す。総タンパク質濃度は、I 群および O 群で、ストレス負荷を行った群より行わなかった群のほうが若干低かった。また、アルブミン濃度は N 群でストレス負荷を行った群が行わなかった群より若干低かった。しかし、いずれの実験群の血清中の総タンパク質濃度およびアルブミン濃度は、基準値の範囲内にあり、栄養状態は良好だったと判定した。また、拘束ストレスの負荷や腹腔内免疫による影響も最小限の範囲と思われた。

3. 小腸の組織学的観察

実験動物のストレスの程度を判定するため、小腸を十二指腸末端より空腸方向の 10cm を切除し、腸管粘膜を解剖バサミで開き、観察した（図 11-14）。視覚的には、ストレス負荷の有無に関わらず、出血などの強いストレス負荷により観察される病変はなく、今回の拘束ストレス負荷の強度は、軽度のものであったと判断した。

パイエル板を付属する小腸を組織固定し、パラフィン超薄切片をヘマトキシリン・エオジン染色により、光学顕微鏡下で観察した（図 15-19）。小腸に付属

するパイエル板の大きさには差があるが、オボアルブミンを免疫した I 群で組織の肥厚と固有層の発達を観察されたが、経口免疫寛容を誘導した T 群では、腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) に近い状態であった。

また、各群ともストレス負荷を行った群の方がストレス負荷を行っていない群よりも固有層の発達が観察された。

4. 実験動物の脾臓重量および脾臓細胞数

実験動物の経口免疫寛容の誘導能と脾臓重量および脾臓細胞数に相違が確認できるかどうかを評価するため、脾臓重量および脾臓細胞数の測定をした (図 19、20)。その結果、腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) に比べ、腹腔免疫を行った群 (I 群) で、脾臓重量が高い結果が得られ、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) では、I 群に比較して低く抑制されていた。ストレスの有無で比較すると、O 群を除いて、各群ともストレス負荷を行わなかった群で、脾臓重量が高いことが認められた。

脾臓細胞数は、腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) に比較して、腹腔免疫を行った群 (I 群) では、脾臓細胞数が多いことが認められた。経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) では、脾臓細胞数の抑制がみられた。ストレスの有無で比較すると、O 群を除いて、各群ともストレス負荷を行わなかった群の方が、脾臓細胞数が多いことが認められた。

5. 血清中の総 IgE 濃度

血清中の総 IgE 濃度を二抗体サンドイッチ ELISA 法により測定した結果を図 21 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) においては、オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず、総 IgE 濃度は基準値に範囲内であった。オボアルブミンを免疫した群 (I 群) において、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに総 IgE 濃度の上昇がみられた。一方、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに総 IgE 濃度の上昇の抑制がみられたが、ストレス負荷を行った群において、ストレス負荷を行わなかった群よりも有意な上昇を示した。

6. オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE、IgG、IgG₁ および IgG_{2a}

(1) オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE

血清中のオボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE を ELISA 法により測定し、図 21 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) においては、オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず、抗体価の上昇がみられなかったが、オボアルブミンを免疫した群 (I 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇がみられた。一方、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇の強い抑制がみられた。

(2) オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG

血清中のオボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG を ELISA 法により測定し、図 22 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) においては、オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇がみられなかったが、オボアルブミンを免疫した群 (I 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇がみられた。一方、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) においては、抗体価の上昇の抑制がみられた。

(3) オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG₁

血清中の卵白アルブミンに対する特異的抗体価 IgG₁ を ELISA 法により測定し、図 22 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) においては、オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇はみられなかったが、オボアルブミンを免疫した群 (I 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇がみられた。一方、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇が抑制された。

(4) オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG_{2a}

血清中のオボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG_{2a} を ELISA 法により測定し、

図 23 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群、0 群) においては、オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇はみられなかった。オボアルブミンを免疫した群 (I 群) および経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) においては、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに抗体価の上昇がみられた。

(5) 脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する IL-4 産生量

脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する IL-4 産生量の測定を行った結果を図 24 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群、0 群) において、オボアルブミンの経口投与の有無に関わらず、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに高い IL-4 の産生量がみられたが、ストレス負荷を行っていない群の方がストレス負荷を行った群よりも IL-4 の産生量が有意に高かった。また、脾臓リンパ球をオボアルブミン刺激した群と刺激していない群ともに IL-4 の産生量は高かった。オボアルブミンを免疫した群 (I 群) では、脾臓リンパ球をオボアルブミンで刺激した群で IL-4 の産生がみられ、ストレスを負荷した群の方が負荷しなかった群より IL-4 の産生量が高かった。また、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) では、IL-4 の産生が脾臓リンパ球のオボアルブミン刺激の有無に関わらず抑制されており、ストレス負荷を行った群の方が行っていない群よりも抑制されていた。さらに、オボアルブミンを免疫した群 (I 群) と経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) を、脾臓リンパ球のオボアルブミン刺激の有無で IL-4 の産生量を比較すると、各群とも、オボアルブミンで刺激した群の方がオボアルブミンで刺激していない群よりも、IL-4 の産生が高く、特に I 群で IL-4 の産生量が高かった (図 25)。

(6) 脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する INF- γ 産生量

脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する INF- γ 産生量の測定し、図 26 に示す。腹腔免疫を行っていない群 (N 群) において、刺激した群と脾臓リンパ球をオボアルブミン刺激していない群ともに IFN- γ の産生が確認された。また、ストレス負荷を行った群、行っていない群ともに IFN- γ の産生がみられたが、ストレス負荷を行っていない群の方がストレス負荷を行った群よりも産

生量は高かった。腹腔免疫を行っていない群（0 群）において、ストレス負荷を行っていない群で、オボアルブミン刺激した群と刺激していない群ともに INF- γ の産生が若干みられた。腹腔免疫を行った群（1 群）では、いずれも INF- γ の産生がみられなかった。経口免疫寛容を誘導した群（T 群）では、オボアルブミンで刺激していない群では INF- γ の産生はみられなかったが、オボアルブミンで刺激し、ストレス負荷を行った群では INF- γ の産生がわずかにみられた。

【考 察】

1. 拘束ストレスが経口免疫寛容に及ぼす影響

経口免疫寛容とは腸管組織に備わっており、生体にとって不必要な免疫反応を抑制する機構である。食物アレルギーの発症機構においては、この経口免疫寛容の破綻により引き起こされるとも考えられている(15)。食物アレルギーとなる主な食品には鶏卵、牛乳、小麦などがあり、特に鶏卵に対するアレルギーは乳幼児期に発症し、学童期以降に寛解する場合が多く、これは成長に伴う消化管の発達と適切な経口免疫寛容の成立によるものと考えられている。

食物や花粉など、本来は生体に障害を及ぼすことがない異物の場合、生体の抗原提示細胞は、リンパ球を活性化することなく、これらの抗原の侵入を無視するか、または少量の IL-4 や IL-10 などのサイトカインを産生する Th2 細胞を誘導するにとどまっている。つまり、Th1 (IFN- γ) と Th2 (IL-4、IL-10) のサイトカインによる液性免疫は、互いに抑制しあうことで過剰な免疫応答を予防し、自己免疫疾患やアレルギーなどの自己障害を引き起こさないようにバランスを保っている。このように、経口免疫寛容の発現機序に関しては、現在のところ T 細胞を中心とした免疫応答を抑制するような調節性 T 細胞が関わっているとの考えに加えて、ヘルパー T 細胞の不応答化 (アネルギー) または選択的な細胞死 (アポトーシス) により説明されることもある (16)。

生体に必要な食物を取り込む腸管では、過剰な免疫応答を抑制するための特殊に分化した経口免疫寛容システムが構築されている (17)。食物抗原に対する経口免疫寛容の詳細な機構は不明な点が多いものの、血中特異抗体応答、遅延型過敏反応、脾臓・リンパ節の抗原特異的 T 細胞からのサイトカイン産生応答の低下によることが、動物実験を通して報告されている (10)。また、生体が受ける様々なストレスも、経口免疫寛容に何らかの影響を及ぼす要因となっているかもしれない。生体にストレスが負荷されることにより、内分泌系の視床下部 - 下垂体 - 副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA 軸) が活性化されると、副腎皮質からグルココルチコイドが分泌される。体外からのストレスの程度が強まるとグルココルチコイドはさらに多量に分泌されるようになり、胸腺の萎縮やリンパ球の機能低下を招くといわれている (18-20)。また、拘束ストレス

を負荷する研究により、脾臓リンパ球数の減少や、抗原刺激による IL-2 や IL-4 の産生量の増加などが確認されていることから、ストレスは免疫機能と深く関わりあっている (21)。

本研究では、食物アレルゲンに対する経口免疫寛容に及ぼすストレスの影響を実験動物としてマウスを用い、ストレス負荷を行う群と行わない群に分け、経口免疫寛容の誘導能の相違を血清中の抗体価の測定と、脾臓リンパ球によるサイトカインの産生量を測定することにより行った。実験動物には BALB/c マウスの雌を使用した。BALB/c マウスは IgG₁、IgA、IgE などの Ig 量が高値で、Th2 サイトカインの免疫反応が高いため、アレルギーを研究する分野において広く使用されている (22)。また、経口免疫寛容を誘導するための抗原タンパク質は、免疫応答が良好なオボアルブミンを用いた。なお、実験群の中で蒸留水を経口投与しオボアルブミンで腹腔免疫を行った I 群はオボアルブミンを免疫された動物となり、経口投与および腹腔免疫ともにオボアルブミンで行った T 群は、オボアルブミンに対する経口免疫寛容が誘導された動物となった。

実験期間中のマウスの摂食量については、腹腔免疫を行った群で第一回目と第二回目の腹腔免疫直後に低下がみられたが、体重の減少に反映されることはなかった。また、マウスの体重は系統により異なり、雌で 18~40 g となっていることから、本研究で飼育したマウスの成長は良好と思われるが、ストレス負荷を行った群のほうが行わなかった群に比べて上昇がやや少なく、ストレス負荷の影響があったと考えられた。また、血清中の総タンパク質濃度およびアルブミン濃度の基準値は BALB/c マウスの雌の場合、それぞれ 4.2 ± 0.1 g/dl、 2.4 ± 0.1 g/dl とされている (23)。血清アルブミン濃度において、本研究で飼育したマウスで若干の高値を示したが顕著な差はなく、実験期間中の各群のマウスの栄養状態は良好であったと思われた。しかし、ストレス負荷を行った群と行わない群で比較すると、総タンパク質濃度では O 群と I 群で差が見られ、アルブミン濃度では N 群で差がみられ、マウスの栄養状態にわずかながらストレス負荷の影響があったと考えられる。

血清中の総 IgE 濃度において、オボアルブミンを免疫した群 (I 群) で総 IgE 濃度の上昇がみられた。IgE 抗体は血中に数 ng/ml 程度しか存在しないが、強力な生物活性を持つ免疫グロブリンである (24)。アレルギーの発症機構におい

では、IgE 抗体が肥満細胞上の FcεRI 受容体に結合し、そこに抗原(アレルゲン)が結合することにより、2 個の IgE 抗体が架橋されると、肥満細胞内にシグナルが伝わり、脱顆粒が引き起こされる(24)。従って、血清中の総 IgE 濃度の強い上昇がみられた場合、アレルゲンの暴露によりアレルギー症状を引き起こしやすくなると考えられる。これまでのアレルギーとストレスに関する研究では、ヘルパーT 細胞の活性化により液性免疫優位に傾き、IL-4 産生の増強を経て、形質細胞が産生する IgE 産生へのクラススイッチの誘導がもたらされやすい状況が示唆されている。今回の研究で、経口免疫寛容を誘導した群(T 群)においては、ストレス負荷を行った群、行わなかった群ともに総 IgE 濃度の上昇の抑制がみられたが、ストレス負荷を行った群においてストレス負荷を行わなかった群よりも、総 IgE 濃度の有意に高値を示したことから、ストレス負荷を行った群で経口免疫寛容の誘導が抑制されたと考えられる。

オボアルブミンに対する血清中の特異的抗体価 IgE においては、オボアルブミンを免疫した群(I 群)で抗体価の上昇がみられ、経口免疫寛容を誘導した群(T 群)においては、ストレス負荷を行った群、行わなかった群ともに総 IgE 濃度の上昇の抑制がみられた。I 群と T 群のオボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE の比率から求めた経口免疫寛容指数を比較すると、ストレス負荷を行った群においてストレス負荷を行わなかった群よりも経口免疫寛容の誘導性が低かった。このことから、血清総 IgE 濃度の場合と同様に、ストレス負荷を行った群においてストレス負荷を行わなかった群よりも経口免疫寛容の誘導性が低くなっていることを示していた。

オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG においては、経口免疫寛容を誘導した群(T 群)で、ストレス負荷を行った群、行わない群ともに有意に抗体価の上昇の抑制がみられた。ストレス負荷を行った群と行わなかった群を比較すると、ストレス負荷を行った群で高い抗体価を示した。食物アレルゲンに対する特異的抗体価 IgG は、食物アレルギー患者のほとんどに検出される抗体であるが、経口免疫寛容を誘導した群で抗体価の上昇が抑制されたことから、食物アレルゲンに対する経口免疫寛容との関連性の強さが示唆された。また、ストレス負荷の影響については、I 群と T 群のオボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG の比率から求めた経口免疫寛容指数の比較において、ストレス負荷を行

った群がストレス負荷を行わなかった群よりも、経口免疫寛容の誘導性が低かった。このことから、特異的抗体価 IgG においてもストレス負荷を行った群で経口免疫寛容が誘導されやすい可能性があると考えられた。一方、オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG₁ においては、経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) で、ストレス負荷を行った群、行わなかった群ともに抗体価の上昇の抑制がみられた。通常、IgG₁ 抗体は抗原暴露早期に産生するものであり、IgG 抗体の中で血清中に含まれる濃度が最も高いため、特異的抗体価 IgG と同様の傾向を示したともと思われる (25, 26)。

オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgG_{2a} においては、オボアルブミンを免疫した群 (I 群) および経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) で同程度の抗体価の上昇がみられ、他の抗体と著しく異なる変化がみられた。I 群と T 群の抗体価の比率から求めた経口免疫寛容指数でも他の抗体とは異なり、ストレス負荷を行った群においてストレス負荷を行わなかった群よりも、経口免疫寛容の誘導性が高かった。IgG_{2a} 抗体は、IgM のクラススイッチにより産生される抗体であり、このクラススイッチには IL-4 が重要な役割を果たしている。IL-4 は、主に Th2 細胞や肥満細胞から産生され、IgE や IgG₁ 抗体の産生を促進し、IgG_{2a} へのクラススイッチを抑制する作用がある (27, 28)。このことは IgG_{2a} 抗体の上昇がみられる場合は、生体内での IL-4 の産生が低いことが予想され、アレルギー患者がアレルギー症状を引き起こしにくい状況となっていることが考えられるが、今回の研究において、I 群と T 群で抗体価 IgG_{2a} の値に顕著な差はなく、IgG_{2a} 抗体と経口免疫寛容機構の誘導やストレス負荷による影響に顕著な関連性は見受けられなかった。

今回の研究では、脾臓から調整したリンパ球を *in vitro* で培養し、培養上清中のオボアルブミンに対する応答して産生する IL-4 と IFN- γ も測定した。まず IL-4 については、全ての群の脾臓から調整したリンパ球で IL-4 の産生が認められたが、脾臓リンパ球をオボアルブミン刺激した群とオボアルブミン刺激していない群ともに、腹腔免疫を行っていない群 (N 群、O 群) で産生量が高かった。また、脾臓リンパ球をオボアルブミンで刺激し、腹腔免疫を行った I 群を除いて、全ての群でストレス負荷を行わなかった群の方がストレス負荷を行った群よりも IL-4 の産生量が高かった。IL-4 は抗体を産生する形質細胞に対

して IgE 産生にクラススイッチを誘導する強力なサイトカインであり、アレルギーの発症と進展に深く関わっているとされる。IL-4 は、*in vitro* で多彩な生物活性を示すものの、IL-4 ノックアウトマウスを用いた研究では、マウスの系統差や実験条件の違いにより相反する成績が報告され、一定した見解が得られていないものもある(29)。今回の研究では、さらに腹腔免疫を行った I 群と T 群について、オボアルブミンで脾臓リンパ球を刺激したものからオボアルブミンで刺激しなかったものを差し引いた IL-4 の産生量をストレス負荷の有無で比較した。その結果、各群ともオボアルブミンで刺激したリンパ球がオボアルブミンで刺激しなかったものより IL-4 の産生量が高かった。また、経口免疫寛容を誘導した T 群で、I 群よりも IL-4 の産生量の抑制がみられた。このような結果から、IL-4 の産生量と経口免疫寛容機構の誘導とに関連性があることが認められた。

次に脾臓リンパ球の培養上清中のオボアルブミンに応答して産生される IFN- γ では、腹腔免疫を行っていない群(N 群、O 群)のみで検出された。特に O 群において、オボアルブミンの刺激の有無に関わらず、ストレス負荷を行わなかった群のみで IFN- γ の産生がみられた。IFN- γ は Th1 細胞から産生され、マクロファージを活性化し、遅延型アレルギー反応を誘導する作用を有する。また、Th2 細胞の増殖を阻害し、IL-4、5、10 などの Th2 サイトカインの産生を抑制することも知られているが、今回の研究の結果では、IFN- γ の産生と経口免疫寛容の誘導能やストレス応答に直接関連するものはなかった(29)。

以上の研究より、総合的にはストレス負荷を行った群と行わなかった群で、食物アレルギーに対する抗体価の産生が高いことが示唆された。特にストレス負荷により、IgE 産生の亢進が示唆された。また、ストレスの暴露は、腸管免疫系と密接な関係を有することが知られており、抗原刺激によって粘膜上皮や血管の透過性が変化する機序への影響などの免疫促進作用が報告されている。一方、ストレスの強度や個体のストレスへの対応能力により、免疫作用が抑制される場合があることも報告されている(14)。ストレスの負荷に対するマウスの感受性には個体差があると思われるが、全体的にストレスの影響と思われる抗体価の上昇が認められ、経口免疫寛容の誘導性にも抑制的に働くものと示唆された。

2. 経口免疫寛容を利用した治療の現状と実際

経口免疫寛容の発現機序には、抗原の量にも依存している。以前より、喘息や花粉症の患者を対象に、少量の抗原を皮下注射することによって症状の寛解を図る免疫療法が行われてきた。このアレルゲン（アレルゲン）を投与することにより脱感作を行う免疫療法の作用機序は、ごく少量の抗原により種々の調節性 T 細胞が直接あるいは IL-10 や TGF- β を介して、能動的に抗原特異的な T 細胞の増殖を抑制するためと考えられている。一方、食物アレルギーにおいても、少量の食物抗原を経口的に与えることによって、経口免疫寛容を誘導し、アレルギー症状の寛解を図る免疫療法が試みられてきている（21）。生体に本来備わっている経口免疫寛容機構を利用したアレルギーの治療は、副作用の低い治療法として、現在、その活用が期待されている。

上述の少量の抗原を投与することにより脱感作を誘導する免疫療法とは対照的であるが、抗原を大量に与えることにより食物アレルギーの症状がどのように変化するのかを検討した報告がある（16）。アナフィラキシー症状のない鶏卵アレルギー患者に対して、患者家族の十分な了解を得て抗原となる鶏卵を大量に、かつ連続的に投与した結果、鶏卵に対するアレルギー症状は悪化することではなく、むしろ一部の患者で症状が軽快したというものである。この研究例では、大量の抗原に T 細胞が曝露された結果、T 細胞のアポトーシスが誘導されたり、T 細胞がアレルギーを引き起こしたために、鶏卵に対する免疫寛容が誘導されたのではないかと考えられている。この報告から抗原物質を大量に、しかも連続的に与えることによって経口免疫寛容を誘導し、それによって症状が軽症した例が認められたことは、食物アレルギーの積極的治療の一つとして大きな意義があると思われる。

しかしながら、経口的な免疫療法は、抗原そのものを治療に用いるため、生体への危険性も考慮しなければならない。また、抗原を長期間にわたって、頻回に投与しなければならず、アレルギーをもつ患者への身体的・精神的負担は大きいだろう。従って、使用する抗原の量とともに、抗原の形態にも工夫することで、経口的な免疫療法をより安全に、より効率良く行うことができるようにする必要があると思われる。

このような現状から、細菌やウイルスの遺伝子に特有の塩基配列である CpG

モチーフを利用したワクチンの開発がアレルギー性疾患をはじめ、癌や感染症の治療の分野で注目されている。CpG モチーフとは、中心部にシトシン（C）とグアニン（G）が並び、合計で 6 塩基からなる特殊な塩基配列のことである。哺乳類にも CpG 配列が DNA に存在するが、存在がわずかであることと、シトシン残基がメチル化されているため、哺乳類の自己 DNA には反応せず、細菌の DNA のみを認識し、病原体を排除する免疫システムが働くことになる（30）。この免疫システムを利用して、DNA ワクチンに CpG 配列を組み込ませることで、ワクチンの免疫刺激性を高めるというものである。なお、この DNA ワクチンには、メチル化されていない非メチル化 CpG 配列が使用されている。細菌由来の DNA を認識するメカニズムには、Toll-like レセプター（TLR）が重要な働きをしている。細菌などの異物に対するマクロファージや樹状細胞の貪食作用による自然免疫反応が生体防御の初期段階で重要な役割を担っているが、この貪食作用において異物の認識に関与している分子が TLR である。細菌などの微生物には、哺乳類に存在しない分子構造（Pathogen associated molecular patterns：PAMPs）が認められ、TLR は PAMPs を認識して自然免疫を活性化していると考えられている。TLR にはそれぞれ特有の PAMPs を認識することが知られており、ヒトでは、現在、10 種類の TLR が確認されている。このうちの TLR9 は、細菌由来 DNA および非メチル化 CpG モチーフを有する合成オリゴヌクレオチド（CpG ODN）の認識レセプターであることが確認されている（31）。従って、TLR9 を介した免疫反応は、自然免疫系を活性化させ細菌などに対する防御反応を惹起させるだけでなく、Th1 反応を誘導することから、感染症、癌、アレルギーなどで活用されることが期待されている（図 27）。

DNA ワクチンは、それ自体には感染性がないと考えられ、ワクチンの設計方法も従来のものより簡便であり、また副作用の危険性も低いことから、研究開発が進められている分野である（32）。アレルギー性疾患の分野では、減感作療法が一定の評価を受けて治療に使用されているが、減感作療法を安全に行うためには標準化されたアレルゲンエキ스가必須である。日本では、唯一、スギ花粉エキ스가標準化されたアレルゲンとして市販されているのみである。また、減感作療法には、活性のあるアレルゲンをそのまま投与することによるアナフィラキシーなどの副作用の発生の危険性や長期間にわたる頻回のアレルゲン投

与が必要となっているため、患者に負担をかける治療でもある。そこで、遺伝子工学の視点から、アレルゲン改変体の作製による免疫療法の一つとして CpG ODN を結合させたアレルゲンによるアジュバンド免疫療法が実用化に向けて開発されている (33)。研究に使用されている ODN は、phosphorothioate 化した ODN (通称 S-オリゴ) で、DNA を生体内へ投与すると DNase によってすみやかに分解されてしまうため、S-オリゴは核酸のリン酸基部位にある酸素元素を硫黄元素に置換するで DNase の作用を受けにくくしている。また、生体内の安定性が高いことからアンチセンス製剤にも使用されている (34)。

実験動物を使って、CpG ODN とオボアルブミンを結合させたものを経口投与させたところ、抗原特異的 Th1 反応が誘導され、経口ワクチンとして有用であるという報告がある (35)。この報告では、抗原としてオボアルブミンを使用しているが、CpG ODN に結合させる抗原をアレルギー性疾患の原因物質に変えることによって、様々なアレルギー性疾患に応用することができるのではないかと期待される。ブタクサ花粉症に対して、ブタクサ抗原と CpG ODN 結合体の臨床効果について検討された報告では、花粉シーズンにブタクサ抗原 CpG ODN 結合体を週 1 回 12 週間皮下投与すると、翌年の花粉シーズンで鼻炎と喘息症状がプラセボ群よりも有意に改善している (36)。この報告では、皮下投与の方法をとっているが、抗原と CpG ODN との結合体が個々のアレルギー性疾患へ有用であることが確認され、その効果が長期間持続するという有用性も確認された。

ところで、経口免疫寛容の成立に関与すると考えられているパイエル板に選択的かつ多数存在するプラズマサイトイド樹状細胞群についての研究も、近年、進められている。プラズマサイトイド樹状細胞は、Ⅱ型 IFN を作る細胞として末梢血中に 0.05% しか存在しないが、経口免疫寛容が成立しない IL-18 マウスや無菌マウスでは、このプラズマサイトイド樹状細胞の比率が低下していたとの報告もある (37)。今後、このような樹状細胞にも注目した経口免疫寛容を利用した治療も、さらに開発されていくものと推察する。

今回の研究で取り上げた経口免疫寛容機構に関して、いまだ不明な点も多く、さらなる研究が進められることが期待されるが、経口免疫寛容機構を利用した治療法は、視点を変えて、様々な方法で開発されてきている。抗原そのものを摂取することによる減感作療法をはじめ、サイトカインの働きに着目した抗ア

レルギー剤や DNA ワクチンの開発など、経口免疫寛容機構に関わる、食物アレルギーの治療の幅を広げていくことになると推測する。

【参考文献】

(1) 坂井堅太郎：食物アレルギーの実態と食生活、食物アレルギーがわかる本、上田伸男編、日本評論社、東京（1999）3-12.

(2) Foschi FG, Marsigli L, Chiappelli F, Kung MA, Bernardi M, Stefanini GF. (2000) Adverse reaction to food. *In: Nutrition and Immunology Principles and Practice (Gershwin ME, German JB, Keen CL, eds)*, 233-247. Humana Press Inc, New Jersey.

(3) 飯倉洋治（委員長）：食物アレルギー対策検討委員会 平成 10 年度報告書（1999）17.

(4) 飯倉洋治（委員長）：食物アレルギー対策検討委員会 平成 10 年度報告書（1999）28.

(5) 上野川修一：最近の食物アレルギーの考え方、食物アレルギーの手引き 正しい知識と治療、食生活指導、馬場 實・中川武正編、南江堂、東京（1995）1-11.

(6) 上野川修一、八村敏志：経口免疫寛容の機序と自己免疫疾患・アレルギーの発症抑制、Annual Review 免疫 1997 C、菊池浩吉・矢田純一・奥村 康編、中外医学社、東京（1996）409-416

(7) 坂井堅太郎：食べ物のアレルギーと食生活、'03（第21回）広島女学院大学公開セミナー論集 現代社会の食と健康を考える、広島女学院大学生生活科学部生活科学科編、広島女学院大学総合研究所、広島（2004）33-48.

- (8) Yoshino K, Sakai K, Okada H, Sakai T, Yamamoto S. (2003) IgE Responses in Mice Fed Moderate Protein Deficient and High Protein Diets. *J N Sci Vitaminol* 49:172-178
- (9) Satter MA, Sakai K, Ahmed S, Yoshino K, Yamamoto S, Shimizu Y, Ota F. (2002) Low-Protein Diet Induces Oral Tolerance to Ovalbumin in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 48:51-58
- (10) 上野川修一編集：食品とからだ - 免疫・アレルギーのしくみ、朝倉書店、東京 (2003) 153
- (11) 上野川修一：入門ビジュアルサイエンス からだとアレルギーのしくみ、日本実業出版社、東京 (1998) 156-157.
- (12) 清野 宏：粘膜免疫と経口免疫寛容、標準免疫学、谷口 克・宮坂昌之編、医学書院、東京 (2002) 316-326.
- (13) 上田伸男：食物アレルギーを起こす要因、食物アレルギーがわかる本、上田伸男編、日本評論社、東京 (1999) 63.
- (14) 深田順一：情動ストレスと腸管免疫、食物アレルギーの最前線、名倉宏編、医歯薬出版株式会社、東京 (1999) 66-70.
- (15) 足立 (中嶋) はるよ、上野川修一：食物アレルギーと腸管免疫システム、アレルギー科 (2000) 9(1): 89-96.
- (16) 近藤直美：食物アレルギーと経口免疫寛容、医学のあゆみ、出版、Vol198、No.13、東京 (2001) 883-887

- (17) 伊藤浩明：腸内細菌叢とアレルギーの発症、臨床栄養 Vol.107 No.3、医歯薬出版株式会社、東京（2005） 289-294
- (18) 村瀬元康：拘束ストレスがラットの炎症性細胞浸潤に及ぼす影響、愛知学院大学歯学会誌 35、愛知（1997） 125-138
- (19) Okimura T, Nigo Y (1986) Stress and immune responses. I. Suppression of T cell function in restraint-stressed mice. *Jpn J Pharmacol* 40 : 505-511
- (20) Okimura T, Satomi-Sasaki Y, Ohkuma S (1986) Stress and immune responses. Identification of stress-sensitive cell in murine spleen cells. *Jpn J Pharmacol* 40 : 513-525
- (21) 柘植郁哉、宇理須厚雄：アレルギーの臨床 No.319、北隆館、東京（2004） 34-37
- (22) 須藤カツ子・辻紘一郎：動物実験の準備、初心者のための動物実験手技、鈴木 潔編、講談社サイエンティフィク、東京（1995） 1-13.
- (23) 早川純一郎：マウス、実験動物学、田嶋嘉雄監修、朝倉書店、東京（1991） 300-327.
- (24) 谷口 克：抗体の認識・特異性と機能、標準免疫学、谷口 克・宮坂昌之編、医学書院、東京（2002） 73-84.
- (25) 小田島安平・飯倉洋治：食物アレルギーの検査法、食物アレルギーがわかる本、上田伸男編、日本評論社、東京（1999） 35-44.
- (26) 上野川修一：入門ビジュアルサイエンス からだと免疫のしくみ、日本実業出版社、東京（1996） 82-83.

- (27)高津聖志：サイトカインとその受容体、標準免疫学、谷口 克・宮坂昌之編、医学書院、東京（2002）273-288.
- (28)義江 修：ケモカインとその受容体、標準免疫学、谷口 克・宮坂昌之編、医学書院、東京（2002）289-299.
- (29)森田寛 他：アレルギーナビゲーター、メディカルレビュー社、東京(2001) 210-211 .
- (30)加藤厚、松本建治：B 細胞の TLR9 を介するサイトカイン、ケモカイン産生、臨床免疫 40 (3)、科学評論社、東京（2003）288 293.
- (31) Hemmi H,Takeuchi O,Kawai T,et al . A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA . *Nature* 2000 ; 408:740
- (32)荻原清文、多田富雄：免疫機能の調節と臨床への応用 その2 DNA ワクチン：医薬の門 2002
- (33)安枝浩：序 アレルゲン特異的治療法の確立を目指して、アレルギー・免疫 Vol.13、 No3、医薬ジャーナル社、大阪（2006）9-10
- (34)加藤厚、松本建治：B 細胞の TLR9 を介するサイトカイン、ケモカイン産生、臨床免疫 40 (3)、科学評論社、東京（2003）288 293
- (35)Reiko Teshima ,Haruyo Okunuki ,Yuji Sato ,Hiroshi Akiyama ,Tamio Maitani and Jun-ichi Sawada : *Allergology International* (2006) 55:43-48
- (36) Tulic , M.K.et.al : *J.Allergy Clin. Immunol* (2004) : 235-241

(37)辻典子：パイエル板に発現する誘導型免疫制御性細胞の機能成熟と自然免疫シグナル、文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究 免疫監視の基盤とその維持・制御 成果報告（2005）

【謝 辞】

本研究を行うにあたり、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました広島女学院大学の瀬山一正教授、坂井堅太郎准教授に感謝を申し上げます。また、マウスの拘束ストレスについてご助言を賜りました鈴峯女子短期大学の東元稔教授に感謝を申し上げます。

【要 約】

食物アレルギーとは経口的に摂取した食物成分に対して免疫機構が異常に反応することをいい、食物アレルゲンと IgE 抗体が結合し、肥満細胞に含まれているヒスタミンなどの物質が放出されることにより誘発される。しかし、本来生体には経口的に摂取した食物成分に対しては、免疫反応を抑制しようとする経口免疫寛容機構が腸管組織に備わっている。このことから、食物アレルギーの根本的な発症機構においては、食物に対する経口免疫寛容機構の破綻により引き起こされるとも理解されている。経口免疫寛容を誘導したマウスは、誘導しなかったマウスと比較して、増大する抗体の量が 1/100 ~ 1/1000 に低下することが実験で示されている。また、食物アレルギー症状を起こす人でも、アレルゲンが体内に入ると常にアレルギー反応を示すわけではなく、そのときの体調によって起こしたり、起こさなかったりする。このことは、アレルゲン以外にも要因となるものがあり、それを取り除くことで食物アレルギー症状を起こす割合を減少させる可能性が示唆されている。その要因の 1 つに、ストレスがあげられる。ストレス刺激は、視床下部や下垂体を介して免疫系に影響を与えることが分かっている。これに伴い、ストレスとアレルギー症状との関連等についての報告が多く発表されているが、ストレスと経口免疫寛容についての研究はほとんどない。

そこで本研究では、食物アレルゲンに対する経口免疫寛容に及ぼすストレスの影響を検討することを目的とし、ストレス負荷を行う群と行わない群に分け、飼育した実験動物において、食物アレルゲンに対する経口免疫寛容の誘導能の相違を解析した。

実験動物 (BALB/c マウス・4 週齢・雌) を一週間予備飼育した後、ストレスに対する経口免疫寛容の誘導能の相違を解析した。マウスを N 群、I 群、O 群、T 群の 4 群に分類し、ストレス負荷を行う群と行わない群の計 8 群に分類した。実験中、ストレス負荷を与える群では、毎日 1 時間の拘束ストレスを与え、実験終了後、マウスは屠殺し採血した。なお実験期間中、飼料として MF と水は自由摂取させた。

ストレス負荷開始から 1 週間後に抗原タンパク質として 5 mg のオボアルブミンを含む水溶液 (0.5 ml) を 1 日 1 回、4 日間連続して胃内に強制的に経口投与した。最初の経口投与から 1 週間後に硫酸カリウムアルミニウム 12 水和物をアジュバン

ドとした 5 μ g のオボアルブミン (0.25 ml) を腹腔内に免疫し、さらにその 2 週間後に同様の方法で第 2 回目の腹腔免疫を行った。第 2 回目の腹腔免疫の 1 週間後に実験動物を解剖し、下大静脈より血液を採取した。採取した血液は血清と血球に分離し、血清中の総 IgE 濃度を二抗体サンドイッチ ELISA 法、オボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE、IgG、IgG₁ および IgG_{2a} を ELISA 法により測定した。また、脾リンパ球を培養し、脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する IL-4 産生量と INF - γ 産生量を測定した。

さらに、実験動物に対するストレス負荷強度を規定するために、腸管組織における組織学的観察を行った。

実験動物に対するストレス負荷強度を規定するために行った、腸管組織における組織学的観察から、今回行った拘束ストレスは軽度のものであったと判断した。

血清中の総 IgE 濃度を二抗体サンドイッチ ELISA 法により測定した結果、オボアルブミンで腹腔免疫のみを行った群 (I 群) では、ストレス負荷を行わなかった群、行った群ともに血清総 IgE 濃度の上昇がみられた。一方、経口投与、腹腔免疫ともにオボアルブミンで行い経口免疫寛容を誘導した群 (T 群) においては、I 群と比較して、ストレス負荷を行わなかった群、行った群ともに総 IgE 濃度の上昇の抑制がみられ、特にストレス負荷を行わなかった群は定常レベルまで抑制された。また有意差も見られたため、経口免疫寛容がストレスによって抑制されたと考えられる。

また特異的抗体価 IgE、IgG、IgG₁ ではオボアルブミンに対する特異的抗体価 IgE、IgG、IgG₁ においては、I 群、T 群の両群で抗体価の上昇がみられ、T 群においては、ストレス負荷を行った群、行わなかった群ともに特異的 IgE、IgG、IgG₁ 濃度の上昇の抑制がみられた。ストレス負荷を行った群のほうが行わなかった群よりも、やや高値を示した。このことから、オボアルブミンを免疫した場合での抗体価の上昇はストレス負荷を行うことで高くなる可能性が示唆される。

特異的抗体価 IgG_{2a} においては、I 群、および T 群で同程度の抗体価の上昇がみられ、他の抗体価と異なる結果となった。I 群のストレス負荷を行った群が上昇しているように見えるが、これは個体差によるものと考えられる。IgG_{2a} 抗体の上昇がみられる場合は、IL - 4 の産生が少なくアレルギー反応を引き起こしにくいと考えられているので、今回の研究においては、I 群と T 群で抗体価の値に顕著な差

はみられず、IgG_{2a} 抗体と経口免疫寛容機構の誘導に関しての関連性は見受けられなかった。また、ストレス負荷による影響も見受けられなかった。

脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する IL-4 産生量の測定から、I 群、T 群ともにストレス負荷した群の方が負荷しなかった群よりも IL-4 の産生量が高かった。また、脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答する INF- γ 産生量の測定から、I 群では INF- γ の産生がみられなかった。T 群では、ストレス負荷を行った群で INF- γ の産生がみられたが、その産生の程度が他の測定したサイトカインよりも低かった。

以上の結果から、ストレス負荷を行った群と行わなかった群で、常に、抗体価の上昇程度やサイトカインの産生量に有意な差が確認できたというのではないが、ストレス負荷を行った群の方が、ストレス負荷を行わなかった群よりも、食物アレルギーの発症を引き起こす可能性が高くなると示唆された。

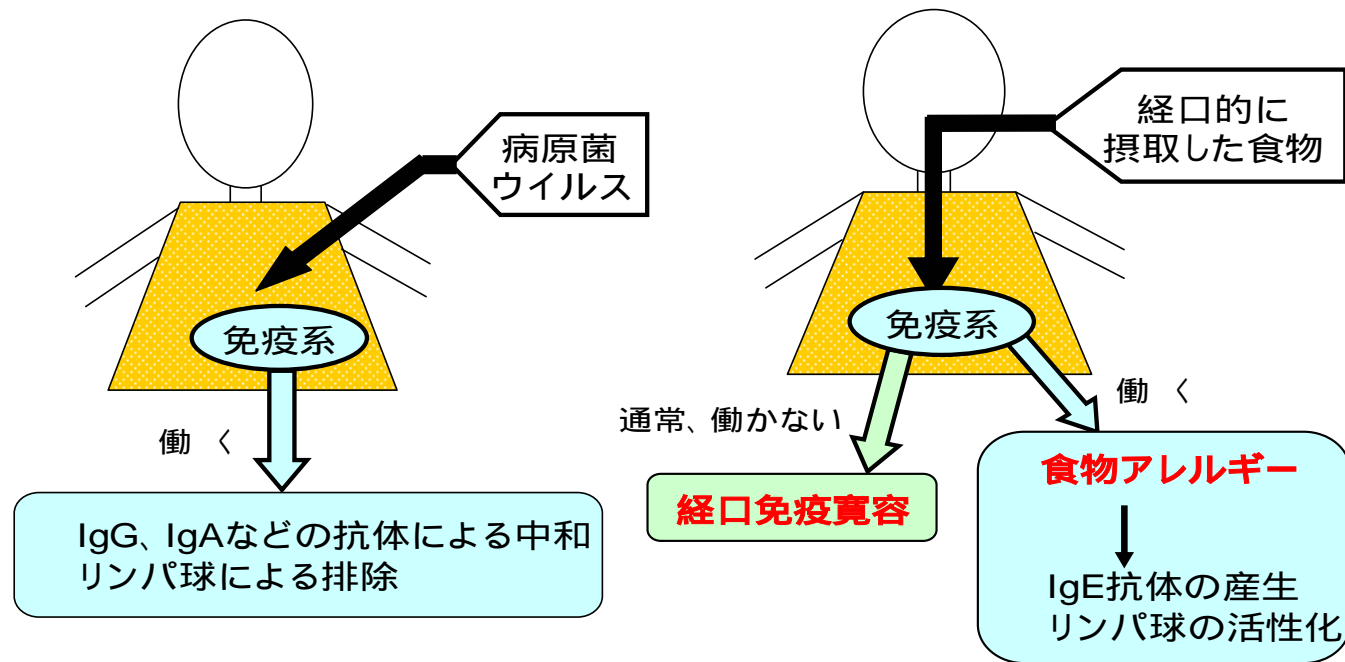


図1 経口免疫寛容と免疫機構の関係

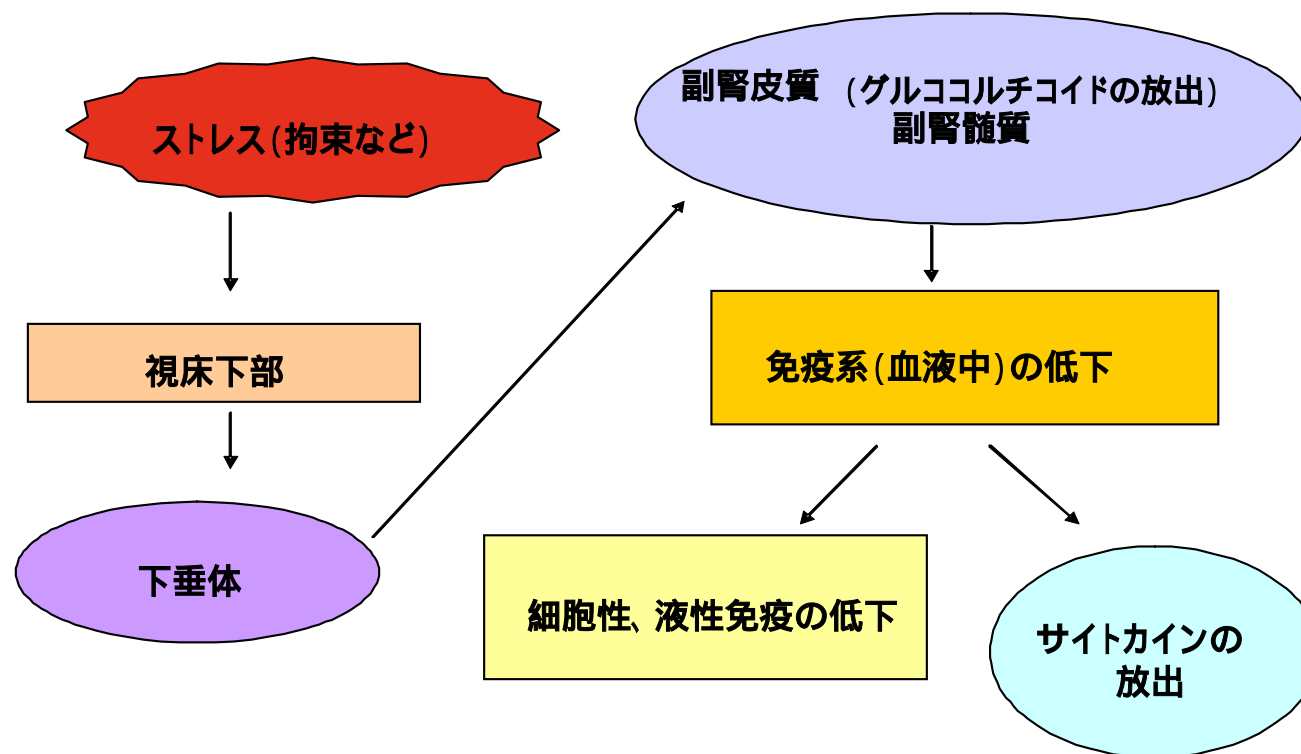


図2 生体内ストレスメカニズム



図3 ストレス負荷の方法

表1 実験動物の分類

群	経口投与	腹腔免疫	ストレス負荷
N	蒸留水	なし	なし
			あり
I	蒸留水	あり	なし
			あり
O	オボアルブミン	なし	なし
			あり
T	オボアルブミン	あり	なし
			あり

N. Oral administration of water without immunization

I. Oral administration of water with immunization

O. Oral administration of OVA without immunization

T. Oral administration of OVA with immunization

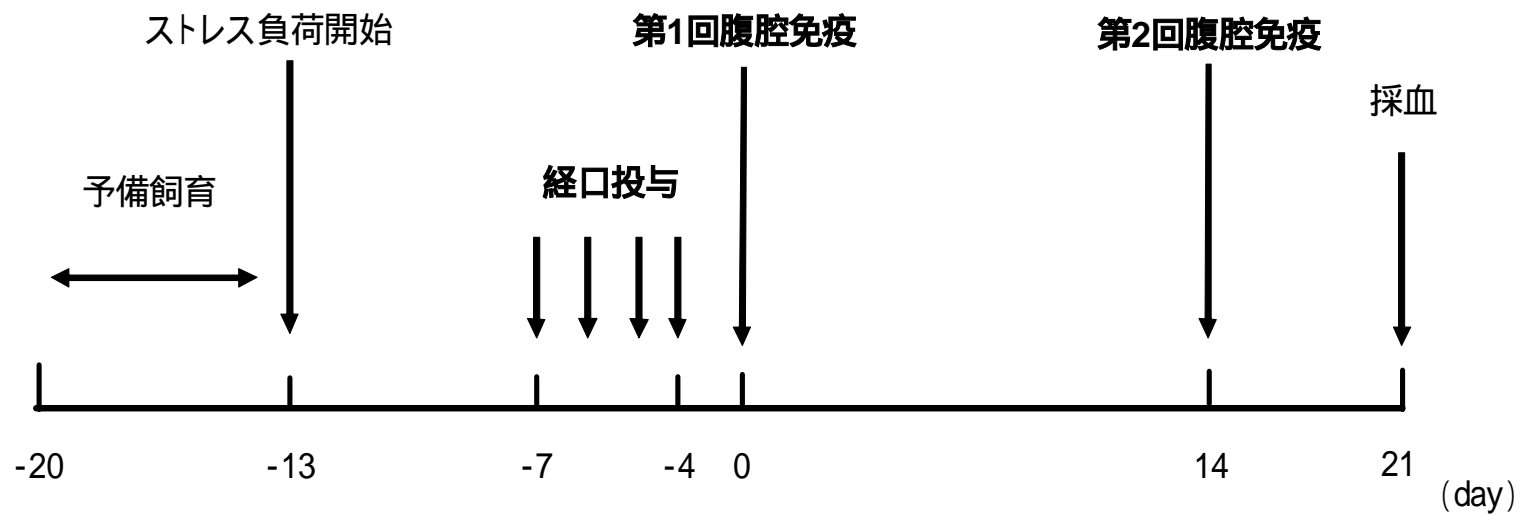


図4 経口免疫寛容の誘導



図5 経口投与

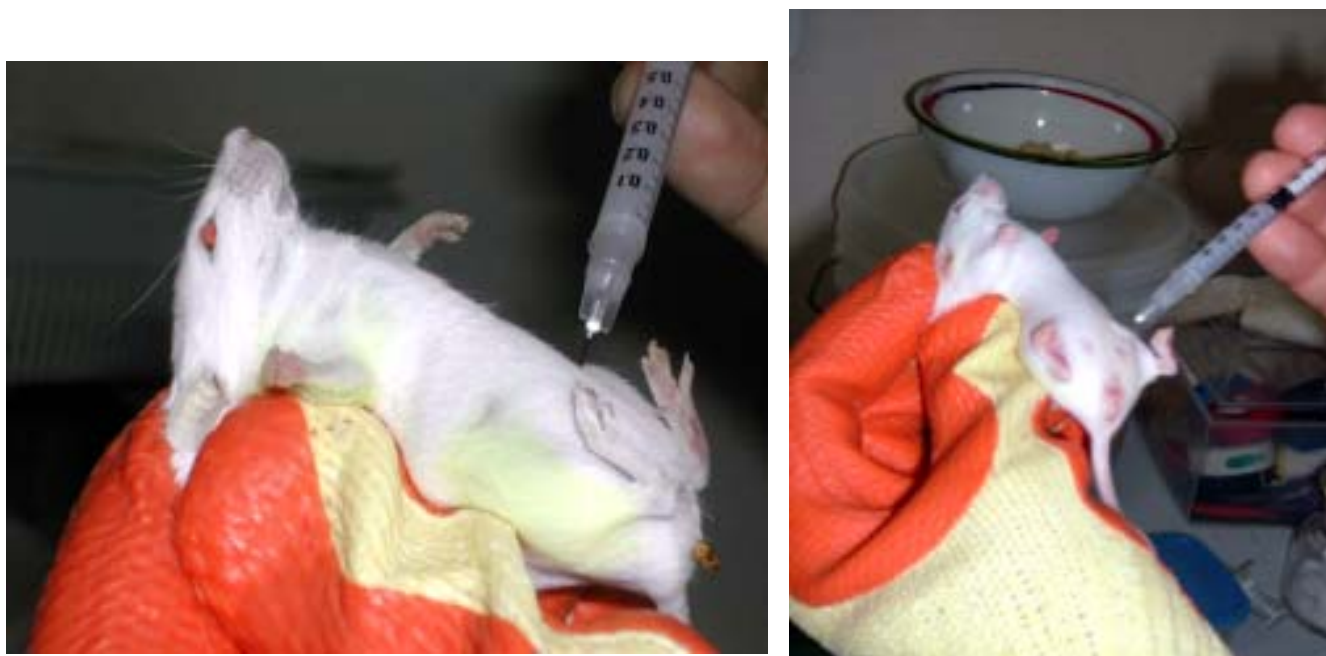
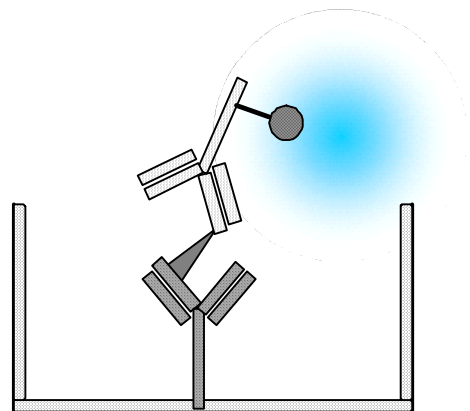


图6 腹腔投与

二抗体サンドイッチ
ELISA法の原理



ELISA法の原理

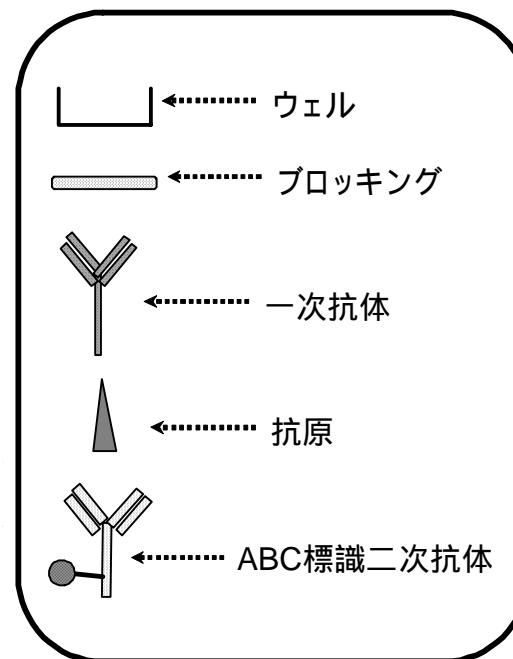
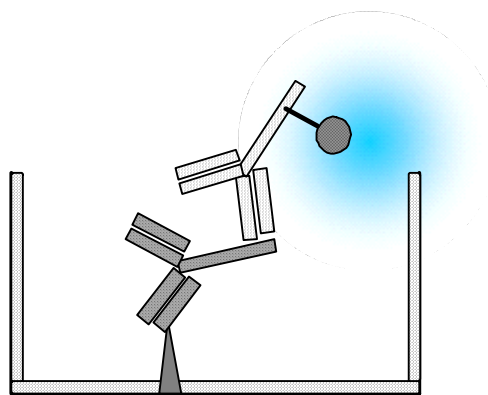


図7 ELISA法の原理

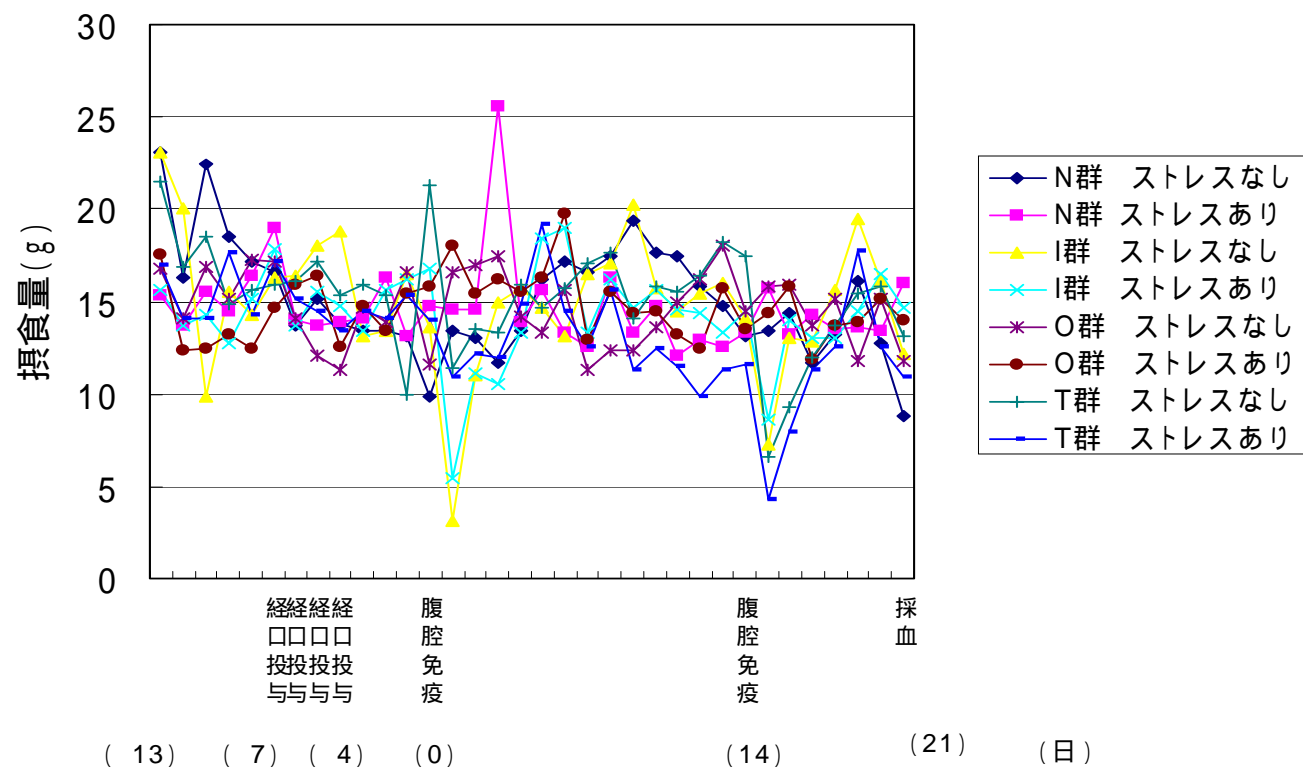


図8 摂食量の変化

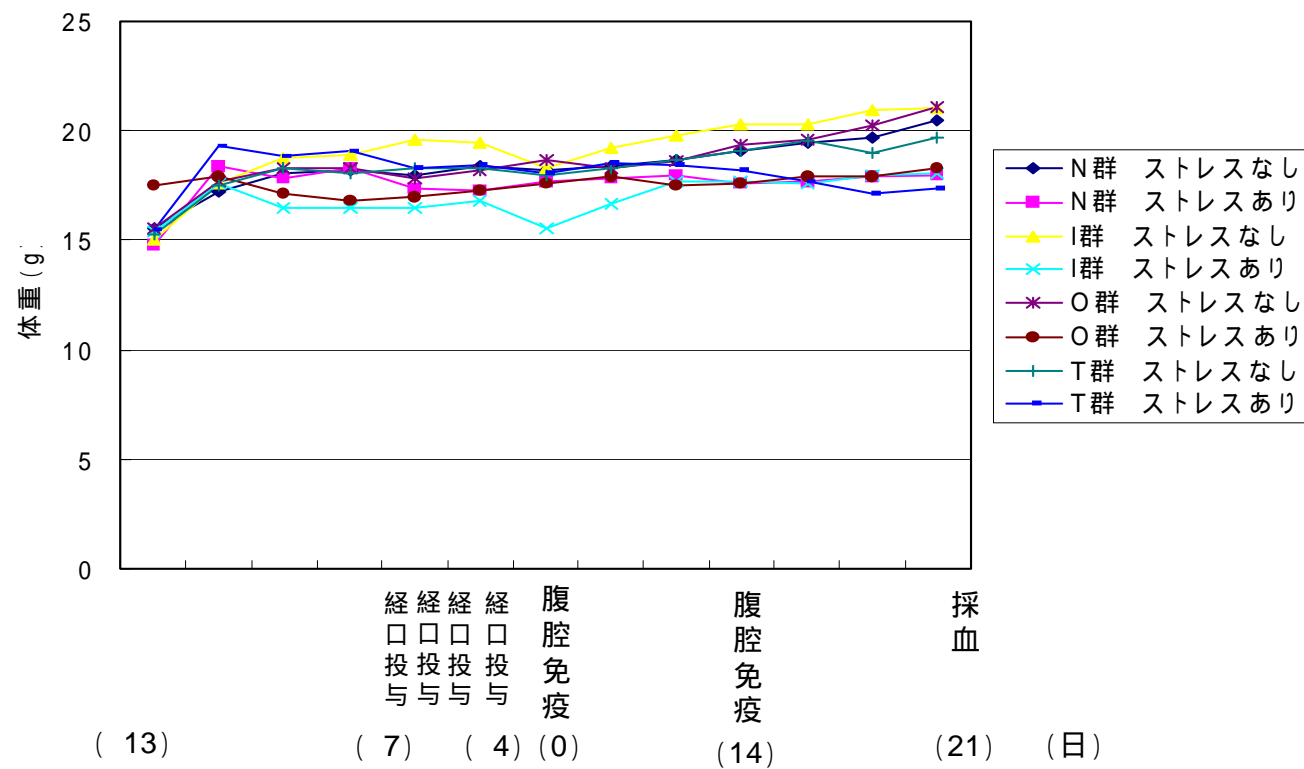
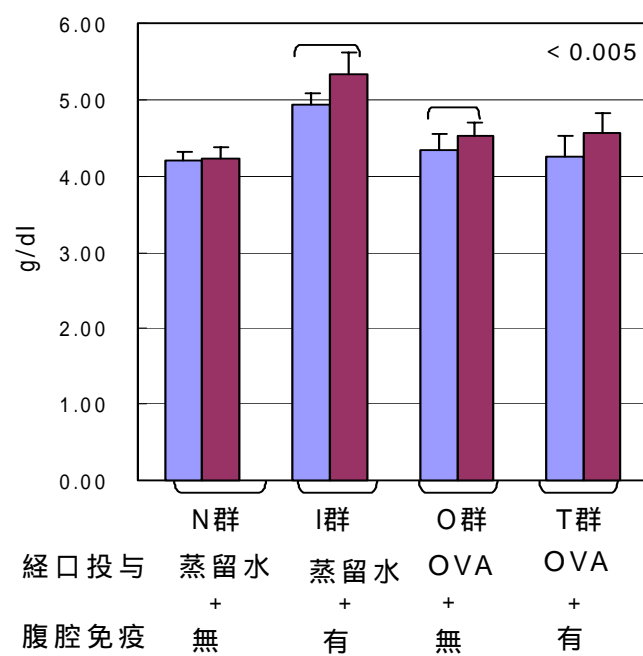


図9 体重の変化

総タンパク質濃度



アルブミン濃度

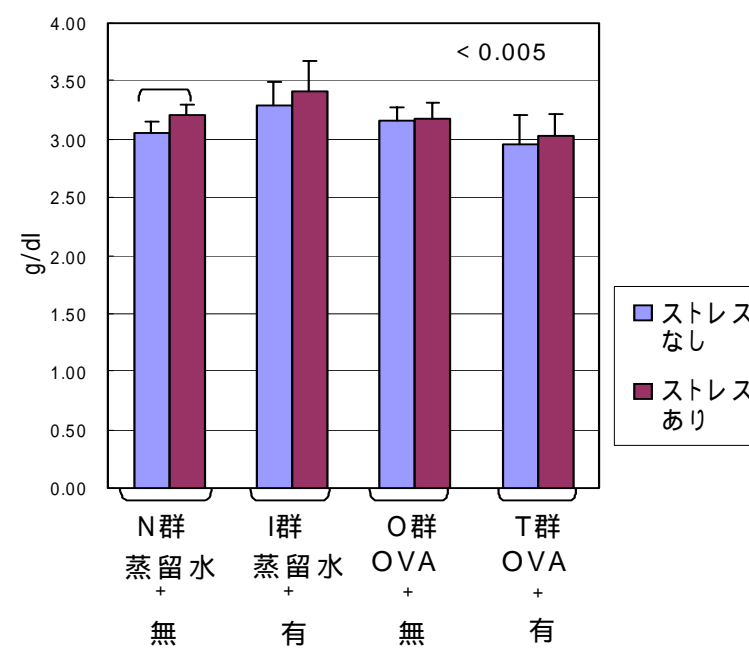
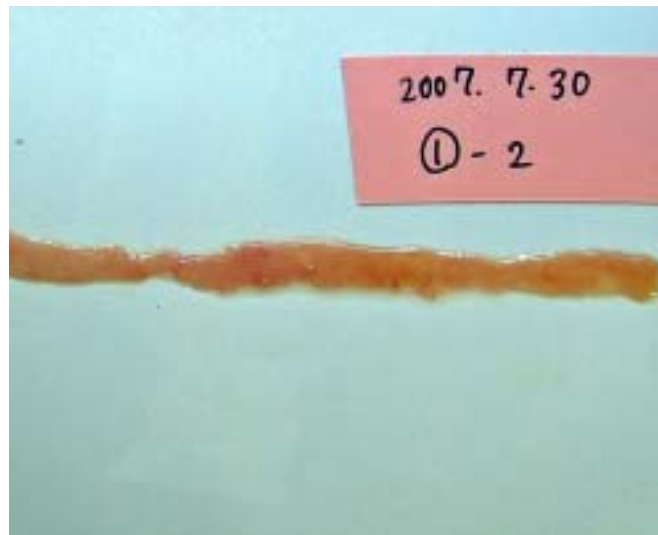


図10 栄養状態



ストレスなし

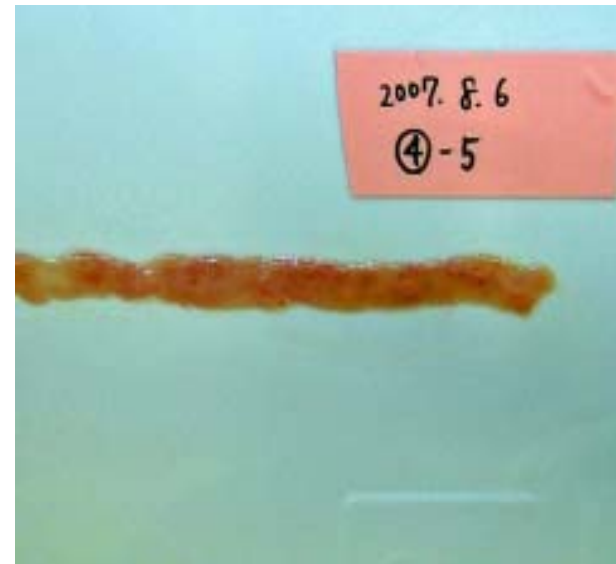


ストレスあり

図11 小腸組織 (N群)



ストレスなし



ストレスあり

図12 小腸組織 (I群)



ストレスなし



ストレスあり

図13 小腸組織 (O群)

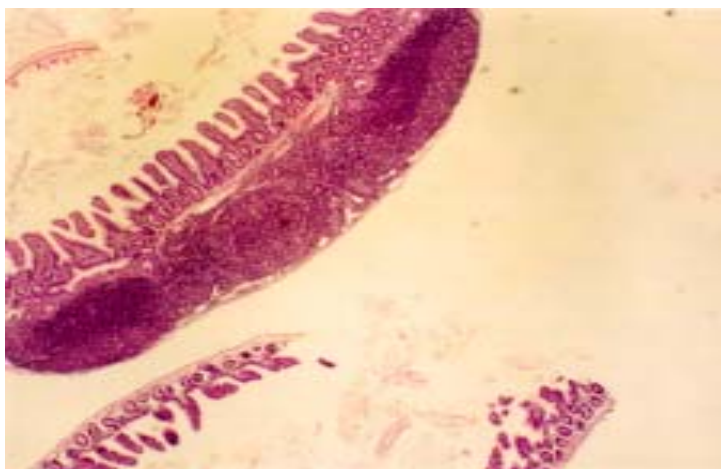


ストレスなし

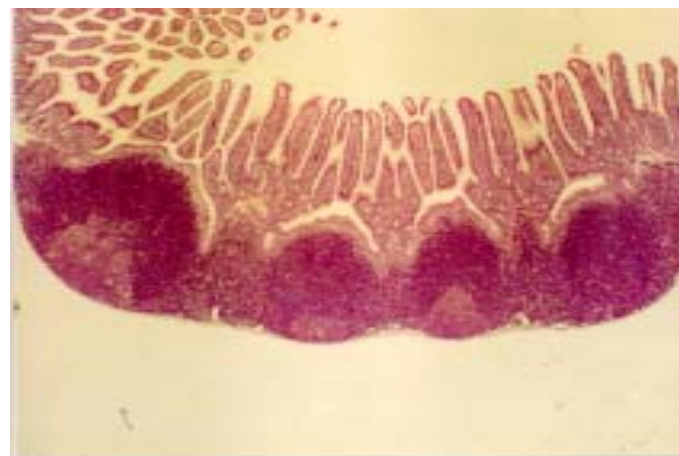


ストレスあり

図14 小腸組織(T群)

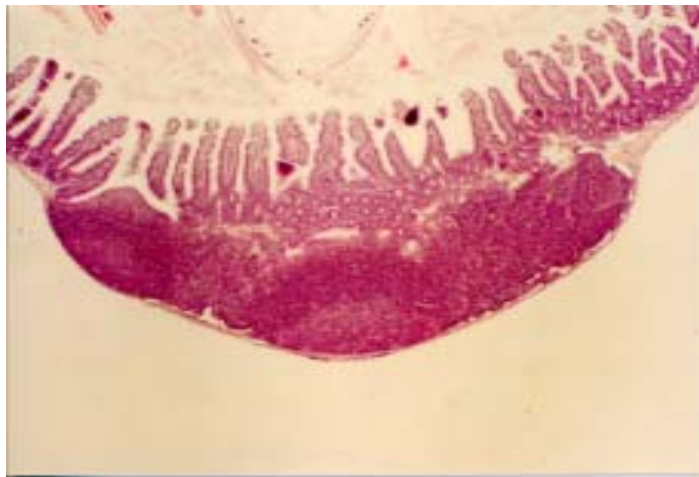


ストレスなし

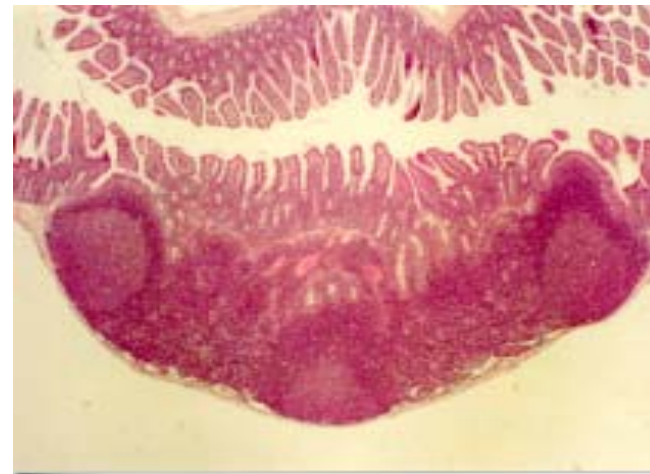


ストレスあり

図15 小腸パイエル板(N群)

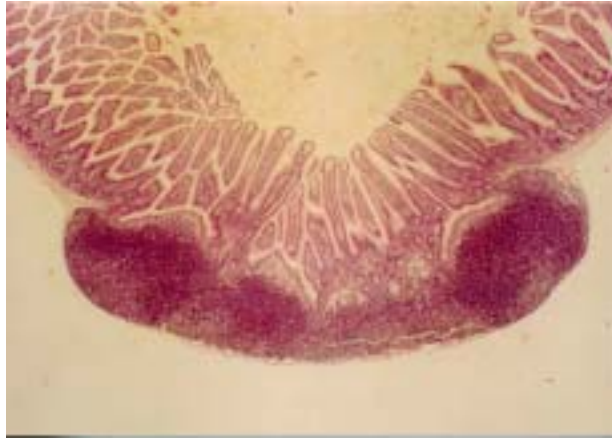


ストレスなし

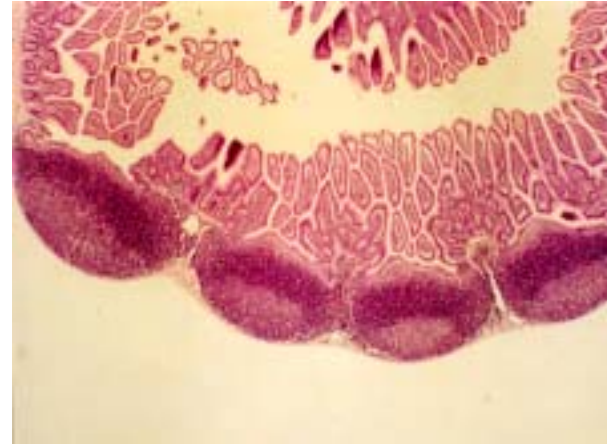


ストレスあり

図16 小腸パイエル板 (I群)

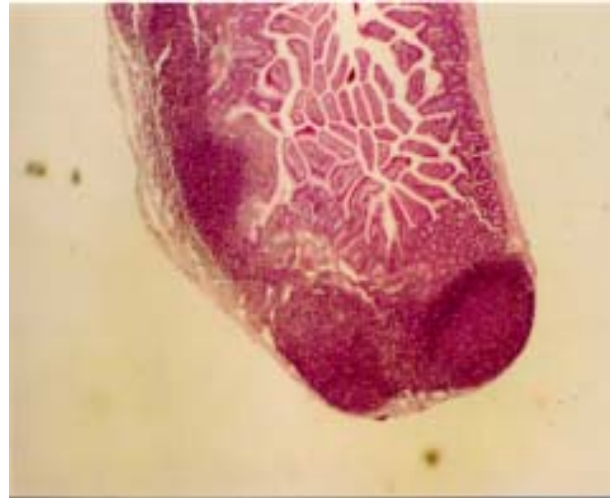


ストレスなし

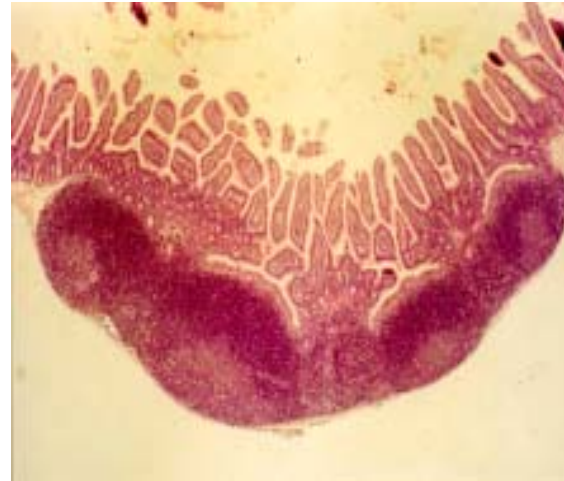


ストレスあり

図17 小腸パイエル板(○群)



ストレスなし



ストレスあり

図18 小腸パイエル板(T群)

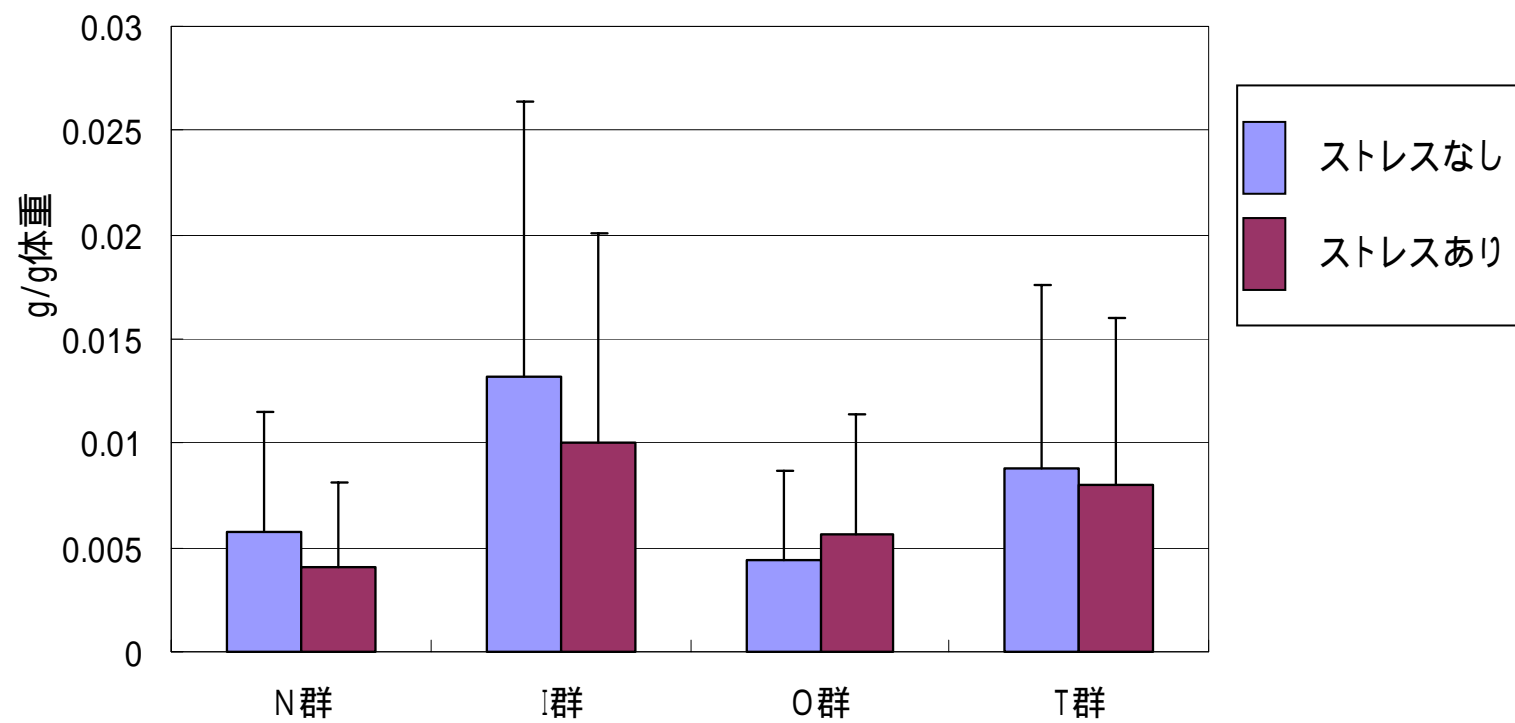


図19 脾臓重量

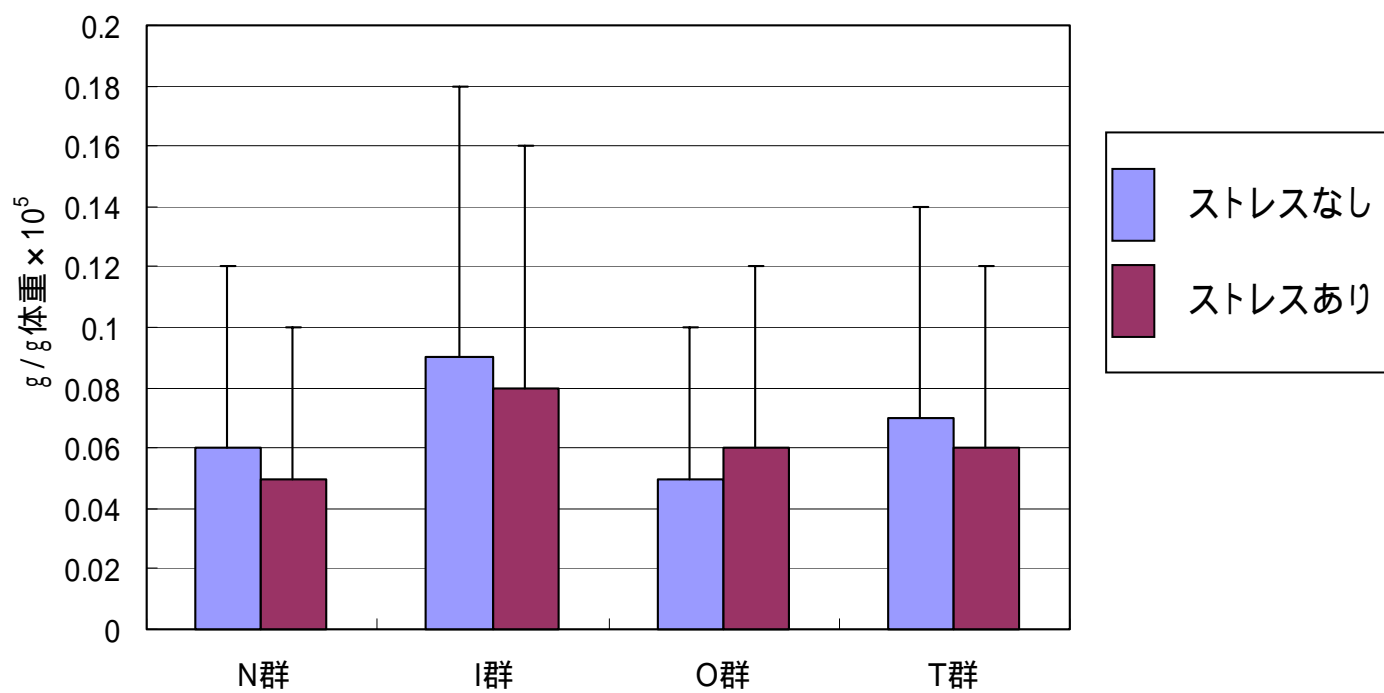


図20 脾臓細胞数

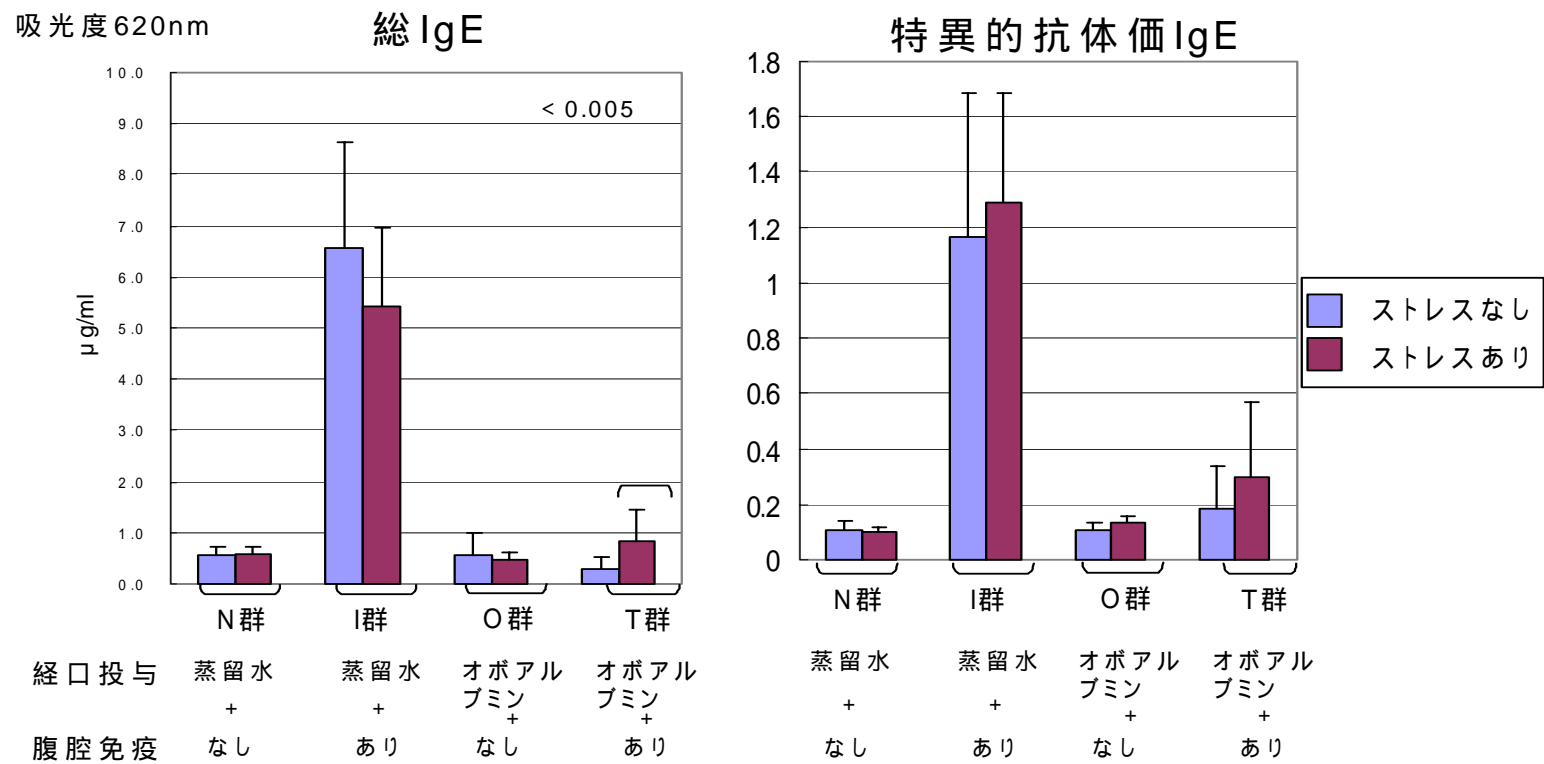
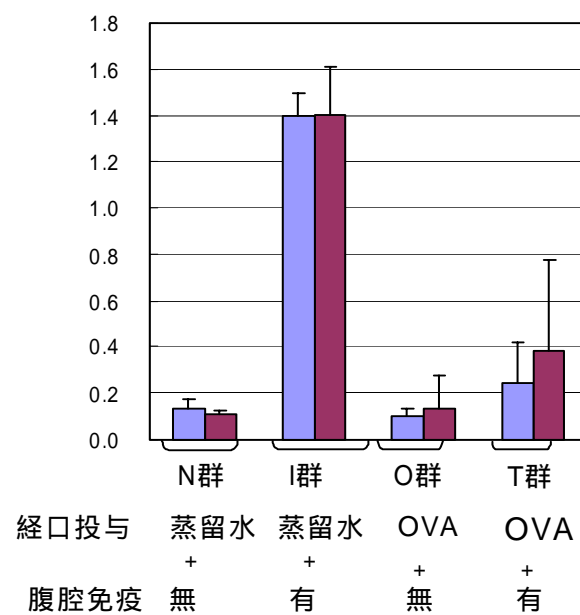


図21 総IgE濃度・特異的抗体価IgE

吸光度620nm

特異的抗体価IgG



特異的抗体価IgG₁

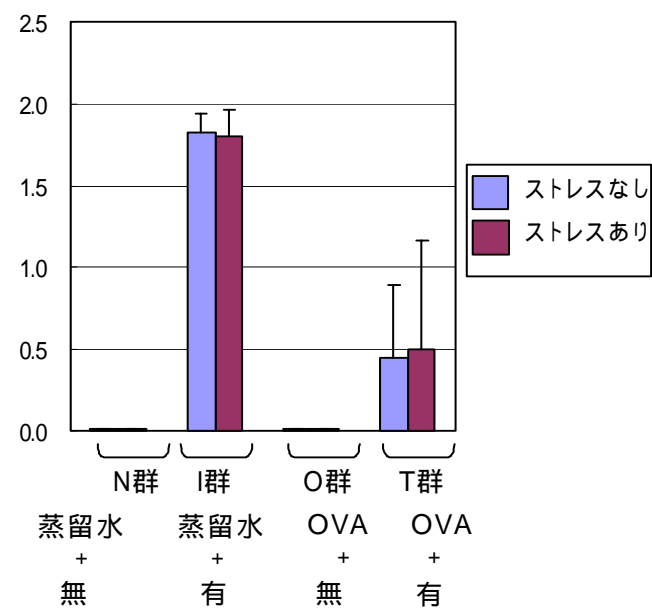


図22 オボアルブミンに対する特異的抗体価IgG・IgG₁

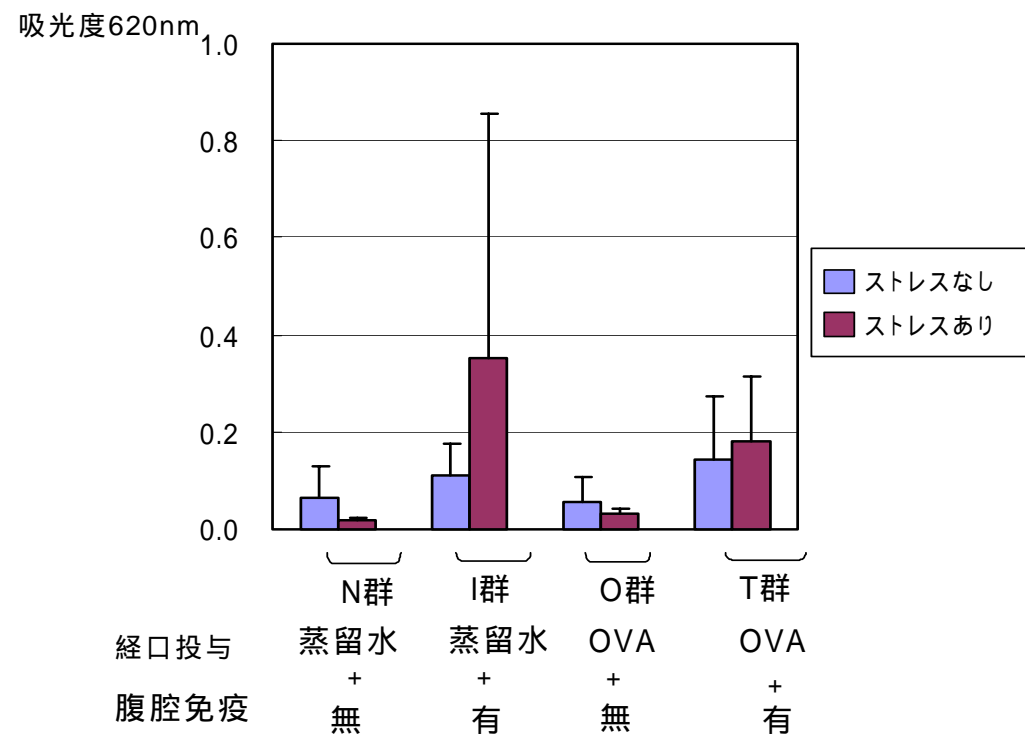


図23 オボアルブミンに対する特異的抗体価IgG_{2a}

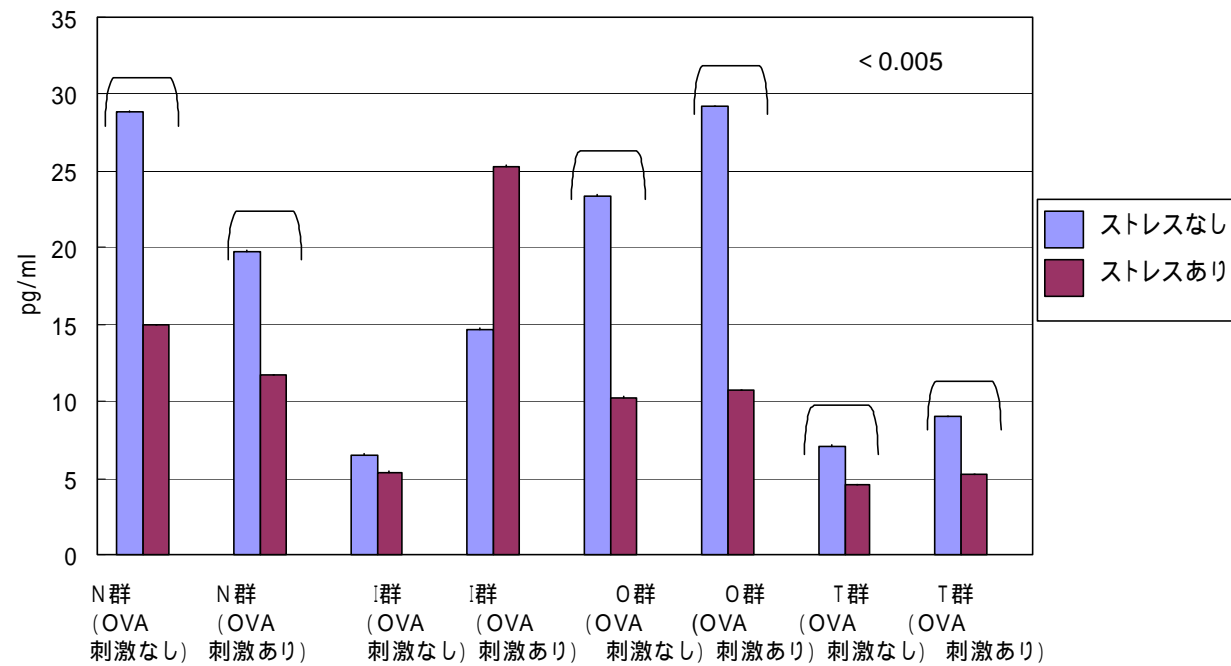


図24脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに
応答するIL-4産生量

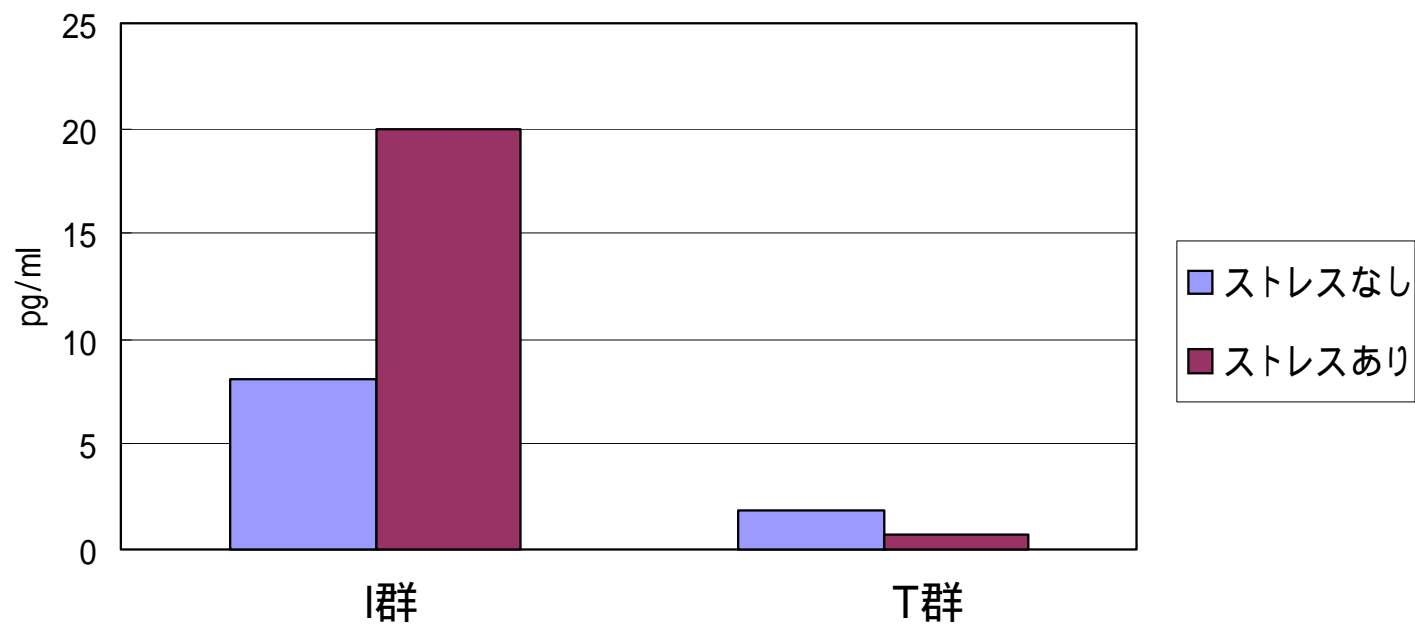


図25 IL-4産生量(OVA刺激ありーOVA刺激なし; I群、T群)

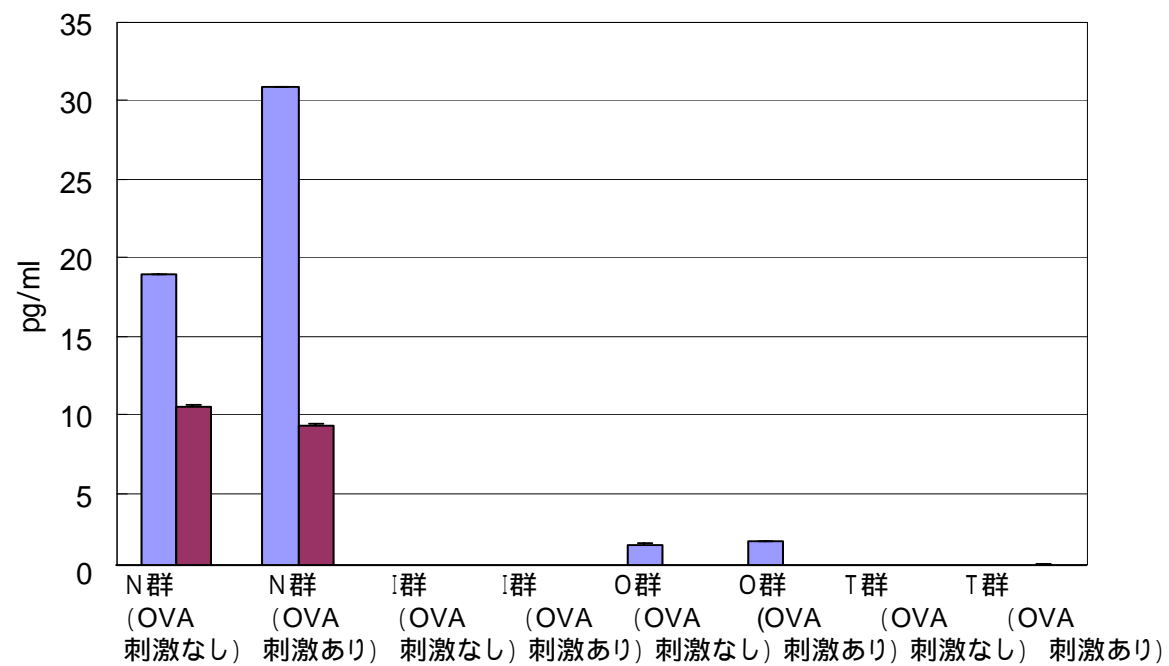


図26 脾臓リンパ球培養上清中のオボアルブミンに応答するIFN- γ 産生量

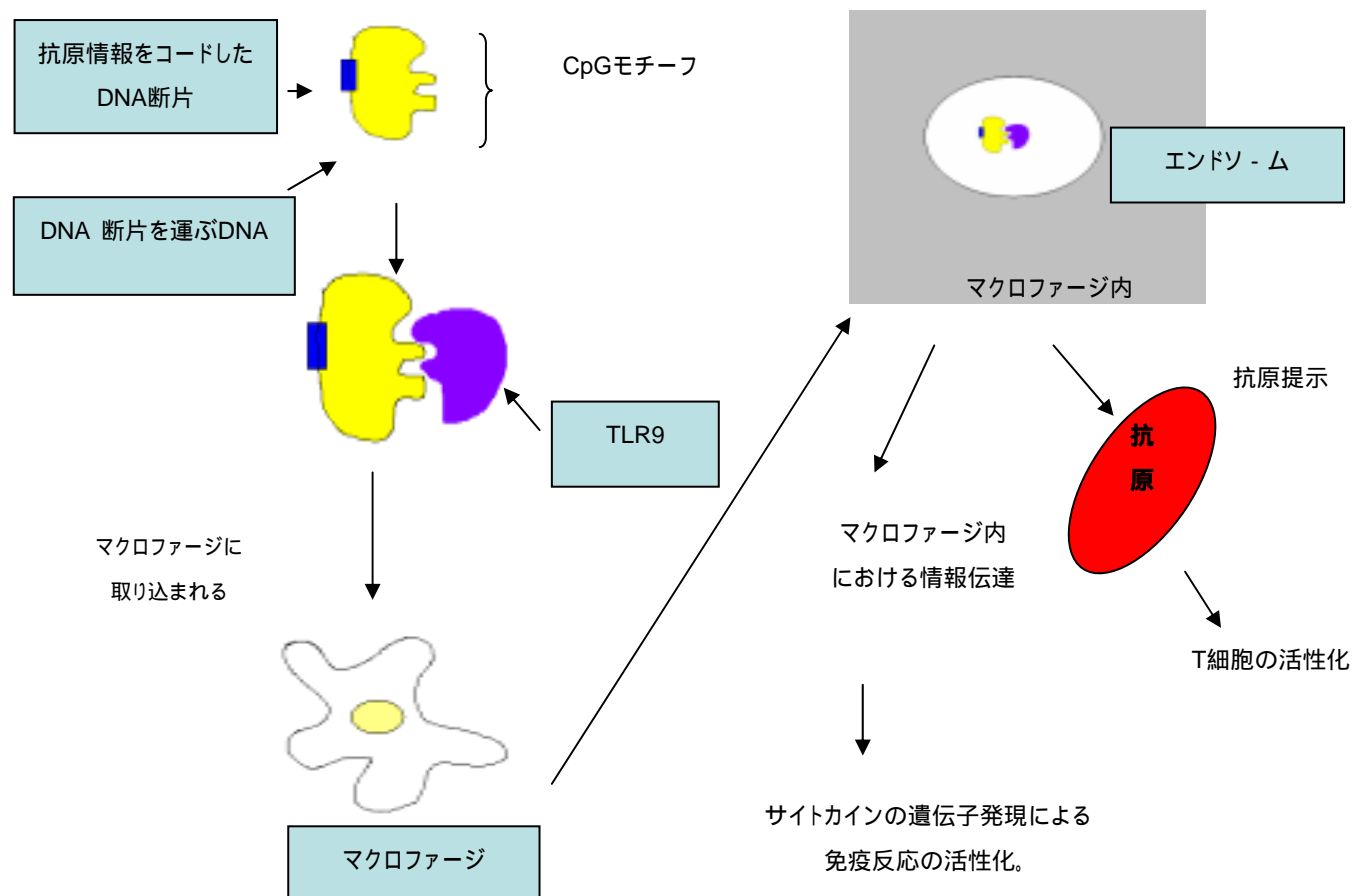


図 27 CpG モチーフによる DNA ワクチンのメカニズム

