

ラット実験的アレルギー性結膜炎に対する経口免疫寛容の誘導

小泉 敏樹, 阿部 徹

秋田大学医学部眼科学教室

要 約

抗原を経口投与することにより, その抗原に対する免疫寛容が誘導されることが知られている。卵白アルブミンを抗原とする実験的アレルギー性結膜炎ラットに経口免疫寛容を誘導し, その結膜炎の抑制を検討した。受動皮膚アナフィラキシー反応で測定した血清中の抗卵白アルブミン IgE 抗体価は, 免疫前から, および免疫直後から抗原内服を始めた両群ともに抗原内服しない群に比べ有意に抑制されていた。免疫前から抗原内服した群の実験的アレルギー性結膜炎の強度は, 惹起 30 分後の結膜血管からのエバンスブルー漏出量, および惹起 6 時間後

の好中球の浸潤数の点で, 有意に減弱していた。免疫後内服群でも色素漏出量は有意に抑制されていた。血清 IgE 抗体価とエバンスブルー漏出度との間に正の相関がみられ ($r=0.90$, $p<0.001$), 経口免疫寛容による特異的 IgE 抗体産生抑制が結膜局所の炎症反応抑制に関与したことが示唆された。(日眼会誌 99:515-520, 1995)

キーワード: アレルギー性結膜炎, 経口免疫寛容, IgE, 卵白アルブミン, ラット

Induction of Oral Tolerance to Experimental Allergic Conjunctivitis in Rats

Toshiki Koizumi and Tohru Abe

Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine

Abstract

Immunological tolerance can be induced by the oral administration of antigen. We induced oral tolerance rats to experimental allergic conjunctivitis by ovalbumin and investigated the suppression of inflammation. In groups which had started eating antigen both before and after the immunization, the serum anti-ovalbumin IgE level measured by passive cutaneous anaphylaxis reaction was significantly lower than in a group that had not been fed antigen. The intensity of experimental allergic conjunctivitis in the group which had started eating antigen before immunization, was significantly suppressed in regard to the leakage of Evans Blue from conjunctival vessels 30 minutes after the

challenge and the neutrophil infiltration 6 hours after. The dye leakage of the group which had started feeding after immunization was also significantly suppressed. There was a positive correlation between the serum IgE level and the leakage of Evans Blue ($r=0.90$, $p<0.001$). These results suggest that the suppression of antigen-specific IgE antibody production caused by oral tolerance affected the decrease of local inflammation on the conjunctiva. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:515-520, 1995)

Key words: Allergic conjunctivitis, Oral tolerance, IgE, Ovalbumin, Rat

I 緒 言

免疫原性をもつ物質を経口投与した時に, その抗原に対して免疫寛容が成立する場合が知られており, これを経口免疫寛容¹⁾という。この現象の発見は古く, 実験系としては, 1911年に Wells²⁾がモルモットの全身的なアナ

フィラキシー反応の予防を, 1946年には Chase³⁾が遅延型過敏症の抑制を報告しており, 後者は Sulzberger-Chase 現象として知られている。そしてこの現象を臨床面に, つまり, すでに抗原に感作されているヒトに応用したとも考えられるものが経口減感作療法で, ヨーロッパを中心に, 花粉, ハウスダストなどを抗原とした報

別刷請求先: 010 秋田県秋田市本道1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 小泉 敏樹

(平成6年9月22日受付, 平成6年12月27日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiki Koizumi, M.D. Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita-shi, Akita-ken 010, Japan.

(Received September 22, 1994 and accepted in revised form December 27, 1994)

告⁴⁾⁵⁾が多数なされている。その結果はおおむね良好で、特にアレルギー性鼻炎患者において合併している結膜炎症状の改善をみた報告⁶⁾もあったが、効果の確実性の点で注射法による減感作療法には及ばず、治療法として広く普及はしていない現状である。しかし、抗原の投与量、期間、投与方法を工夫することによって、より良い結果が得られた報告⁶⁾⁷⁾がみられ、特異的免疫療法の一つとして注目されている。

そして近年、多発性硬化症にその抗原物質と推測されているミエリン塩基性タンパクを経口投与した臨床試験⁸⁾、および慢性関節リウマチに対するII型コラーゲン経口投与の試験⁹⁾も報告されている。一方、ヒトにおけるアレルギー性結膜炎においては、これらの自己免疫疾患の場合に比し、明らかにアレルギーを証明できる場合が多く、経口免疫寛容が期待できるものと思われる。しかし、現在までアレルギー性結膜炎の動物モデルでその効果を定量的に比較、検討した報告はない。今回我々は、臨床応用のための基礎実験として、能動免疫による実験的アレルギー性結膜炎ラットを作製し、抗原である卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) の経口投与による影響を、結膜血管の透過性の測定と組織学的変化を定量化して検討した。

II 実験方法

実験動物：日本エスエルシー船橋農場から購入した8週齢、体重およそ200gのWistar系雄ラットを使用した。

抗原：卵白アルブミン(ニワトリ)5回結晶(生化学工業)を生理食塩水に溶解して用いた。

抗原の経口投与：10mgのOVAを含む生理食塩液1mlを、ラット用経口ゾンデ(日本クレア(株))を用いて連日投与した。投与の開始時期は、①免疫の1か月前から、②免疫の2週間前から、③免疫直後から、の3群を設定した。また、これら3群と比較するための、抗原の経口投与を受けない群にも免疫2週間前から同じゾンデで生理食塩水の投与を行った。

免疫方法：2.5mgのOVAを含む生理食塩液とフロイント完全アジュバント(ヤトロ)を1:1に乳和し、ラットの後足足蹠皮下に注射、同時に *Bordetella pertussis* (和光純薬)の死菌 2×10^{10} 個を静脈内投与することにより能動免疫した。

血清の抗体測定：免疫2週間後、頸静脈から採血し、48時間受動皮質アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 反応¹⁰⁾で測定した。すなわち、感作ラット血清の希釈系列を体重約200gの未感作ラットの背部皮膚に各0.1ml皮内注射し、48時間後にOVA 1mgと0.5%エバンスブルー液1mlを静注、30分後に直径8mm以上青色化したものを陽性と判定し、陽性を示す最大希釈倍率を抗体価として表した。

実験的アレルギー性結膜炎の惹起、および炎症の程度の定量化：免疫2週間後に100 μ g/mlの濃度のOVA溶液0.05mlを球結膜下注射し結膜炎を惹起し、Isoら¹¹⁾の方法に準じて炎症の程度の定量化を行った。すなわち、同時に1%エバンスブルーを1ml静注し、その30分後に心臓から放血致死させた後、球結膜から円蓋部、眼瞼結膜までを摘出した。摘出組織を0.5%硫酸ナトリウム水溶液とアセトン混合液(3:7)1mlで48時間暗所、室温に浸漬してエバンスブルーを抽出し、波長600nmで吸光度を測定、あらかじめ作成した検量線から漏出色素量を求めた。

組織学的検討：上記の条件で結膜炎を惹起させ、その30分後、および6時間後に眼瞼を含めて眼球摘出した。10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋後、眼球の最大断面(垂直方向)で4 μ mに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびヘマトキシリン-ハンセル染色を行い、光学顕微鏡で浸潤細胞の同定およびカウントを行った。細胞の計測部位は球結膜、円蓋部結膜、眼瞼結膜の固有層とし、算出は一辺が0.25mmの正方形を1視野として、倍率200倍で1標本につき任意の8視野を計測し、その平均を単位面積当たり換算した。

統計：有意差の検定はすべて student's t-test を用いた。数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

III 結果

1. 血清の抗OVA IgE抗体価

免疫2週間後に48時間PCA反応で測定した血清中の抗OVA IgE抗体価は、生理食塩水投与群、つまり抗原内服を受けない群(n=18)では9.3 \pm 2.6倍であった。これに対し、免疫直後から抗原内服を受けた群(n=7)では2.4 \pm 1.9倍(p<0.005)、免疫の1か月および2週間前から抗原内服を受けた群(n=13)ではすべて希釈しない血清でもPCA反応は検出されず、1倍未満であった(図1)。

2. 結膜エバンスブルー漏出量

1%エバンスブルー1mlを静注すると、粘膜面や眼瞼縁で若干青色化がみられる。加えて、結膜下注射による非特異的な色素漏出がデータに介入することも考えられたため、生理食塩水結膜下注射30分後のエバンスブルー漏出量を測定したところ、4.50 \pm 0.67 μ g/ml(n=18)で、各個体間で大きなばらつきはみられなかった。また、免疫を行わなかった未感作群(抗原経口投与もなし)に前述の濃度のOVA溶液を結膜下注射した場合も4.17 \pm 0.71 μ g/ml(n=6)とほぼ同量の色素漏出がみられ、タンパク質の注射による非特異的な刺激は無視し得るものであった。

結膜炎惹起30分後のエバンスブルー漏出量は、抗原内服を受けない群(n=11)では15.91 \pm 5.63 μ g/mlであった。これに対し、免疫直後から抗原内服を受けた群(n=

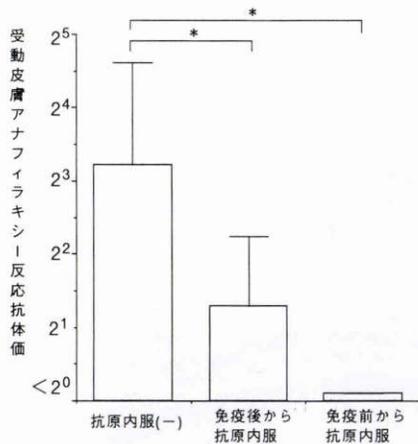


図 1 血清中抗原 (OVA) 特異的 IgE 抗体価。
* : $p < 0.005$

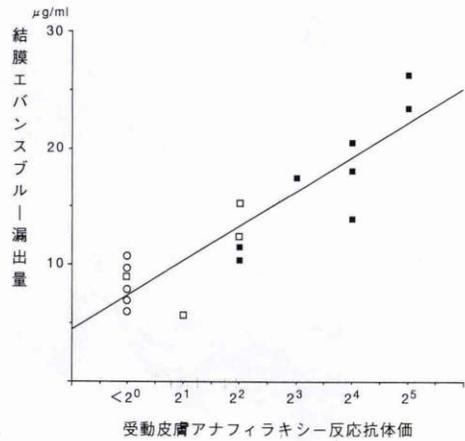


図 3 血清 IgE 抗体価と結膜エバンスブルー漏出量の相関。
黒四角：抗原内服 (-)，白四角：免疫後から内服，
白丸：免疫 2 週間前から内服。 $r = 0.903$, $p < 0.001$

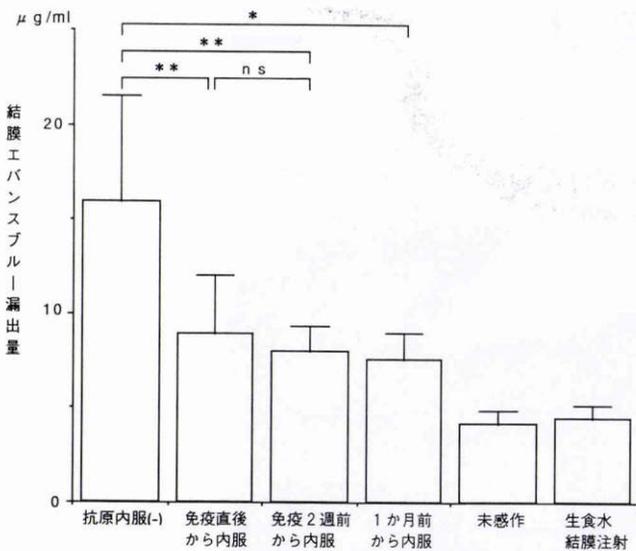


図 2 結膜エバンスブルー漏出量。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$, ns : 有意差なし ($p > 0.05$)。

10) では $8.91 \pm 3.10 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.005$)，免疫の 2 週間前から受けた群 ($n = 10$) では $7.98 \pm 1.41 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$)，免疫の 1 か月前から受けた群 ($n = 3$) では $7.58 \pm 1.42 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) と有意に抑制されていた。抗原内服群の間で、内服開始時期による有意な差は認められなかった (図 2)。

3. 血清の抗 OVA IgE 抗体価と結膜エバンスブルー漏出量の相関

血清 IgE 抗体価と結膜炎強度の指標であるエバンスブルー漏出量との相関係数 r は 0.903 で、有意な正の相関がみられた ($p < 0.001$, 図 3)。

4. 組織学的検討

図 4 に抗原内服を受けない群の、結膜炎惹起 30 分後と 6 時間後の光学顕微鏡像を示す。惹起 30 分後の組織像では、固有層の間質の浮腫、血管の拡張がみられ、一部では血管周囲に炎症細胞の浸潤が始まっていたが、その浸

潤数は好中球、好酸球ともに各群間で有意な差はなかった (表 1, 2)。惹起 6 時間後では、抗原内服を受けない群で好中球数は 30 分後の約 15 倍に増え、固有層の厚さの増大が著明であった。これに対し、免疫 2 週間前から抗原内服した群は、6 時間後の好中球の数において有意に抑制されていた ($p < 0.005$)。免疫直後から内服した群では、抗原内服しない群より好中球の数の平均値は少ないものの、統計的に有意な差は認められなかった。好酸球の数は 6 時間後においても各群間で有意差はなかった。

IV 考 按

抗原を内服した後、その抗原に対して特異的に免疫応答が低下または消失している状態、つまり、経口免疫寛容の成立にはいくつかの条件が影響を与える。まず第一に、内服する抗原の量であるが、過去の報告では用量依存的に免疫反応を抑制する傾向がみられた、とするものが多い¹²⁾¹³⁾。例えば、今回の実験と同じ OVA を、異なった量でマウスに単回投与し比較した報告¹⁴⁾でも、IgE および IgG 抗体価の抑制効果は、20 mg, 10 mg 内服群に比べ 1 mg 内服群において弱かったことが示されている。しかしながら、このような単回投与では十分な抑制効果を示さない量でも、投与を反復することにより、より強い効果が得られることが知られている¹⁴⁾¹⁵⁾。Ngan ら¹⁵⁾ はマウスに 2 週間隔日で経口投与し、PCA 反応を有意に抑制し得る最小の OVA の量は 1 日当たり 100 μg であったと報告している。今回我々は、結膜炎の炎症の強さ、特に血管透過性亢進の程度を定量化するため実験動物をラットとしたが、上記の知見から、1 日当たり 10 mg の OVA の連日投与は経口免疫寛容を誘導するのに十分な量と考えた。当然のことながら、この免疫寛容を誘導し得る抗原量は抗原の種類により異なり、これはそのタ

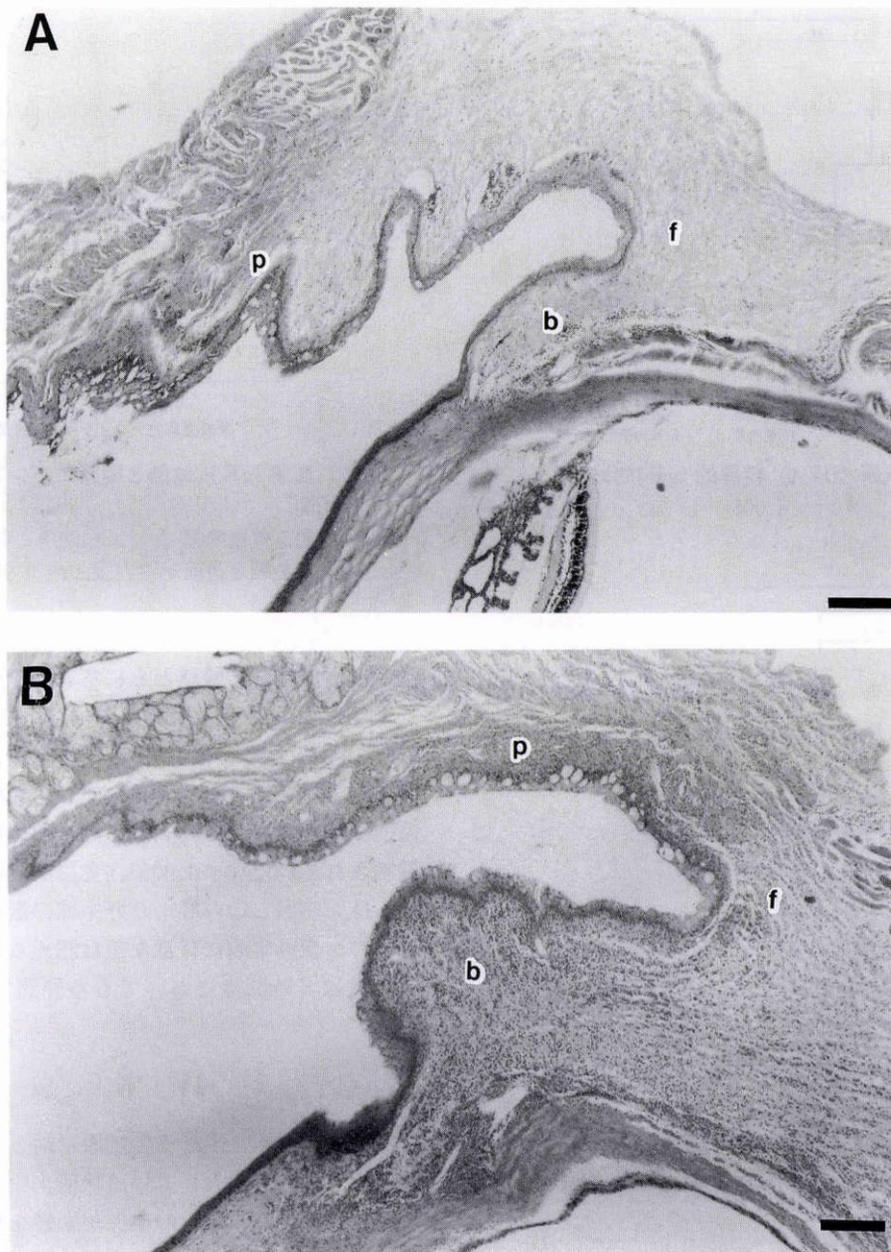


図4 抗原内服を受けない群の結膜炎の光学顕微鏡像 (HE 染色).

A: 結膜炎惹起 30 分後. 固有層の浮腫, 血管の拡張を認めるが, 炎症細胞の浸潤は一部の血管周囲にとどまる. B: 結膜炎惹起 6 時間後. 著明な好中球の浸潤と固有層の腫脹を認める.

p: 眼瞼結膜, f: 円蓋部結膜, b: 球結膜, バーは 200 μ m.

表1 結膜組織中の好中球数

	結膜炎惹起 30分後(個/mm ²)	結膜炎惹起 6時間後(個/mm ²)
抗原内服(-)群	267 \pm 215	4,273 \pm 1,447
免疫後から内服群	185 \pm 126	2,387 \pm 1,780 ns
免疫2週前から内服群	187 \pm 133	735 \pm 470 *

それぞれ n=4, *: p<0.005 (抗原内服(-)群との比較)

表2 結膜組織中の好酸球数

	結膜炎惹起 30分後(個/mm ²)	結膜炎惹起 6時間後(個/mm ²)
抗原内服(-)群	12 \pm 4	31 \pm 6
免疫後から内服群	16 \pm 7	22 \pm 13
免疫2週前から内服群	11 \pm 4	33 \pm 25

それぞれ n=4

ンパクが胃を通過後, 腸管粘膜から吸収されパイエル板, あるいは腸管隣接リンパ組織で抗原として処理される, という一連の過程があるためと理解される. ちなみに, 注射法による減感作療法が一般的に行われている花粉症

などのアレルギー疾患においては, 有効であった内服量は皮下注射する場合の量の 100~200 倍が必要であったとする報告⁵⁾⁷⁾が多い. いいかえると, 経口減感作の有効性が示されなかった報告ではアレルゲン溶液を 1 滴ずつ

増しながら漸増的に与えていたため、内服する量が少なかったとする意見⁶⁾もある。

次に、経口投与を開始する時期についてであるが、もともと経口免疫寛容という現象はあらかじめ内服された抗原に対する細胞性、あるいは液性免疫の不応答を指している。そして今回の我々の実験でも、免疫の1か月および2週間前から抗原内服を受けたラットではいずれも血清中の抗OVA IgE抗体価はPCA反応で検出されなかった(図1)。しかしながら、臨床的により重要なのは、個体とそのタンパクを抗原として認識し、抗体産生をはじめとする免疫反応が進んでいる状態においても経口抗原が抑制的に働かざるか、に関してである。そこで、抗原内服を免疫操作の直後から始めた群を設定し比較したところ、IgE抗体価、結膜エバンスブルー漏出量とも免疫前から内服開始した群よりは弱いものの、有意な抑制効果がみられた(図2)。また、6時間後の好中球の浸潤数においても生食水内服群に比し、有意差はなかったが、平均値で約2分の1に減弱していた(表1)。このように免疫後から抗原内服しても特異的IgE抗体産生が抑制され得ることはSaklayenら¹⁴⁾、Lafontら¹⁶⁾も報告している。したがって、アレルゲンが明らかなヒトのアレルギー性結膜炎の治療あるいは予防にも抗原内服は期待し得るものと思われる。ちなみに、免疫前に行われた抗原の経口投与自体が血中の抗体産生に促進的に働いた可能性については、今回は検討していない。しかし、前述のNganら¹⁵⁾のマウスの実験では、OVA経口投与の後で、なおかつ免疫はまだ行っていない時点において、IgEおよびIgG1抗体の産生は認められなかったことが報告されている。

このような経口免疫寛容のメカニズムの解明のため、現在まで多くの実験が行われてきたが、まだ確定された機序は明らかにされていない。しかし、免疫寛容の誘導、制御に関与すると思われるものとして、抗原と抗体による免疫複合体の形成¹⁷⁾、T細胞のクローナルアネルギー化¹⁸⁾などとともに、以前から抗原特異的に働くCD8⁺/サプレッサーT細胞(Ts)の活性化が重要視されている⁸⁾¹⁵⁾¹⁹⁾。これは免疫寛容状態の動物から得たTsを移入することにより他の動物に寛容を誘導できること¹³⁾²⁰⁾や、抗CD8抗体により特異的な抑制を阻止し得ること¹⁹⁾により示されている。そして、このTsが抗体産生にどう働くかについては、Liderら²⁰⁾がミエリン塩基性タンパク内服で免疫寛容にした実験的自己免疫性脳脊髄炎ラットのTsは*in vitro*でIgG産生を抑制することを報告している。しかし、この抗原特異的なTsがいかなるサイトカインを使ってその役割を行っているのかについては、transforming growth factor β とする説²¹⁾とinterferon- γ およびgranulocyte macrophage colony-stimulating factorとする説²²⁾があり、今後の研究が待たれるところである。

今回の実験では、結膜炎惹起数分後に生じてくる結膜血管の透過性亢進は、肥満細胞が持つヒスタミンをはじめとするpre-formed mediatorsの放出によるもの、つまりI型アレルギー反応の強弱の指標と考え、それぞれのラットの血清中の抗OVA抗体価との関係をみたところ、正の相関関係がみられた(図3)。このことは、抗原特異的TsがIgE抗体の産生を抑制し、その結果として結膜局所の炎症が減弱したことを示唆すると考えられる。

今後は、臨床的に問題となっている花粉などによるアレルギー性結膜炎に経口免疫寛容を誘導し得る抗原の精製方法、投与量、期間についての検討をするとともに、結膜炎抑制の機序についてより詳細に検討していく予定である。

本論文の要旨は、第98回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) 大沢利昭, 小山次郎, 奥田研爾, 矢田純一(編): 免疫学事典. 東京化学同人, 東京, 157, 1993.
- 2) Wells HG: Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg. J Infect Dis 9: 147-171, 1911.
- 3) Chase MW: Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. Proc Soc Exp Biol Med 61: 257-259, 1946.
- 4) Wortmann F: Oral hyposensitization of children with pollinosis or house-dust asthma. Allergol Immunopathol 5: 15-26, 1977.
- 5) Taudorf E, Laursen L, Lanner A, Björkstén B, Dreborg S, Soborg M, et al: Oral immunotherapy in birch pollen hay fever. J Allergy Clin Immunol 80: 153-161, 1987.
- 6) 須甲松伸: 新しい減感作療法. 経口減感作療法. 臨床医 20: 74-78, 1994.
- 7) 清水章治: スギ花粉症に対する経口減感作療法. 耳鼻 34: 203-209, 1988.
- 8) Weiner HL, Mackin GA, Matsui M, Orav EJ, Khoury SJ, Dawson DM: Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. Science 259: 1321-1324, 1993.
- 9) Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, Combitchi D, Lorenzo C, Sewell KL, et al: Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. Science 261: 1727-1730, 1993.
- 10) 平野隆雄: PCA反応とRPCA反応. 大沢利昭, 他(編): 新生化学実験講座12, 分子免疫学II, 東京化学同人, 東京, 283-291, 1991.
- 11) Iso T, Nakajima N, Suda H, Yamauchi H, Uda K: Passive anaphylaxis in rat conjunctiva and topical effects of antiallergic agents. Ophthalmic Res 12: 9-15, 1980.
- 12) Higgins PJ, Weiner HL: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral

- administration of myelin basic protein and its fragments. *J Immunol* 140: 440-445, 1988.
- 13) **Singh VK, Kalra HK, Yamaki K, Shinohara T:** Suppression of experimental autoimmune uveitis in rats by the oral administration of the uveitopathogenic S-antigen fragment or a cross-reactive homologous peptide. *Cell Immunol* 139: 81-90, 1992.
 - 14) **Saklayen MG, Pesce AJ, Pollak VE, Michael JG:** Kinetics of oral tolerance: Study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 73: 5-9, 1984.
 - 15) **Ngan J, Kind LS:** 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, 1978.
 - 16) **Lafont S, Andre C, Andre F, Gillon J, Fargier M:** Abrogation by subsequent feeding of antibody response, including IgE, in parenterally immunized mice. *J Exp Med* 155: 1573-1578, 1982.
 - 17) **Andre C, Heremans JF, Vaerman JP, Cambiaso CL:** A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: Antigen-antibody complexes. *J Exp Med* 142: 1509-1519, 1975.
 - 18) **Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz OG, Bitar DM:** Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 147: 2155-2163, 1991.
 - 19) **Nussenblatt RB, Caspi RR, Mahdi R, Chan C, Roberge F, Lider O, et al:** Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J Immunol* 144: 1689-1695, 1990.
 - 20) **Lider O, Santos LMB, Lee CSY, Higgins PJ, Weiner HL:** Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and *in vitro* immune responses is mediated by antigen-specific CD8⁺T lymphocytes. *J Immunol* 142: 748-752, 1989.
 - 21) **Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL:** 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 β after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 421-425, 1992.
 - 22) **Hoyne GF, Callow MG, Kuhlman J, Thomas WR:** T-cell lymphokine response to orally administered proteins during priming and unresponsiveness. *Immunology* 78: 534-540, 1993.
-