

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

あたらしい眼科 (1997.10) 14巻10号:1563～1566.

Anterior Chamber-Associated Immune Deviationにおけるインターロイキン  
10の関与

秋葉真理子、吉田逸朗、秋葉純、吉田晃敏、東匡伸

# Anterior Chamber-Associated Immune Deviation における インターロイキン 10 の関与

秋葉真理子\*<sup>1</sup> 吉田逸朗\*<sup>1</sup> 秋葉 純\*<sup>2</sup> 吉田晃敏\*<sup>2</sup> 東 匡伸\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> 旭川医科大学細菌学教室 \*<sup>2</sup> 同 眼科学教室

## Participation of Interleukin 10 in Anterior Chamber-Associated Immune Deviation

Mariko Akiba<sup>1)</sup>, Itsuro Yoshida<sup>1)</sup>, Jun Akiba<sup>2)</sup>, Akitoshi Yoshida<sup>2)</sup> and Masanobu Azuma<sup>1)</sup>

Department of Microbiology<sup>1)</sup>, Department of Ophthalmology<sup>2)</sup>, Asahikawa Medical College

Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) の特徴である遅延型過敏反応の選択的な抑制におけるインターロイキン 10 (IL-10) の関与を検討した。BALB/c マウスの前房 (ACAID 群) あるいは皮下 (遅延型過敏反応群) にウシ血清アルブミン (BSA) を接種後、右足蹠に BSA あるいは卵白アルブミンを接種した。前房接種後、経時的に眼球、脾臓、足蹠を摘出し、組織中の IL-10 およびインターフェロン  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) を ELISA 法で測定した。前房に抗原を接種した眼球内および脾臓の IL-10 量は接種前と差はなく、経時変化も認められなかった。しかし、足蹠においては ACAID 群の IL-10 は抗原特異的に増加し、遅延型過敏反応群でみられた IFN $\gamma$  の増加が認められなかった。以上の結果から、IL-10 は ACAID 誘発部位である眼球および脾臓ではなく、遅延型過敏反応の発現部位である局所で ACAID の遅延型過敏反応抑制に関与している可能性が示唆された。

We investigated whether interleukin 10 (IL-10) participated in the suppression of delayed type hypersensitivity (DTH) by anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). BALB/c mice were injected with bovine serum albumin (BSA) to the right anterior chamber (ACAID group) or injected subcutaneously (DTH group), and on day 10 were injected with BSA or ovalbumin to the right foot pad. Extracts of eyes, spleens and foot pads were prepared at specified time intervals after anterior chamber inoculation; IL-10 and interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) were then measured in these tissues by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The level of IL-10 in eye and spleen did not significantly increase after intraocular inoculation. However, IL-10 in foot pads of the ACAID group increased antigen-specifically. Moreover, IFN $\gamma$  increase was seen in foot pads of the DTH group but not of the ACAID group. Presumably, in the suppression of DTH expression by ACAID, IL-10 participates at the affected region of DTH reaction, not the induced region of ACAID.

(Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 14(10) : 1563~1566, 1997)

**Key words** : anterior chamber-associated immune deviation, インターロイキン 10, インターフェロン  $\gamma$ , 遅延型過敏反応. anterior chamber-associated immune deviation, interleukin 10, interferon  $\gamma$ , delayed type hypersensitivity.

### はじめに

眼に抗原を接種したとき、選択的かつ抗原特異的に遅延型過敏反応が抑制される。この現象は anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) とよばれ、眼に特異的であり、光を透過し、感知する眼の機能を強い炎症から守るための機構と考えられている<sup>1)</sup>。ACAID の免疫学的特徴は、細胞障害性 T 細胞の誘導や補体非結合性抗体の産生などが正

常でありながら、遅延型過敏反応が選択的に抑制されることである<sup>2)</sup>。これはヘルパー T 細胞 1 型 (Th 1 細胞) が抑制された状態、すなわち、Th 1 細胞の働きである遅延型過敏反応のエフェクター (T<sub>DH</sub> 細胞) の誘導や補体非結合性抗体のクラススイッチなどが抑制された状態<sup>3)</sup> と非常によく類似している。一方、インターロイキン 10 (IL-10) はヘルパー T 細胞 2 型 (Th 2 細胞) から分泌されるサイトカインの 1 つで、Th 1

〔別刷請求先〕 秋葉真理子 : 〒078 旭川市西神楽 4 線 5 号 3-11 旭川医科大学細菌学教室

Reprint requests : Mariko Akiba, M.D., Department of Microbiology, Asahikawa Medical College, 4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa 078, JAPAN

細胞に対して抑制的に作用することが知られている<sup>3,4)</sup>。さらに、IL-10はTh1細胞免疫応答の代表である遅延型過敏反応に対して、抗原感作時<sup>5)</sup>、局所での反応発現時<sup>6-8)</sup>の両相で抗原特異的に抑制することが示されている。以上のことから、IL-10のTh1細胞抑制作用がACAIDの遅延型過敏反応に関与している可能性が考えられる。しかし、ACAIDにおけるIL-10の関与はいまだ検討されていない。そこで、今回筆者らは、ACAID誘発のひきがねである眼球、遅延型過敏反応のヘルパーT細胞の誘導である脾臓、および遅延型過敏反応の発現部位である足蹠を経時的に摘出し、それぞれの組織中のIL-10をELISA法(酵素免疫定量測定法)で検索した。さらにTh1細胞が分泌し、遅延型過敏反応の発現に重要な働きをするインターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ )<sup>9)</sup>を同様に検索し、ACAIDの遅延型過敏反応抑制現象におけるIL-10の関与を検討した。

## I 実験材料および実験方法

### 1. ACAIDおよび遅延型過敏反応の実験系

実験動物は8~10週齢のBALB/c雌マウス、152匹をACAID群、遅延型過敏反応群および陰性対照群の3群に分けて使用した。0.65 mg/10 g体重のペントバルビタールナトリウム(ネプタール<sup>®</sup>)を腹腔内接種後、ACAID群は右眼の前房にウシ血清アルブミン(BSA:SIGMA)50  $\mu$ g/3  $\mu$ lをマイクロシリンジおよび30 G針を用いて3  $\mu$ l接種した。遅延型過敏反応群はBSA 50  $\mu$ gを同量の完全フロイドアジュバントとともに皮下に接種した。陰性対照群は抗原の代わりにリン酸緩衝液(PBS)を接種した。10日後、遅延型過敏反応を誘発するために、各群の右足蹠にBSA(200  $\mu$ g/10  $\mu$ l)あるいは卵白アルブミン(OVA:SIGMA, 200  $\mu$ g/10  $\mu$ l)をそれぞれ10  $\mu$ l、また陰性対照群はPBSを10  $\mu$ l接種した。

### 2. 組織液の抽出法

BSAを前房に接種する前および接種後、経時的に頸椎脱臼により実験動物を屠殺して眼球を摘出した。摘出眼球は-80°Cで凍凍し、解凍後、PBSを1眼につき200  $\mu$ l加えてホモジナイズした。遠心分離(3,000 rpm, 10分)後、上清を採取した。

BSAを前房および皮下に接種前および接種後1, 3, 7, 10日目、さらに抗原を右足蹠に接種前および接種後1, 2, 5, 10, 24時間目の各時点で脱血死させ、脾臓を摘出した。摘出した脾臓はただちに凍凍し、解凍後、PBSを10%重量/体重の割合で加え、ホモジナイズし、遠心分離(3,000 rpm, 10分)後、上清を採取した。

足蹠にBSA, OVAおよびPBSを接種する前および接種後1, 2, 5, 10, 24時間目に脱血死させ、足蹠を切断した。足蹠は細かくきざみ、Hanks緩衝液(1 ml)で4°C 1時間イ

ンキュベートした後、培養上清を遠心分離(3,000 rpm, 10分)した。

### 3. サイトカインの検出

経時的に採取した組織抽出液(実験動物数、6匹)の遠心上清中のIL-10およびIFN $\gamma$ 量を、それぞれマウスIL-10 ELISAキット<sup>®</sup>(コラーゲン研究社;検出感度限界7.2 pg/ml)、MOUSE IFN $\gamma$  ELISA<sup>®</sup>(ENDOGEN;検出感度限界15 pg/ml)を用いて測定した。IL-10およびIFN $\gamma$ の有意差検定はStudentのt検定を用いて陰性対照群と行った。

## II 実験結果

筆者らの系における足蹠での遅延型過敏反応の値は、ACAID群、遅延型過敏反応群および陰性対照群(各群、n=5)でそれぞれ21.2 $\pm$ 17.4  $\mu$ m, 89.0 $\pm$ 25.3  $\mu$ m, 9.7 $\pm$ 15.4  $\mu$ mであり、ACAID群で遅延型過敏反応が有意(p<0.05)に抑制されたことを、実験に先立ち確認した。

### 1. 眼内のIL-10

摘出眼球(n=5)中のIL-10濃度は、抗原の前房接種4時間後0.6 $\pm$ 0.09 ng/mlであり、接種前の0.7 $\pm$ 0.06 ng/mlとほぼ同様で変動を認めなかった。

### 2. 脾臓のIL-10とIFN $\gamma$

脾臓(各群n=6)抽出液中のIL-10は未処置マウスで3.2 $\pm$ 0.29 ng/mlであった。ACAID群、遅延型過敏反応群それぞれのIL-10は、抗原感作後あるいは足蹠接種後において経時的に有意な変動を認めず、未処置のIL-10とも差を認めなかった(図1)。遅延型過敏反応の指標として、Th1細胞により分泌されるIFN $\gamma$ の経時的変動を検討したが、ACAID群と遅延型過敏反応群で有意な差はなかった。

### 3. 足蹠のIL-10とIFN $\gamma$

遅延型過敏反応の反応部位である足蹠(各群n=6)の組織

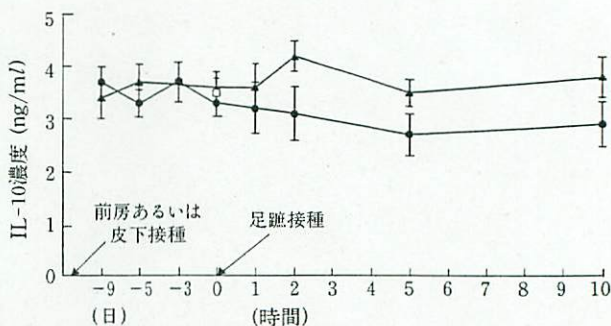


図1 脾臓のインターロイキン10(IL-10)の経時変化  
ウシ血清アルブミン(BSA)を前房に接種した anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)群を●、皮下にBSAを接種した遅延型過敏反応群を▲、未処置群を□で示す。接種後10日目にBSAを足蹠に接種した。脾臓のIL-10の経時変化を平均値 $\pm$ 標準偏差(n=6)で示す。

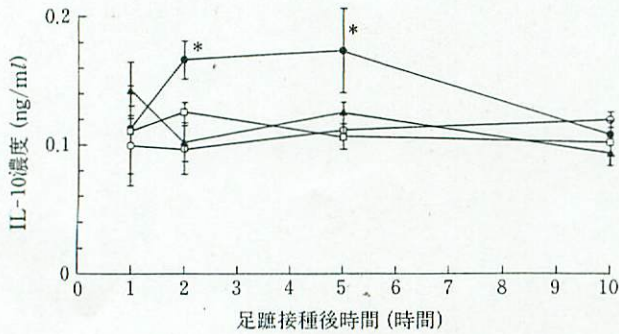


図2 足蹠のインターロイキン10 (IL-10) の経時変化と抗原特異性

ウシ血清アルブミン (BSA) を前房に接種した7日後、BSAを皮下に接種した群を●、卵白アルブミン (OVA) を接種した群を○、リン酸緩衝液 (PBS) を接種した陰性対照群を□で示す。また皮下のみに BSA を接種した遅延型過敏反応群を▲で示す。10日後、足蹠に感作抗原と同一の抗原を接種した。接種後の IL-10 の経時変化を平均値±標準偏差 (n=6) で示す。陰性対照群との有意差 \*p<0.05。

中の IL-10 は、ACAID 群で抗原の足蹠接種後 2, 5 時間で陰性対照群と比べ有意に上昇していたが、遅延型過敏反応群では上昇を認めなかった (図2)。また、この IL-10 の上昇は抗原特異的であり、足蹠に OVA を接種した群で IL-10 は上昇しなかった (図2)。これに対し、IFN $\gamma$  は遅延型過敏反応群で、足蹠接種後 2, 5 時間で有意に上昇したが、ACAID 群では経時的変動がみられなかった (図3)。

### III 考 按

眼に特異的な現象である ACAID は、眼内が免疫的に抑制された環境であるために生じると考えられており<sup>9)</sup>、ACAID の成立に重要な因子として transforming growth factor  $\beta$ <sup>10)</sup>、vasoactive intestinal peptide<sup>11)</sup> などが報告されている。IL-10 も直接 Th1 細胞を抑制するため、免疫を抑制するサイトカインの一つとされ<sup>3,4)</sup>、また、IL-10 で処理された抗原提示細胞が Th1 細胞をアネルギーの状態に導くことから<sup>12)</sup>、IL-10 が眼内の抗原提示細胞に作用し、脾臓の Th1 細胞がアネルギーの状態になるために ACAID が成立する可能性が推測されている<sup>11,13)</sup>。しかし、今回の結果では IL-10 は眼球組織中に存在してはいるものの、その値は脾臓の約 1/5 であり、抗原の前房接種によっても眼内の IL-10 量に変動がみられなかった。このことから、眼内の IL-10 は ACAID 成立に関与していないと推測される。

つぎに、ACAID の成立には脾臓が必要<sup>15)</sup> とされることから、脾臓の Th2 細胞から分泌された IL-10 が Th1 細胞を抑制し遅延型過敏反応が選択的に抑制されると考え、脾臓組織中の IL-10 を検討した。しかし、ACAID 群脾臓での IL-10 の上昇は認められなかった。Bando ら<sup>16,17)</sup> が ACAID は

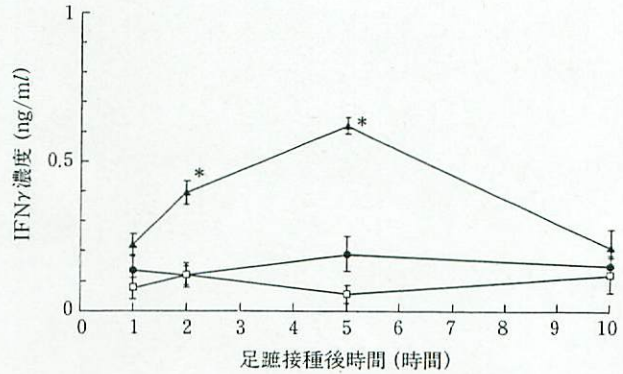


図3 足蹠のインターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) の経時変化

ウシ血清アルブミン (BSA) を前房に接種した10日後、BSAを足蹠に接種した群を●、リン酸緩衝液 (PBS) を接種した陰性対照群を□で示す。また BSA を皮下に接種した後、BSA を足蹠に接種した遅延型過敏反応群を▲で示す。足蹠接種後の IFN $\gamma$  の経時変化を平均値±標準偏差 (n=6) で示す。陰性対照群との有意差 \*p<0.05。

ヘルパー T 前駆細胞から Th0 細胞への分化が止まった結果、遅延型過敏反応エフェクター細胞 (T<sub>DH</sub> 細胞) を誘導する Th1 細胞が分化できなくなったために起こる現象であると報告している。したがって、今回の結果は ACAID ではヘルパー T 前駆細胞が分化せず、Th1 細胞と同様に Th2 細胞も優位となりにくいことを示しており、分化した Th2 細胞から分泌される IL-10 が ACAID 群で増加しなかったと推測される。また、Th1 細胞優位ではあるが分化の進む遅延型過敏反応群より、抗原の足蹠接種後 2, 5, 10 時間で ACAID 群の IL-10 が有意に低かったと考える。しかし、遅延型過敏反応の指標とした IFN $\gamma$  が ACAID 群および遅延型過敏反応群で差を認めなかった理由は説明できず、さらに、ACAID 成立とヘルパー T 前駆細胞の分化の関連性を検討するためには、脾臓細胞を分画し、細胞レベルでの IL-10 を追跡する必要があると思われる。

また、今回、可溶性抗原を用いて検討したところ、ACAID 群で認めた足蹠の IL-10 の上昇は抗原特異的であった。この結果は、ACAID が遅延型過敏反応の発現部位である足蹠において、抗原特異的に遅延型過敏反応を抑制するという報告<sup>18)</sup> と一致している。さらに、遅延型過敏反応群で認められた IFN $\gamma$  の上昇 (足蹠の抗原接種後 2~5 時間) にほぼ一致して、ACAID 群では IL-10 が有意に上昇し、IFN $\gamma$  の上昇がなかったことから、ACAID の反応局所での遅延型過敏反応の抑制に IL-10 が関与していると考えられる。今回は結果を示していないものの、ウイルス抗原を用いた実験で、抗原の前房接種前に抗 IL-10 抗体を投与したところ、ACAID の抑制はみられず、また、足蹠の抗原接種前の投与では ACAID が約 50% 抑制されたことから、IL-10 は ACAID の反応局所での遅延型過敏反応の抑制に部分的に

も関与していると推測される。

以上から、ACAIDの遅延型過敏反応抑制において、IL-10はACAID誘発の場である眼球や脾臓ではなく、遅延型過敏反応の発現局所で関与している可能性が示唆された。今後さらに、抗IL-10抗体によるACAIDの阻止実験や、足蹠でのIL-10の産生機序などの細胞レベルでの検討が必要であると思われる。

#### 文 献

- 1) Streilein JW : Immune regulation and the eye : A dangerous compromise. *FASEB J* 1 : 199-208, 1987
- 2) Wilbanks GA, Streilein JW : Distinctive humoral immune responses following anterior chamber and intravenous administration of soluble antigen. Evidence for active suppression of IgG2-secreting B lymphocytes. *Immunology* 71 : 566-572, 1990
- 3) Mosmann TR : Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol Res* 10 : 183-188, 1991
- 4) Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR : Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170 : 2081-2095, 1989
- 5) Enk AH, Salaga J, Becker D, Mohamadzadeh M, Knop J : Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J Exp Med* 179 : 1397-1402, 1994
- 6) Li L, Elliott JF, Mosmann TR : IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 153 : 3967-3978, 1994
- 7) Rivas JM, Ulrich SE : Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes : An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 149 : 3865-3871, 1992
- 8) Ferguson TA, Dube P, Griffith TS : Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J Exp Med* 179 : 1597-1604, 1994
- 9) Streilein JW : Anterior chamber associated immune deviation : The privilege of immunity in the eye. *Surv Ophthalmol* 35 : 67-73, 1990
- 10) Wilbanks GA, Mammolenti M, Streilein JW : Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) III. Induction of ACAID depends upon intraocular transforming growth factor- $\beta$ . *Eur J Immunol* 22 : 165-173, 1992
- 11) Ferguson TA, Fletcher S, Herndon J, Griffith TS : Neuropeptides modulate immune deviation induced via the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 155 : 1746-1756, 1995
- 12) Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI : Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 151 : 2390-2398, 1993
- 13) Ferguson TA, Herndon JM : The immune response and the eye : The ACAID inducing signal is dependent on the nature of the antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3085-3093, 1994
- 14) McMenamin PG, Holthouse I, Holt PG : Class II major histocompatibility complex (Ia) antigen-bearing dendritic cells within the iris and ciliary body of the rat eye : distribution, phenotype and relation to retinal microglia. *Immunology* 77 : 385-393, 1992
- 15) Streilein JW, Niederkorn JY : Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med* 153 : 1058-1067, 1981
- 16) Bando Y, Ksander BR, Streilein JW : Characterization of specific T helper cell activity in mice bearing alloantigenic tumors in the anterior chamber of the eye. *Eur J Immunol* 21 : 1923-1931, 1991
- 17) Bando Y, Ksander BR, Streilein JW : Incomplete activation of lymphokine-producing T cells by alloantigenic intraocular tumors in anterior chamber-associated immune deviation. *Immunology* 78 : 266-272, 1993
- 18) Wilbanks GA, Streilein JW : Characterization of suppressor cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppressor cell populations. *Immunology* 71 : 383-389, 1990

\* \* \*