

学位論文題名

Hyposensitization Attenuates Airway Inflammation and Antigen-Induced Proliferative Response by Lymphocytes in a Rat Model of Bronchial Asthma.

(ラット気管支喘息モデルにおける気道炎症と
抗原誘発リンパ球増殖反応の減感作による減弱)

学位論文内容の要旨

減感作療法は、古くから気管支喘息の治療に用いられている。しかし、その作用機序は未だ十分に解明されてはいない。喘息患者を対象にした検討では、主に血清中の免疫グロブリン (IgE、IgG1、IgG4) の変動が研究されてきた。しかし、喘息の病態の中心である気道炎症と呼吸生理学的指標の関連については確立していない。そこで今回、ラットの気管支喘息モデルに減感作処置を施し気道反応性の変化を検討すると共に、気道の炎症細胞を回収し免疫学的な解析を行った。

動物モデルの作成には、IgE産生能が高いBrown-Norway系ラットを使用した。感作群(喘息モデル)には、1日目に卵白アルブミン(以下OAと略す)を水酸化アルミニウムゲルに混和したものを皮下注射し、同時に百日咳ワクチンを腹腔内投与した。さらに15日目にOAを吸入させ、23日目にはOA吸入による気道収縮を誘発した。一方、15日目までに同様の感作を施行し、17日目から22日目には減感作処置としてOAを腹腔内投与した群を減感作群とした。また、OAを含まない溶液だけを注射し、次いで吸入させた動物群は非感作対照群とした。それぞれの群について、23日目にOAまたはアセチルコリンを吸入させ、気道内圧の測定を実施した群と、それらを吸入させずに気管支肺胞洗浄液(以下BALFと略す)分析と血清中のIgE測定、末梢血リンパ球の抗原に対する幼若化反応などを検討した動物群を別に用意した。BALF細胞はスライドグラスに遠沈固定後、メイギムザ染色を行った。またリンパ球はFITC標識・抗CD4抗体、または同・抗CD8抗体を結合させた後、フローサイトメリーによる解析を行った。ラット末梢血から比重遠沈法により分離したリンパ球を用いて、抗原(OA)存在下で72時間培養し、トリチウムチミジンの取り込みを測定し、リンパ球幼若化反応を検討した。OAに特異的なIgE抗体価は、サンドイッチELISA法により測定した。

各群のラットについて23日目に全身麻酔下に機械換気をしながら気道内圧をモニターした。対照液として生理食塩水を吸入させたが、各群とも気道内圧に変化はなかった。OA吸入時に非感作対照群での気道内圧は前値の 105 ± 2 (SD)%と変化しなかったが、感作群(喘息モデル)では 189 ± 16 %と有意に上昇した。感作群での気道内圧の上昇は、気管支拡張剤吸入により速やかに下降した。また、気道内圧上昇を示したラットの病理所見は、強い気管支収縮と周囲への炎症細胞浸潤であった。一方、17日目から22日目に腹腔内への抗原投与を行った群(減感作群)では気道内圧の前値は他の群と有意差はなく、抗原吸入後の気道内圧は前値の 131 ± 10 %にとどまり、感作群と比較して有意に低かった。同

様の機械換気下にアセチルコリンを吸入させて気道内圧が前値の2倍になった時点のアセチルコリン濃度で、非特異的な気道過敏性を評価すると、非感作対照群では 1.83 ± 0.14 (SD)U ($U = -\log[\text{Ach}(M)]$)、感作群では 2.43 ± 0.09 U、減感作群では 2.37 ± 0.08 Uであり、感作群では有意に気道過敏性が亢進していた。一方減感作群では、抗原に対する反応が抑制された状態にありながら、非特異的な気道過敏性は改善していなかった。

気道の炎症を反映してBALF中では主にリンパ球、好酸球が増加していた。減感作処置は有意にこれらの細胞数を減少させたが、依然として非感作対照群よりも増加していた。さらに感作群では非感作対照群に比べてCD4+細胞数、CD8+細胞数共に有意に増加しており、特にCD4+細胞の増加が大きいため、CD4/CD8比が増大していた。減感作群では感作群に比べてCD4+細胞が減少していたが、CD8+細胞は変化がなく結果的にCD4/CD8比が低下していた。

末梢血リンパ球増殖能については、OA非存在下では各群間に有意差を認めなかったが、OA存在下では感作群が非感作群よりも有意に高値を示し、減感作群は感作群よりも有意に低く、非感作対照群とほぼ同じ程度であった。

血清中OA特異的IgE抗体価は、感作群では非感作対照群に比して有意な上昇を示した。減感作群でもIgEの上昇があり、感作群との間に有意差を認めなかった。

以上の結果をまとめるとラットの感作群では抗原特異的IgEの上昇、抗原による即時型気道収縮の誘発、非特異的な気道過敏性の亢進、気道への好酸球とCD4+リンパ球の出現など、ヒトの気管支喘息と共通する所見が多数認められ、喘息モデルとみなしうると考えられた。また、このモデルに対して比較的多量の抗原を全身投与した後では抗原吸入時の気道収縮が抑制されていた。この変化はヒトでの減感作に相当し、それに要する期間はヒトでは数ヶ月かかるのに比べて、我々のモデルでは7日間と短かった。このことは、ヒトについても副作用が大きくなる範囲で至適な抗原投与方法が工夫されれば、より短期間に減感作を成し得ることを示唆している。実際にヒトにおいても数週間の減感作処置で、喘息症状からの離脱を行う試みが報告されつつある。

抗原に対する気道の反応とは対照的に、非特異的な気道過敏性は減感作処置後も変化がなかった。ヒトでは減感作後の非特異的な気道過敏性が改善したとする報告と、不変とする報告がある。我々のモデルでは減感作処置後の抗原特異的な気道収縮が抑制された状態でも、気道には依然として好酸球、リンパ球が残存していた。このような気道炎症の持続が非特異的な気道過敏性を亢進させている可能性がある。気道上の抗原特異的なアレルギー反応の抑制が持続されれば、炎症細胞も消失し気道過敏性も正常化するものと推定されるが、今回の実験では減感作の期間が7日間と短いため、そこまでは至らなかったと考えられる。

減感作成立の機序として、以前から諸説が検討されている。IgE抗体産生の減少やIgG型阻止抗体の増加が気管支喘息や鼻炎などで報告されている。しかし、これらの抗体価の変動が、アレルギー症状の改善と常に並行しているわけではない。我々の動物モデルではIgEの有意な変動はなく、一方、気道粘膜上の炎症細胞の減少が観察された。この結果は細胞性免疫反応の変化が、減感作を誘導している可能性を示唆するものと考えられる。またヒトの喘息ではCD4+リンパ球が活性化していることや、Tリンパ球が主にIL-4、IL-5などのサイトカインを産生していることも報告されている。我々の動物モデルにおいても、サイトカイン産生の変化を介して即時型アレルギー反応を減弱させている可能性が推測された。また減感作群では抗原に対するリンパ球の反応性も低下していたが、同様の変化はヒトでも報告されており、リンパ球の機能面でも我々のモデルはヒトの減感作状態と同様の傾向を示した。このようなリンパ球を中心とした一連の細胞性免疫の変化が動物モデルにおいても存在し、減感作の成立に重要な役割を担っていると推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Hyposensitization Attenuates Airway Inflammation and Antigen-Induced Proliferative Response by Lymphocytes in a Rat Model of Bronchial Asthma.

(ラット気管支喘息モデルにおける気道炎症と
抗原誘発リンパ球増殖反応の減感作による減弱)

減感作療法は気管支喘息の治療に古くから用いられ、有効な治療法の一つとして現在も続けられているが、その作用機序はまだ十分に解明されていない。喘息患者を対象にしたものでは主に血清 I g E 値の変動が検討されているが、必ずしもその値と効果は平行しないと報告が多い。また現在、喘息の病態の中心と考えられている気道の炎症細胞の動態を、減感作療法について検討した報告は少ない。そこで、ラットの気管支喘息モデルに減感作処置を施した後、気道収縮反応・気道の炎症細胞・気道過敏性・I g E 抗体価・抗原に対するリンパ球の反応を調べた。

I g E 産生能が高い Brown-Norway 系ラットを使用し 1 日目に卵白アルブミン (以下 O A と略す) を水酸化アルミニウムゲルに混和したものを皮下注射し、同時に百日咳ワクチンを腹腔内投与した。さらに 15 日目に O A を吸入させた。一方、15 日目までに同様の感作を施行し、17 日目から 22 日目には減感作処置として O A を腹腔内投与した群を減感作モデルとした。また O A を含まない溶液だけを注射、吸入した動物群は非感作対象群とした。それぞれの群において、23 日目に O A またはアセチルコリンを吸入した際の気道内圧を測定した。また、同様の処置をした別のラットを各群用意し、気管支肺胞洗浄液 (以下 B A L F と略す) 分析、血清中の O A 特異的 I g E 抗体価、抹消血リンパ球の抗原に対する増殖反応を検討した。

結果は、感作群では抗原特異的 I g E 抗体価の上昇、抗原吸入時の即時型気道収縮の誘発、非特異的な気道過敏性の亢進、気道への C D 4 + リンパ球、C D 8 + リンパ球、好酸球集積、抗原に対する抹消血リンパ球増殖反応の亢進を認め、ヒトの気管支喘息に相当すると考えられた。減感作群では、抗原吸入時の即時型気道収縮の減弱、気道における C D 4 + リンパ球と好酸球の減少、抗原に対する抹消血リン

パ球増殖反応の減弱を認めたが、非特異的な気道過敏性は有意な改善を示さず、抗原特異的 I g E 抗体価も有意な低下を認めなかった。以上より本モデルでは、減感作処置後の気道の炎症細胞の量的、機能的変化が減感作の成立に必要であるが、I g E 抗体の関与は少ないと考えられた。

審査にあたっては、副査上出教授より、1. ヒトの喘息と比べて異なる点について、2. ラットを実験動物に選んだ理由について、3. リンパ球の増殖反応が抑制される機序について、4. 抗原に対する気道反応性亢進の持続期間についての質問と、5. 抗原投与量によっては抑制性 T 細胞が誘導され得るとのコメントがあった。

次いで、副査川上教授から、1. リモデリングが生じるほどの長い感作期間ではないことが減感作を検討するうえで適切かについて、2. 炎症細胞は減少しているが非特異的な気道過敏性が減感作群で改善しなかったことについて、3. 減感作後に気道に残存している炎症細胞の作用についての質問があった。

さらに、主査小林教授から 1. IgE 産生能が高いラットを使った理由について、2. IgE と減感作の関係について、3. IgG 抗体の変動について、4. 検査前日まで投与されていた抗原の影響について、5. 減感作後の病理学的所見についての質問があった。また、6. 抗原に対するリンパ球増殖反応が減感作によって抑制された機序についての検討が重要であるとのコメントがあった。いずれの質問に対しても、申請者は研究内容に関する臨床での知見や、免疫学的な基礎的研究の文献を引用し適切な回答を行った。

今後、この気管支喘息減感作療法モデルを用いることにより、減感作成立の機序をさらに詳細に解明することが出来ると期待される。

審査員一同は、気管支喘息減感作誘導時に気道上で観察された細胞性免疫の変化についての研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。