

牛乳中の機能性物質に関する研究

—特にアレルギー抑制ペプチドに関する研究—

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 上野川 修 一

牛乳中には既知の栄養素以外に免疫系・神経系・分泌系などに作用し、生体を調節し、生命を健全に保つ成分が存在している。したがって、牛乳は食品中最も栄養価の高い食品として位置づけられている。牛乳がなければわれわれ日本人の食生活はあり得ないとまで考えられる。

最近のわれわれの食生活の改善は極めて顕著であり、その結果多くの疾病は減少しつつある。しかしながら、疾病のなかで増加しているものがある。アレルギーである。アレルギーの罹患率は全人口の30%といわれまた食品を原因とするいわゆる食品アレルギーは乳幼児全人口の14%を占めている。

多くの食品のなかでアレルギーの原因となるのは卵が最も多く次に牛乳が位置づけられる。これはおそらく、栄養価が非常に高くそのため多く摂取されているためと考えられる。牛乳のなかでは、 α_{s1} -カゼインそして β -ラクトグロブリンなど主要なタンパク質が主要原因タンパク質（アレルゲン）である。牛乳アレルギーを予防・治療する方法の一つに牛乳を摂取しない方法があるが、これでは乳幼児のみならず成人においても栄養学的な問題を生じる。またステロイド剤や抗アレルギー剤による治療も考えられるが、副作用が問題となっている。

われわれは牛乳中の機能物質を探索する研究のなかで牛乳アレルゲンのペプチド、そしてその置換体のなかにアレルギーを抑制する可能性のあるペプチドを見出した。本研究ではその成果について報告する。

まず第1部ではこの研究の基本概念となっている免疫学的背景について、第2部では第1部の考えに基づいて行った β -ラクトグロブリン由来のペプチドを利用したアレルギー反応の抑制、第3部では同様に第1部の考えに基づいて行われた α_{s1} -カゼイン由来ペプチドを利用したアレルギー反応の抑制について述べる。そして第4部では α_{s1} -カゼイン由来の特定のペプチドを経口的に投与した場合の腸管免疫系への影響について述べる。

第1部 本研究の免疫学的背景

生命体はその独立性と恒常性を維持するための様々なシステムを獲得してきた。そのひとつである免疫系は、自己と非自己を認識し、非自己を排除する生体防御システムである。この数十年間における免疫学の進歩には目を見張るものがある。1960年の免疫寛容の研究のバーネットとメダワー以来、ノーベル医学生理学賞における免疫学の分野での9つの受賞は、その重要性と発展性を象徴している。われわれが高等生物における繊細な免疫系の概要を知るに至り、様々な疾患がその破綻によるものであることも明らかになってきた。

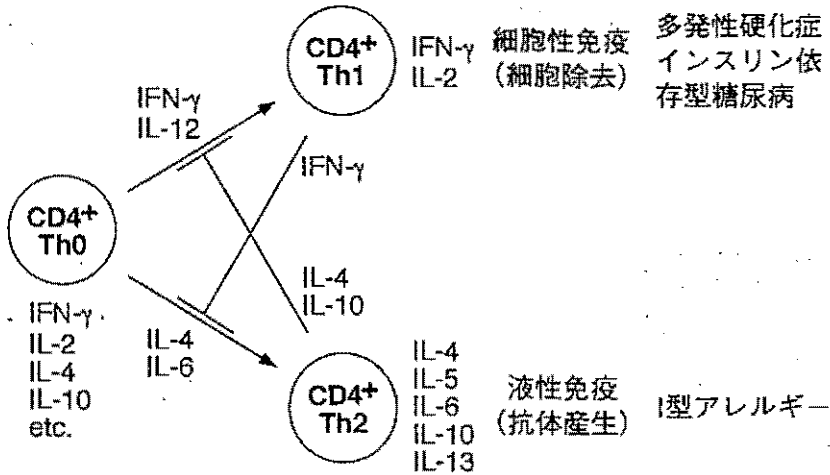
本研究の対象となっており、かつ大きな社会問題ともなっているアレルギーは、外来の異物と接触

した際に免疫系が過剰に应答し、自己に傷害を与えてしまうために起こるものである。

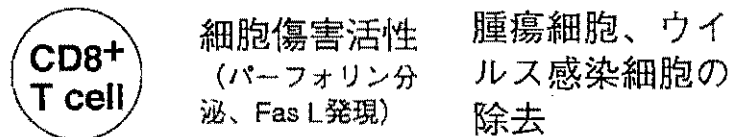
抗原特異的な免疫应答には細胞性免疫および液性免疫、2種類のメカニズムが存在する。前者の細胞性免疫の主役であるT細胞は、ウイルスに感染した細胞や腫瘍細胞を認識し、排除する。後者の液性免疫は、B細胞の産生する抗体が中心的な役割を果たしている。B細胞が抗体産生細胞に分化するには一般にT細胞の介助が必要であり、このようにT細胞は液性免疫の調節機能をも担っている。以上のように免疫应答の調節において、中心的役割を果たしているのはT細胞である。したがって、T細胞应答の制御を行うことによって、免疫系全体の制御が可能となる。

抗原に対して特異的に应答する上での主役は、 $\alpha\beta$ T細胞である。この $\alpha\beta$ T細胞は細胞表面に発現している分子の種類によって、 $CD4^+$ T細胞と $CD8^+$ T細胞に分けられる(図1)。これらのT細胞は、B細胞のように抗原を直接は認識しない。抗原の認識には以下のプロセスが必要である。抗原タンパク

外来抗原应答性 $CD4^+$ T細胞



内在抗原应答性 $CD8^+$ T細胞



外来抗原应答性 $CD8^+$ T細胞

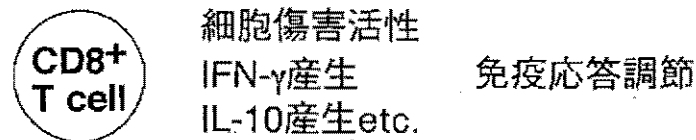


図1 $CD4^+$ T細胞と $CD8^+$ T細胞

質は抗原提示細胞内でプロテアーゼによりペプチド断片に分解されるとともに、主要組織適合性抗原 (major histocompatibility complex : MHC) 分子と結合する。抗原ペプチドとMHC分子は複合体の形で抗原提示細胞上に移行する。T細胞は、抗原提示細胞上に提示されているMHC分子/抗原ペプチド複合体をT細胞レセプター (T cell receptor : TCR) を介して認識し、初めて活性化される。

抗原タンパク質中で、MHC分子と結合しT細胞応答を誘起するのは、T細胞抗原決定基と呼ばれる数カ所の限られた領域である。抗原タンパク質においてのT細胞応答を強く誘起するT細胞抗原決定基を利用し、その修飾により、免疫応答の制御は可能であろうか？T細胞の抗原に対する応答は、MHC分子/ペプチド/TCRの相互作用から始まる。MHC分子に結合するT細胞抗原決定基を修飾することにより、T細胞応答に望ましい変化を誘導することが出来れば、免疫応答の制御が可能と考えられる。特にペプチドやその修飾ペプチドの利用は免疫反応の抑制法として有効な方法と考えられる。免疫反応を抑制することが出来れば、アレルギーなどの利用への応用も可能となる。

これまでにペプチドを免疫反応の抑制に利用したものとしては

- ①ペプチドそのものを利用し、量や投与期間を最適化することにより免疫反応を抑制する。
 - ②ペプチドの構造を一部置換して免疫反応を抑制する (図2)。
- などが考えられている。

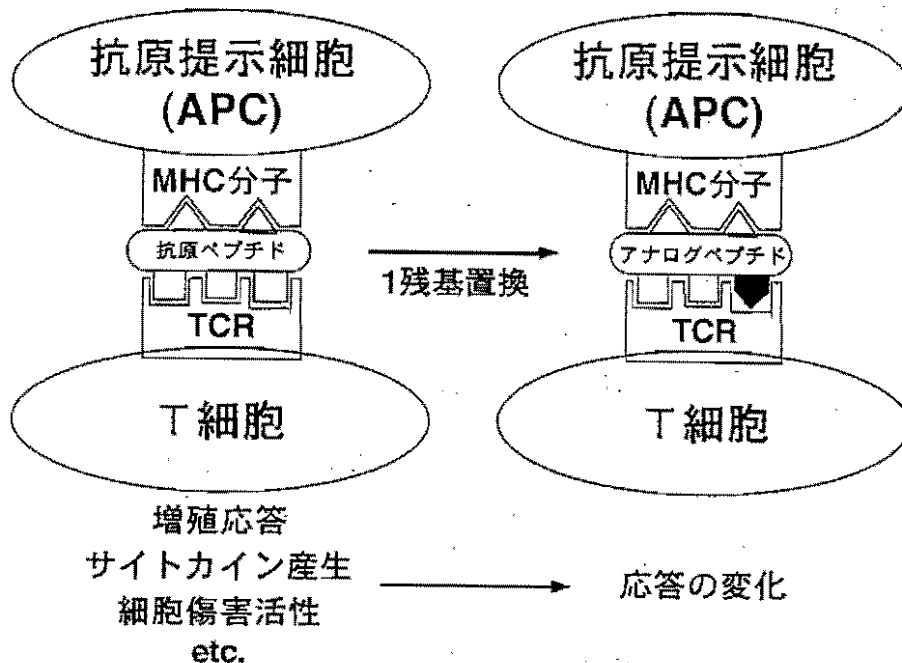


図2 APC/ペプチド/MHC 間相互作用とその変化

本研究においては②を用いた方法に基づき研究を行った。

②のペプチドの構造を変えた方法については最近多くの研究が行われつつある。まず第2部で述べられるTCRアンタゴニストと命名されている免疫特有の現象について述べる。

TCRアンタゴニストペプチドは1992年にDe Magistrisらによって初めて報告された。DR1分子結合性

のインフルエンザヘマグルチニン (HA) 307-319ペプチドをーアミノ酸残基置換したアナログペプチドは、HA307-319の共存下で、HA307-319に対するDR1拘束性のT細胞クローンの応答を効率よく抑制した。このアナログペプチドHA307-319とは無関係な配列を持つDR1分子結合性のペプチドと比較して極端に低濃度で抑制効果を発揮した。その効果はDR1分子に対する競合阻害によるものでなく、当初はMHC分子/アナログペプチド複合体がMHC分子-抗原ペプチド複合体とTCRとが結合するのを競合阻害することによるとされていた。このようなアナログペプチドは薬理学で用いられるアンタゴニストの概念との類似性からTCRアンタゴニストと名付けられた。

TCRアンタゴニストによるT細胞応答の抑制は、抗原ペプチドを認識するT細胞クローンにおいてのみ特異的に引き起こされ、無関係な抗原特異性を持つT細胞クローンに対してはなんの影響も与えない。また、TCRアンタゴニストを認識したT細胞は、無応答状態に陥るわけではなく、再度抗原ペプチドで刺激すると通常の免疫応答を起こす。

したがって本研究の第2部においてはI型アレルギーの原因であるIgEの産生をこのTCRアンタゴニストによって抑制することを試み成功したので報告する。

次に第3部で述べられるT細胞より出される免疫調節因子特にアレルギー抑制サイトカイン γ -IFNの産生を増強する一残基置換ペプチドについての免疫的背景について述べる。

生体の恒常性維持に携わる免疫系には非常に多くの細胞群が関わり、複雑に作用し合って調節されている。前述したようになかでもその調節に最も深く関与しているのはT細胞である。T細胞は細胞表面に発現しているタンパク質抗原によって大きく二種類に分類される。CD8分子を細胞表面に発現しているCD8陽性 (CD8⁺) T細胞と、CD4分子を細胞表面に発現しているCD4陽性 (CD4⁺) T細胞である。CD8分子はMHCクラスI分子と、CD4分子はMHCクラスII分子と、それぞれ親和性を持つことから、多くのCD8⁺T細胞はMHCクラスI分子と結合した細胞内在性抗原由来ペプチドを認識し、CD4⁺T細胞はMHCクラスII分子と結合した細胞外来性抗原由来ペプチドを認識する。ウイルス感染細胞や腫瘍細胞等の細胞内で合成されたタンパク質由来のペプチド断片はMHCクラスI分子と複合体を形成して提示されるため、CD8⁺T細胞により認識される。抗原ペプチド・MHCクラスI分子複合体を認識したCD8⁺T細胞はサイトカインを産生すると同時に、Fasを発現する細胞にアポトーシスを誘導したり、パーフォリンを分泌することにより標的細胞に穴をあけ死に至らしめたりする。したがってCD8⁺T細胞は細胞傷害性T細胞 (CTL) とも呼ばれる。一方、花粉等のアレルゲンや食物抗原等の細胞外来性抗原由来のペプチド断片は、MHCクラスII分子と複合体を形成して提示されるため、主にCD4⁺T細胞に認識される。CD4⁺T細胞はヘルパーT細胞とも呼ばれ、抗原ペプチド/MHCクラスII分子複合体を認識した後、サイトカインや細胞表面分子の発現により、B細胞による抗体産生応答や他のT細胞応答を介助する。

免疫応答の調節に実際に重要な役割を果たしているのはサイトカインである。サイトカインは免疫細胞の分化・増殖・応答等に関与するタンパク質である。CD4⁺T細胞は、そのサイトカイン産生パターンの違いにより、Th1細胞、Th2細胞、Th0細胞と呼ばれるサブセットに分類されている。Th1細

胞は、主にインターロイキン (IL)-2、 γ -インターフェロン (γ -IFN) 等のサイトカインを産生し、細胞性免疫に深く関与している。一方 Th2細胞は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等のサイトカインを産生し、B細胞による抗体産生応答を主体とした液性免疫に深く関与している。Th0細胞に分類されるのは、これらのサイトカインをいずれも産生するような細胞であり、Th1細胞やTh2細胞の前駆細胞といわれている。IL-4等のTh2型サイトカインは、Th0細胞のTh2細胞への分化を誘導するとともに、Th1細胞への分化を抑制する。一方、 γ -IFNやIL-12等のTh1型サイトカインは、Th0細胞のTh1細胞への分化を誘導し、Th2細胞への分化を抑制する。このようにTh1細胞とTh2細胞は相互に抑制し合っており、生体内で過剰な反応を抑制するように巧妙に調節されていると考えられる。しかし、Th1/Th2バランスの崩壊や過剰なT細胞応答により発症すると考えられる免疫疾患が数多く存在し、その抑制が免疫研究の大きなテーマとなっている。

これまで免疫応答の調節には、外来抗原に応答を示すCD4⁺T細胞が主に関わるとされてきたことから、内在性タンパク質由来の抗原ペプチドを認識して細胞障害活性を示すとされてきたCD8⁺T細胞の免疫調節機能についてはCD4⁺T細胞と比較して未知の部分が多かった。

しかし、最近の研究ではCD8⁺T細胞も細胞内在タンパク質由来の抗原ペプチドを認識して細胞障害活性を誘導することにより生体の恒常性維持に関わるのみでなく、細胞外来性抗原を認識して免疫応答の調節なかでも主として免疫抑制に深く関与していることが示されている。当研究室では、外来抗原であり主要なミルクアレルギーである α _{SI}-カゼインに特異的な、CD8⁺T細胞クローンを樹立しこれらの応答の詳細な解析をすすめてきた。

本研究の第3部においてはこれらのCD8⁺T細胞をアナログペプチドによって刺激しアレルギーを抑制する γ -IFNの増強を試みた。

第2部 β -ラクトグロブリン由来ペプチドによる牛乳アレルギーの抑制

IgEはI型アレルギーの原因として知られている免疫グロブリンである。B細胞によるIgEの産生からアレルギーの発症に至る過程には、1. B細胞のIgE産生細胞への分化、2. 抗原によるB細胞およびT細胞の刺激、3. T細胞によるIgE産生細胞に対する抗体産生の介助、4. IgE抗体のマスト細胞への結合、5. 抗原によるIgE抗体架橋のもたらすマスト細胞の脱顆粒化とそれに伴う化学伝達物質の遊離、6. 遊離された化学伝達物質の直接作用による組織の反応とこれらの物質により誘起される好酸球や好塩基球の反応局所への動員、という多くのプロセスが存在する。これらのことから、アレルギーの原因となるIgE産生の抑制が、その治療や予防においても最も重要な課題の一つと考えられる。

本研究でははじめにB6マウスにおいて、アナログペプチドD129S (129番目のアスパラギンをセリンに変えたもの) によるIgE産生抑制効果を評価するためのp119-133特異的IgE産生系の構築を試みた。またわれわれはp119-133は、TCRとMHC分子と図3のような結合をしていることを明らかにしている。我々はこのD129SペプチドにはすでにTCRアンタゴニスト活性があることを証明している。しかし、IgE産生を誘導しやすいアジュバントとして知られる水酸化アルミニウムとともに、ペプチドよりも

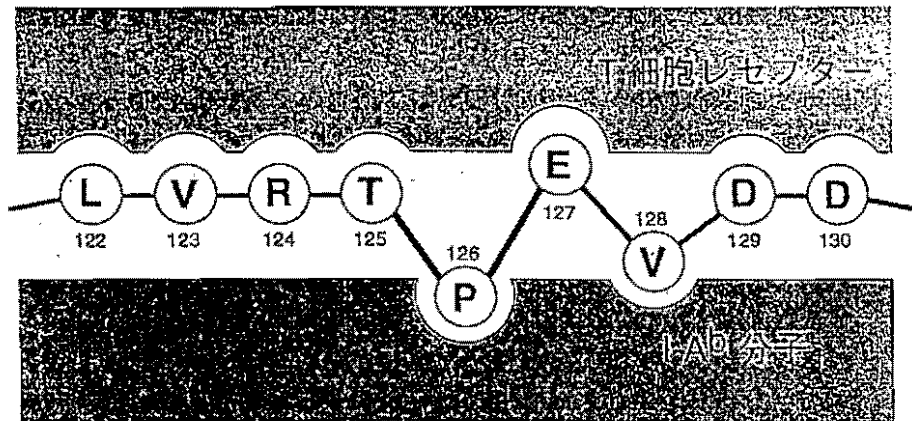


図3 122-130 残基領域の MHC クラス II (I-A^b) 分子、TCR との相互作用の模式図

抗原性が高いと考えられる抗原タンパク質のβ-LGを投与した場合でも、B6マウスではβ-LG特異的IgEは検出されなかった。B6マウスは、リーシュマニアなどの寄生虫に対し感染抵抗性が高く、Th1型の免疫応答に偏り易いことが知られている。Th2細胞によって生産されるIL-4はIgEの産生に重要であるため、B6マウスは、IgE産生を誘導し難いと考えられた。

そこで抗原特異的IgE産生系の構築のため、BDF1マウスの利用を試みた。BDF1マウスはDBA2マウスとC57BL/6マウスをかけ合わせたマウスである。DBA2マウスは遺伝的にアレルギーの発症に関与するTh2型のT細胞を誘導しやすく、BDF1マウスも同様の特性を有している。β-LGと水酸化アルミニウムをBDF1マウス腹腔に投与することにより、β-LGに特異的なIgE産生が誘導できるかどうかを調べたところ、試験した全てのマウスにおいて、β-LG特異的IgEの産生が認められた。また、水酸化アルミニウムとp119-133をBDF1マウスに投与した場合にも、p119-133特異的IgEが誘導された。これらの結果をもとにして、D129Sのp119-133に対するIgE産生抑制効果の評価の系として、BDF1マウスを用いることにした。

前述のようにB細胞によるIgEの産生は、Th2細胞が産生するIL-4によって誘導される。本研究において、われわれはすでにTCRアンタゴニストD129Sはp119-133特異的IgG1の産生を抑制することを示した。IgG1もまたTh2細胞により誘導される抗体であることから、D129Sの投与により生体内におけるp119-133特異的IgEの産生抑制の可能性が示唆された。そこで、抗原ペプチドp119-133に対するIgEの産生をD129Sが抑制できるどうかを解析した。

一次免疫の際、D129Sとp119-133をBDF1マウスに同時に投与することによって、D129Sの効果を調べた。その結果、p119-133を単独投与したマウスに比較して、p119-133とD129Sを同時投与した場合には、p119-133に特異的なIgE抗体価の低下が認められた。TCRアンタゴニストは、生体内の抗原ペプチドに対するIgEの産生を抑制できることが明らかになった。これまでにTCRアンタゴニストを用いることにより生体内でのIgE産生を抑制した例は報告されていない。本節で得られた知見は極めて重

要な成果であり、TCRアンタゴニストのアレルギーの治療や予防への利用に、重要な指針を引き出すものである。

近年、特定のアレルゲンに対するIgEの産生やアレルギー疾患の発症とMHCクラスII分子の間には関連性のあることが報告されている。スギ花粉抗原Lol1とHLA-DR3分子(DRB1*0304)でみられる相関はその一例である。このような現象においてHLA分子の果たす役割はアレルゲンや自己抗原上の抗原ペプチドのT細胞への提示が考えられる。ブタ草花粉の非主要アレルゲンであるAmb Vに対するアレルギー患者は95%がHLA-DQ2分子(DRB1*1501)を有していると報告されている。Huangらは、患者よりAmb V特異的T細胞クローンを樹立し、T細胞抗原決定領域が25-39アミノ酸残基領域に存在すること、そしてDRB1*1501分子によりこの領域に相当するペプチドがT細胞に提示されることを示した。この報告は、T細胞に対しての特定のHLA分子によるアレルゲンの主要なT細胞抗原決定基の提示がアレルギーの遺伝要因となる実例である。

HLA分子とアレルギー発症の関係が明らかになり、HLA分子と結合するアレルゲン上のペプチド配列が決定されれば、応答するT細胞群にTCRアンタゴニストとして働くペプチドを同定し、これを投与することで、アレルギー疾患の予防と治療が可能となるであろう。すでに100種以上に及ぶアレルゲンの一次構造が明らかになるとともに、HLA結合性ペプチドの構造モチーフの道程の研究も進んでいる。今後、これらの情報からアレルゲン上のT細胞抗原決定基が推測できるようになれば、TCRアンタゴニストのアレルギーの治療や予防への応用の可能性が広がるものと考えられる。

第3部 α_{S1} -カゼイン由来ペプチドによるアレルギー反応の抑制

CD4⁺T細胞は、その産生するサイトカインの種類により、Th1型とTh2型に分類される。すなわち、Th1型は γ -IFNやIL-2を産生し、Th2型はIL-4やIL-5を産生する。一方、多くのCD8⁺T細胞は γ -IFN産生を示し、Th1型の応答を示す。Th1型のサイトカインである γ -IFNは、Th1型応答を亢進するとともに、Th2型応答を強く抑制するサイトカインである。既述したように、多くのCD8⁺T細胞が細胞内由来抗原に反応して細胞傷害活性を示すのに対し、外来抗原に反応するCD8⁺T細胞は免疫系の調節にも深く関与していると考えられ、 γ -IFN産生を示してTh2型応答の抑制にも関わっていることが示されている。

Th2型の応答により誘導される免疫系疾患として、I型アレルギーが知られている。I型アレルギーは、IL-4により誘導されるIgE抗体が原因と考えられている。したがって、Th1型応答を誘導することによりI型アレルギーの抑制を試みた報告が多数存在する。Th2型応答の抑制能を有する γ -IFN産生を選択的に誘導することも、I型アレルギー等のTh2優勢な応答により誘導される免疫系疾患を抑制するのに有効であると考えられる。特に、その多くがTh1型を示すCD8⁺T細胞応答を調節して γ -IFN産生を増強することは、CD4⁺T細胞主体のTh2型応答を抑制するのに効果的であると考えられる。しかし、外来抗原に反応を示すのはCD4⁺T細胞であり、CD8⁺T細胞は細胞内由来抗原に反応するとされてきたため、外来抗原であるアレルゲンに対するCD8⁺T細胞の応答はCD4⁺T細胞の応答と比較して詳

しく解析されてこなかった。そこで当研究室では、 α_{s1} -カゼインでマウスを免疫することにより、抗原特異的なCD8⁺T細胞クローンを複数樹立し、その応答を詳細に解析してきた。これらのクローンは α_{s1} -カゼインの部分ペプチド (p142-149) に応答して抑制性サイトカインであるIL-10、 γ -IFN産生を示し、免疫応答の調節に深く関与していると考えられた (図4)。これらのCD8⁺T細胞クローンの応答を修飾し、その機構を明らかにする目的から、p142-149の結合部分以外の残基を他アミノ酸に置換したアナログペプチドを作製し、それらに対する各CD8⁺T細胞クローンの応答を解析した。

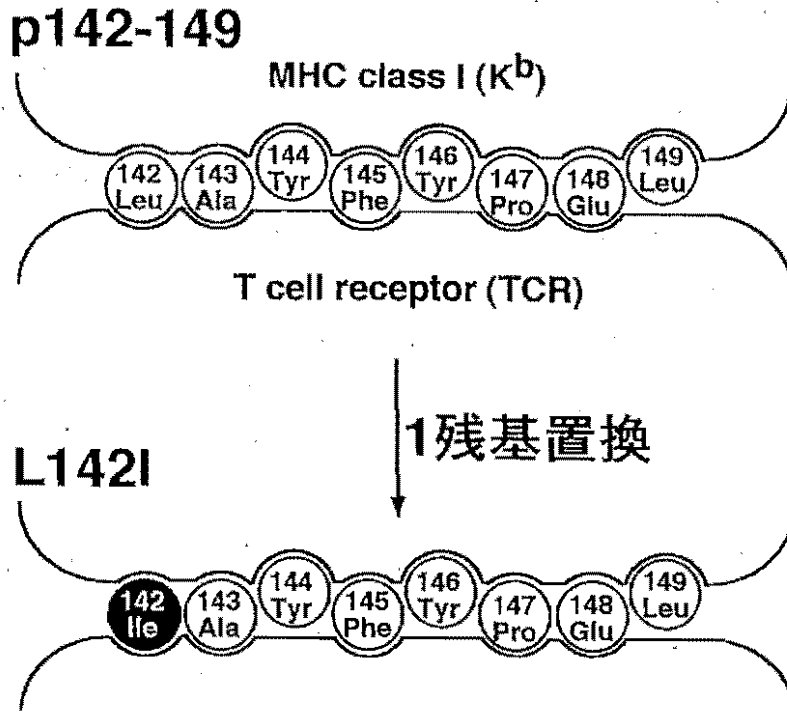


図4 α_{s1} -カゼインの部分ペプチド p142-149 及びそのアナログペプチド

これまでに、アナログペプチドを用いた α_{s1} -カゼイン特異的CD8⁺T細胞クローン5F1、6B1、Uc、Udの応答の解析により、142番目のLeu残基をIleに置換したL142Iが、複数のクローンの γ -IFNの産生を増強する活性を有することが明らかとしている。アレルゲン特異的CD8⁺T細胞の γ -IFN産生を増強することは、I型アレルギーにおけるアレルゲンに対するCD4⁺T細胞主体のTh2型応答を抗原特異的に効率よく抑制するのに有効であると考えられた。そこで実際の免疫応答系により近いと考える系を用いて実験した。すなわちp142-149の免疫により得られたCD8⁺T細胞、CD8⁺T細胞除去リンパ節細胞の γ -IFN産生応答を調べた。

C57BL/6マウスにp142-149をCFAH37Raとともに乳化したものを投与し、一週間後リンパ節細胞を分離し、CD8⁺T細胞とCD8⁺T細胞除去リンパ節細胞を得た。それぞれCD8⁺T細胞の含有率は、90%、0.1%であった。得られた細胞を様々な濃度のp142-149で刺激し、 γ -IFN産生を測定した。CD8⁺T細胞

は、p142-149に対して大量の γ -IFN産生を示したが、CD8⁺T細胞を除去したリンパ節細胞からの γ -IFN産生は検出されなかった。また、抗原を含まないPBSとアジュバントを乳化して免疫した場合、CD8⁺T細胞からの γ -IFN産生は全く認められなかった。p142-149の免疫によりCD8⁺T細胞のみが選択的に活性化されることが示された。

次にp142-149、L142 I、F145H免疫により得られたポリクローナルCD8⁺T細胞の各ペプチドに対する応答を調べた。

C57BL/6マウスにp142-149、L142 I、あるいはF145HをCFAH37Raとともに乳化したものを投与し、摘出したリンパ節細胞からマグネティックビーズを用いてCD8⁺T細胞を濃縮した。回収したCD8⁺T細胞（純度約95%）をそれぞれ3種類のペプチドで刺激し、培養上清中の γ -IFN産生量を測定した。

p142-149免疫により得られたポリクローナルなCD8⁺T細胞は、クローンの場合と同様に、L142 I刺激に対して強い γ -IFN産生を示した。しかし、F145H刺激に対する γ -IFN産生応答はほとんど認められなかった。L142 Iの免疫によって得られたCD8⁺T細胞は、L142 Iのみならずp142-149刺激に対しても γ -IFN産生を示したが、F145H刺激に対しては全く応答を示さなかった。それに対し、F145H免疫によって得られたCD8⁺T細胞は、F145H自身以外にはほとんど応答せず、非常に高濃度のL142 Iに僅かに反応したのみであった。L142 I免疫により得られたCD8⁺T細胞は、p142-149の免疫により得られたCD8⁺T細胞よりも、p142-149に対して約2倍量の γ -IFN産生を示した。F145Hの免疫により得られたCD8⁺T細胞は、p142-149に対する γ -IFN産生を全く示されなかった。これらの結果から、L142 I/K^b分子複合体とp142-149/K^b分子複合体の立体構造が類似していること、F145H/K^b分子複合体のみ構造が大きく異なること、が示唆された。アナログペプチドの免疫により、その野生型ペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を増強できたことから、アナログペプチドがペプチドワクチンとして有効である可能性が示された。

次に α _{SI}-カゼインにより誘導されるBALB. BマウスのTh2型応答に対するL142 Iの効果を調べた。

L142 Iでマウスを免疫することにより、p142-149に対して γ -IFN産生応答を示しうるCD8⁺T細胞が、*in vivo*で効率よく活性化されていることが示された。L142 I免疫により効率よく誘導された γ -IFN産生を示すCD8⁺T細胞が、 α _{SI}-カゼインの免疫により誘導されるTh2型応答を抑制できる可能性が考えられた。まず、BALB. BマウスにおいてもC57BL/6と同様、L142 I免疫により、*in vitro*でのp142-149刺激に対する γ -IFN産生の増強が認められることを確認した。そこで、 α _{SI}-カゼイン特異的なTh2型応答（脾臓細胞のIL-4産生、血清中IgE、IgG₁産生）、Th1型応答（脾臓細胞の γ -IFN産生、IgG_{2b}産生）を調べ、L142 I同時投与の効果を検討した。

今回試した免疫方法では、p142-149の投与により、全脾臓細胞の α _{SI}-カゼイン刺激に対する γ -IFN産生の増強やIL-4産生の低下はそれぞれ認められたが、それらが同時に誘導されることはなく、逆にIL-4産生が増強されることもあった。また、p142-149よりTh2型応答を強く抑制する活性をもつと期待されたL142 Iは、Th1型応答、Th2型応答にほとんど影響を及ぼさなかった。今回の実験系では、ペプチドの投与によりTh1/Th2応答のバランスを変換することはできなかったが、Th1/Th2応答の balan

スは非常に微妙に調節されていると考えられることから、アジュバントや抗原の投与量についてさらに検討していくことにより、効果的な免疫方法が得られると思われる。

第4部 α_{SI} -カゼイン由来ペプチドの経口投与とその腸管免疫系に及ぼす影響

α_{SI} -カゼインの部分ペプチドであるp142-149の経口投与により、IELs (腸管上皮内リンパ球)、PP (パイエル板)、およびMLN (腸間膜リンパ節) のCD8またはCD4の発現に変化が認められるか否かを、フローサイトメーターを用いて検討した。各臓器の細胞を分離後、抗CD8抗体及び抗CD4抗体で染色し、解析した。p142-149はCD8⁺T細胞の抗原決定基であるため、CD8⁺T細胞が反応してその数が増加していることも考えられたが、IELs、PP、およびMLNどの細胞でも、CD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞の割合に変化は認められなかった。またIELsは $\gamma\delta$ IELsと $\alpha\beta$ IELsという2種類のTCRを発現しているT細胞が含まれていることが特徴であるため、IELsについては抗TCR抗体でも染色し、TCRの発現の変化も同様にしてフローサイトメーターを用いて検討した。その結果TCRの発現にも変化が認められなかった。さらに、経口投与群と対照群を比較しても、各臓器の細胞数、つまり収率に変化は認められなかった。

次に、p142-149の経口投与による応答性の変化を γ -IFN産生を指標にその応答性の変化を検討した。抗原の経口投与開始2週間後、必要な臓器を摘出した後各細胞を調製した。IELsの場合は 4×10^4 cells/wellと 2×10^5 cells/wellの抗原提示細胞 (x線照射した同系マウスの脾臓細胞)、またはPPおよびMLNの場合は 4×10^4 cells/wellの濃度で、10mMのp142-149とともに37°Cで72時間培養し、その培養上清中の γ -IFNをELISAにて測定した。その結果をTable 1に示した。p142-149を経口投与したマウスのIELsからの γ -IFN産生は、in vitroにおける抗原刺激を加えなくても対照群由来のIELsよりも増加していた。これらのことより、IELs中のCD8⁺T細胞が経口的に摂取された抗原を認識し、 γ -IFNを産生することが示唆された。

本研究では、牛乳中の主要なタンパク質の部分ペプチドp142-149の経口投与によってIELsを活性化することに成功した。さらに、このIELsの抗原認識はMHCクラスI分子拘束であることも強く示唆された。

p142-149の経口投与によって γ -IFNの産生が促進された。経口抗原に反応して、 γ -IFNを産生することは腸管内の恒常性を維持するのに重要な意味を持つと考えられる。なぜならば、IELsの産生する γ -IFNによってIECsのMHCクラスII分子の発現が促進されることも報告されている。従って、IELsは経口抗原に反応して γ -IFNを産生して周囲のIECsのMHCクラスII分子の発現を促進している可能性がまず考えられる。さらに、IELsは細胞傷害活性を有していることから、周囲のIECsを細胞傷害活性によって除去しIECsの再生を促進させているとも推察される。また本研究では γ -IFN産生しか検討していないが、IELsが様々な上皮細胞に作用するサイトカインを産生しうる事が近年報告されており、経口抗原に反応してこれらのサイトカインを産生し、腸管の恒常性を保っている可能性も考えられるであろう。さらに、食品アレルギー患者のIELs数が増加するとの報告や、牛乳アレルギー患者の末梢血

より樹立された α_{51} -カゼイン特異的なクローンは γ -IFN を高産生することが報告されている。現在のところ、CD8⁺T細胞からの γ -IFN産生がアレルギーの発症に関与しているのか、あるいは抑制に働いているのかは議論の余地が残されているものの、牛乳アレルギーにおいてCD8⁺T細胞が γ -IFNを産生して何らかの作用を及ぼしていると考えられる。従って、腸管内のCD8⁺T細胞の抗原決定基を経口的な投与によって γ -IFN産生を促進できたことは、牛乳アレルギー発症のメカニズムの解明あるいは予防に重要な知見を与えてくれるものと考えている。

文献

1. M. Kohyama, et al. Selective induction of CD8⁺ T cell functions by single substituted analogs of an antigenic peptide: distinct signals for IL-10 production. *FEBS Letters* (in press)
2. H. Nakajima-Adachi, et al. Determinant analysis of immunoglobulin E and immunoglobulin G4 antibodies and T cells specific for bovine α s1-casein from the same individual cow's milk patients. Existence of α s1-casein-specific B cells as well as T cells characteristic in cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* (in press)
3. K. Shida, et al. Lactobacillus casei inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
4. Y. Takahashi, et al. MHC class II/T cell receptor interactions potentiate secretion of IgG but not IgM in response to T-dependent antigens. *Immunol. Letters* (in press)
5. M. Totsuka, et al. Fine mapping of T-cell determinants of bovine β -lactoglobulin. *Cytotechnology* (in press)
6. M. Totsuka, et al. Antigen-specific inhibition of CD4⁺ T-cell responses to β -lactoglobulin by its single amino acid-substituted mutant form through T-cell receptor antagonism. *Cytotechnology* (in press)
7. K. Nishijima, et al. Oral administration of antigen does not influence the proliferation and IFN- γ production of responsive CD8⁺ cells, but enables us to establish T cell clones with different cytokine profile. *Cytotechnology* (in press)
8. M. Kohyama, et al. Analysis of cytokine producing activity of intestinal intraepithelial T cells from TCR- γ chain and δ -chain mutant mice. *Microbiol. Immunol.* 41, 353-359 (1997)
9. T. Yoshida, et al. 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 (1997)
10. K. Nishijima, et al., Enhancing effect of interleukin-4 on the secretion of interferon-g by α s₁-casein-specific CD8⁺T cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 1156-1162 (1997)
11. M. Kohyama, et al., Analysis of cytokine producing activity of intestinal

- intraepithelial T cells from TCR β -chain and γ -chain mutant mice. *Microbiol. Immunol.* 41, 353-359 (1997)
12. T. Yoshida, et al., The oral administration of low-dose antigen induces activation followed by tolerization, while high-dose antigen induces tolerance without activation. *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 82, 207-215 (1997)
 13. S. Kaminogawa, Food allergy, oral tolerance and immunomodulation-their molecular and celler mechanisms. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 1749-1756 (1996)
 14. Y. Takahashi, et al., The direct cloning of the immunoglobulin VH genes from primary cultured B cells specific for a short peptide. *J. Biotechnol.* 172, 200-204 (1996)
 15. Y. Yoshizawa, et al., In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from marine alga (Gracilaria verrucosa). *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 1667-1671 (1996)
 16. A. Hosono, et al., Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from Bifidobacterium adolescentis M101-4. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 312-316 (1996)
 17. Y. Minai, et al., Difference in signal transduction for IL-10 and IFN- γ production in a CD8⁺T cell clone. *Cell. Immunol.* 172, 200-204 (1996)
 18. H. Nakajima, et al., Establishment and characterisation of α_{s1} -casein-specific T cell lines from cow's milk-allergic patients: Unexpected higher frequency of CD8⁺T cell lines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 1342-1349 (1996)
 19. Y. Dan, et al., IL-3 augments TCR-mediated responses of type 2 CD4 T cells. *J. Immunol.* 156, 27-34 (1996)
 20. A. Ametani, et al., Consecutive events of growth, differentiation and death of the small intestinal epithelial cell line, IEC-6. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 32, 127-130 (1996)
 21. S. Kaminogawa, A. Ametani. Milk proteins. Structure of antigen, Volume 3 (ed. by M. H. V. Van Regenmortel) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp387-411 (1996)
 22. Y. Yoshizawa, et al., Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (Porphyra yezoensis) : Structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1933-

1937 (1995)

23. K. Nishijima, T. Hisatsune, et al. α_{s1} -casein-specific CD8⁺ T cell clone that inhibits its own interferon- γ production by producing interleukin-10. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 2274-2276 (1995)
24. K. Hirahara, T. Hisatsune, et al., 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 (1995)
25. K. Hirahara, T. Hisatsune, et al., 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 (1995)
26. T. Hisatsune, K. Nishijima, et al., CD8⁺ T cells specific to the exogenous antigen: mode of antigen recognition and possible implication in immunosuppression. *J. Immunol.* 154, 88-96 (1995)