

氏名	まつなが よういち 松永洋一
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2263号
学位授与の日付	平成12年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Oral immunization with size-purified microsphere beads as a vehicle selectively induces systemic tolerance and sensitization. (生体内分解性高分子抗原担体粒子を用いた経口免疫による、免疫制御についての検討)
論文調査委員	(主査) 教授 坂口志文 教授 湊長博 教授 北徹

### 論文内容の要旨

#### 要約

経口免疫寛容療法を自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療に応用するためには大量の抗原を経口投与する必要があり、このことが臨床応用上の制約となっている。生体内分解性高分子ポリマー粒子 (Poly D, L-Lactic acid, 以降 PDLLA) を抗原担体として用い、更に、粒子サイズを均一化して腸管附属リンパ組織あるいは脾臓への抗原の標的化を行うことにより、効率よく選択的に免疫反応の増強と寛容を誘導することが可能であった。

#### 背景

PDLLA に包含した抗原は、生体内で80日以上抗原を徐放する。経口投与すると粒子サイズにより抗原は選択的にパイエル版もしくは脾臓に移行し、血中の抗原特異的抗体価を上昇させる。今回3種類の粒子サイズのPDLLA に包含した卵白アルブミン抗原を経口投与し、最も効率よく免疫寛容が成立するための条件を探り、免疫反応誘導組織でのサイトカイン応答を解析した。

#### 方法

OVA 含有 PDLLA 微粒子をダブルエマルジョン法により作成し、エルトリエーターにより径  $3\sim 4\mu\text{m}$  (以降  $3\mu\text{m}$ )、 $7\sim 10\mu\text{m}$  ( $7\mu\text{m}$ )、 $15\sim 20\mu\text{m}$  ( $15\mu\text{m}$ ) の3種類にサイズ分画した。2mg の OVA を含有する PDLLA を Balb/c マウスの胃内に1回注入投与した。OVA を皮下チャレンジした後、OVA に対する遅延型反応と血中および糞便中 OVA 特異的抗体価を測定し、経口投与の効果を判定した。同様に、OVA 含有 PDLLA で経口免疫した OVA 特異的 T 細胞抗原受容体トランスジェニックマウスの小腸パイエル版および脾臓より、CD4 陽性細胞を精製し in-vitro で抗原刺激し抗原特異的サイトカインを定量した。 $^{125}\text{I}$  でラベルした3種類の径の PDLLA を同様に投与し、小腸パイエル版および脾臓への移行を確認した。

#### 結果

$3\mu\text{m}$  群のみ経口投与4、6週間後に OVA 特異的抗 IgG1, IgG2a 抗体の上昇を認めた。皮下チャレンジ後  $7\mu\text{m}$  群では糞便中 OVA 特異的 IgA 抗体の上昇を認めたが、100mg の水溶性抗原と同程度に抗原特異的 IgG 抗体価と遅延型反応を抑制した。対照的に  $3\mu\text{m}$  群は、コントロールの3倍の血中抗原特異的 IgG 抗体価の増加をみとめた。抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生を検討すると、パイエル版では、 $7\mu\text{m}$  群で IFN- $\gamma$  の著明な増加と IL-4 の産生低下を認めた。脾臓 CD4 陽性 T 細胞ではこの差は認められなかった。 $^{125}\text{I}$  でラベルした PDLLA 微粒子のうち、 $3\mu\text{m}$  と  $7\mu\text{m}$  のみがパイエル版細胞に移行し、 $3\mu\text{m}$  の PDLLA のみが脾臓に移行していた。

#### 考察

PDLLA はアジュバント作用を有し、 $3\mu\text{m}$  径の PDLLA 粒子では経口投与単独でも IgG1 と IgG2a 型の抗体価の上昇を認めた。経口で前投与した PDLLA 粒子のサイズにより皮下チャレンジ後の免疫応答に差を生じた。 $7\mu\text{m}$  群では水溶性抗

原の50倍の効率で液性・細胞性免疫の抑制を示したが、 $3\mu\text{m}$  群では逆に免疫反応を増強した。PDLLA 微粒子のアジュバント作用、体内臓器における抗原の安定性と徐放性、とりわけ微粒子の体内分布の違いがこの差を生じたと考えられる。

$7\mu\text{m}$  の微粒子を投与されたマウスのパイエル版 CD4陽性 T細胞は、粘膜局所において寛容誘導に重要な作用を有する IFN- $\gamma$  を強く産生していた。 $7\mu\text{m}$  の微粒子がパイエル版細胞に選択的に取り込まれ、長期間抗原特異的 T細胞を刺激したと考えられる。即ち、適切なサイズに分画した抗原含有 PDLLA 微粒子を経口投与することにより、全身性免疫を制御することが可能である。このことは感染症に対するワクチン開発や、自己免疫疾患に対する寛容誘導を臨床応用する上で極めて重要な知見であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

生体内分解性高分子ポリマー粒子 (PDLLA) に包含した抗原は、経口投与すると、粒子サイズにより、小腸パイエル板もしくは脾臓に移行した後、生体内で抗原を徐放し、血中の抗原特異的抗体価を上昇させる。そこで本研究では、経口で抗原を投与した際、抗原の体内における分布の差が質的に異なる免疫反応を誘導するのか、また免疫感作あるいは寛容が成立するための、至適条件を明らかにするため、3種類の粒子サイズの PDLLA に包含した卵白アルブミン抗原 (OVA) を経口投与し、免疫反応誘導組織でのサイトカイン応答を解析した。経口投与後の皮下チャレンジでは  $7\mu\text{m}$  の粒子サイズ群では OVA 特異的 IgA 抗体の上昇と、OVA 特異的 IgG 抗体反応と遅延型反応が抑制された。対照的に  $3\mu\text{m}$  群では IgG 抗体反応の増加を認めた。小腸パイエル板および脾臓の CD4 陽性 T細胞のうち、 $7\mu\text{m}$  群のパイエル板細胞で抗原特異的 IFN- $\gamma$  の著明な増加と IL-4 の産生低下を認めた。 $^{125}\text{I}$  ラベル PDLLA 微粒子のうち、径  $3\mu\text{m}$  と  $7\mu\text{m}$  がパイエル板細胞に移行し、 $3\mu\text{m}$  のみが脾臓に移行していた。

以上の研究は、PDLLA を担体として抗原を経口投与して、腸管附属リンパ組織あるいは脾臓へ抗原の標的化を行うと、効率よく選択的に免疫反応の増強と寛容を誘導することが可能であることを示すものであり、臨床医学に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年4月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。