

スギ花粉症に対する「食べるワクチン」の開発

分担研究者 斎藤三郎 東京慈恵会医科大学助教授

研究要旨

スギ花粉症モデルマウスに、スギ花粉アレルゲンのペプチド発現米を経口摂取させ、スギ花粉アレルゲンに対する免疫応答が予防的あるいは治療的に抑制されるか検討した。その結果、スギ花粉アレルゲンのペプチド発現米の経口摂取により、予防的にも治療的にもT細胞および抗体レベルで免疫応答が抑制されることが判明した。摂取した米の量から計算すると、1日にあたりペプチド発現米を2～3粒摂取すると免疫寛容が誘導されることが判明した。

A. 研究目的

経口摂取した抗原蛋白に対し生体は経口トレランスが強く誘導され、免疫反応はその抗原に対し無反応状態になることは、衆知の事実である。我々は、これまでに減感作療法に代わる副作用の少ない免疫療法としてペプチド療法の開発を進めてきた。この研究開発過程の中で、モデルマウスを用いた研究では、経口投与によりスギ花粉アレルゲンに対する免疫応答が抑制されることを観察している。経口トレランスのメカニズムはいまだに不明であるが、経口内服によりスギ花粉症に対し予防および治療効果が得られるなら、患者にとって朗報となるであろう。平成15年度の本研究では、部分Cyrj1発現米の経口摂取により、マウスのCryj1に対する免疫応答がT細胞、IgEレベルで抑制されることが判明した。さらに、研究協力者の高岩博士らにより作製して戴いたヒトの主要なT細胞エピトープを7連結したペプチド発現米は、米1粒あたり数十 μ gと高発現しており、B10.SマウスのT細胞がこの連結ペプチドの一部のペプチドを認識できることが判明した。

そこで、平成16年度はヒト7連結ペプチド発現米の経口免疫寛容誘導能をB10.Sマウスを用いて検討した。さらに、どのくらい経口摂取することで免疫寛容が誘導されるのか検討した。

B. 研究方法

ヒト7連結ペプチドは、すでに報告しているが、スギ花粉アレルゲンのヒトの主要なT細胞

エピトープ部分を連結したペプチドであり、研究協力者の高岩博士らによりこのペプチド発現組換え米を作製していただいた。予防的経口免疫寛容誘導能は、最初にB10.Sマウスに発現米を摂取させた後に、Cryj1を点鼻感作しその後免疫応答能について検討した。治療的経口免疫寛容誘導能は、Cryj1を点鼻感作した後に、発現米を食べさせた後、もう一度Cryj1を点鼻投与して免疫応答能を解析した。なお、コントロール群は、wild typeの米を摂取させた。次に、経口免疫寛容を誘導する摂取量について、1/3、1/9量と減らした量を経口摂取させてT細胞およびIgE抗体レベルで検討した。

C. 研究結果

平成15年度に用いたCyrj1発現米は、種子一粒あたりに含まれるCryj1のタンパク量が約6.7 μ gであった。これに対し、7連結ペプチド発現米は、50~60 μ gのペプチドを発現している高発現米である。組換えイネ種子に発現した7連結ペプチドの抗原性は、B10.Sマウス由来のT細胞株がこのペプチドに反応することから保持されていることが判明した(図1)。7連結ペプチド発現米の予防的経口摂取群では、T細胞のCryj1抗原に対する増殖反応が、wild typeの種子摂取群に比べ抑制されていた(図2)。さらに、7連結ペプチド発現米の治療的経口摂取群においても、IgE抗体産生抑制されていた(図3)。また、1日あたり129.6 μ gを36

日間摂取させた群では、経口免疫寛容が誘導されたが、43.1 µg 経口摂取させた群では免疫応答は抑制されにくい傾向であった。

D. 考察

スギ花粉アレルゲンのペプチド発現米の経口摂取により、予防的にも治療的にも経口免疫寛容が誘導されることが判明した。さらに、高発現の組換え米を作製することが技術的に可能となり、大量に作製可能となったことから、マウスに1日あたり2～3粒のペプチド発現米を摂取させることでスギ花粉症に対する経口免疫寛容誘導することが可能となり、近い将来臨床応用されることが期待できる。

E. 結論

高濃度に発現したスギ花粉アレルゲンのペプチド米の経口摂取は、予防的にも治療的にも花粉症に対する免疫応答を抑制することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Masuda, M. Sakaguchi, S. Saito, H. Yasueda, S. Iwabuchi, T. Tsukuki, N. Hayashi, Y. Nakao, K. Kurata, S. Maeda, K. Ohono, H. Tsujimoto. Identification of peptides containing T-cell epitopes of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen (Cry j 1) in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 102, 45-52.

H. Miyazawa, M. Sakaguchi, H. Yasueda, S. Saito, K. Tanaka, K. Nagata, S. Inouye. Non-IgE, IgG4 Antibody to Japanese Cedar Pollen Allergens: Comparison of Its Prevalence and Titers between Pollinosis Patients and Non-Patients. *Allergy International* 2005, 54(1), 159-166.

Hidenori Takagi, Saburo Saito, Lijun Yang, Seiji Nagasaka, Naoko Nishizawa, Fumio Takaiwa. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine (in press).

2. 学会発表

第34回 日本免疫学会総会

新規サイトカインIL-31は抗体産生を増強する. 斎藤 三郎, 秋山暢丈, 池島宏子, 永田欽哉, 大野裕治.

新規サイトカインIL-31の発現解析. 鈴木久皇, 岩崎国洋, 小川一行, 永田欽哉, 秋山暢丈, 斎藤三郎, 山本直樹, 山本三般夫. 日本免疫学会総会・学術集会記録 2004. 34, 188. 札幌 12月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1 7連結ペプチド発現組換え米の抗原性—T細胞レベル—

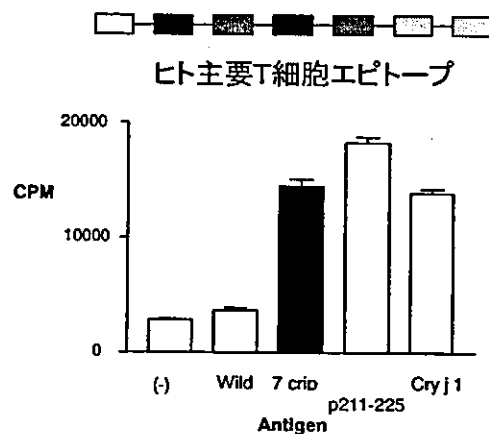


図2 予防効果—T細胞レベル—

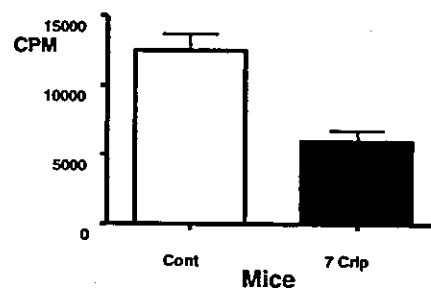
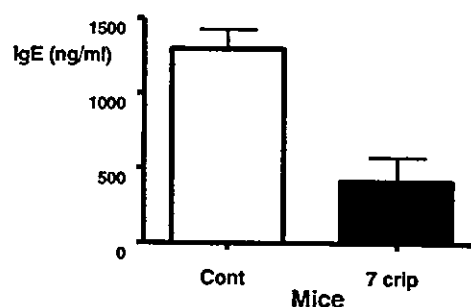


図3 治療効果—IgEレベル—



厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

スギ花粉、ダニによるアレルギーを自然発症したイヌを用いた新規免疫療法の評価

分担研究者 辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨

ダニによる感作が高頻度に認められ、ヒトのアトピー性皮膚炎と同様の臨床症状を発現するイヌのアトピー性皮膚炎を動物モデル系として用い、CpG-ODNを利用したアレルギーに対する新規免疫療法の有効性評価に関する研究を行った。CpG-ODNと結合させる主要アレルゲンを絞り込むために、イヌのアトピー性皮膚炎症例におけるダニ主要アレルゲンをイムノプロットによって解析した結果、既知のDer f 2、Der f 15、Der f 18に相当するタンパクの他に、170kDaおよび75kDaのタンパクに対するIgEが高頻度に検出された。また、CpG-ODNとダニ抽出物の混合液をダニによって実験感作したイヌに投与したところ、血清中ダニ特異的IgEの上昇が抑制された。本研究の成果は、CpG-ODNを利用した新規免疫療法の開発にとってきわめて有用な動物モデル系を提供するものと考えられる。

A. 研究目的

イヌにおいてはアトピー性皮膚炎の発症が高頻度に認められ、イヌの皮膚疾患において最も症例数の多い疾患となっている。これまでに皮内反応および血清中抗原特異的IgE検査を行った結果、アトピー性皮膚炎を発症したイヌの約60%がダニ (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*) を用いた皮内反応で陽性を示すとともに、血清中ダニ特異的IgEを有することが明らかとなっている。イヌのアトピー性皮膚炎における臨床症状がヒトのアトピー性皮膚炎における臨床症状と類似していること、またイヌにおいてもヒトと同様にダニによる感作が高頻度に認められることから、イヌのアトピー性皮膚炎はヒトのアトピー性皮膚炎の好適な動物モデルであるものと考えられる。

本研究においては、アレルギーに対する新規免疫療法の有効性を動物モデル系として利用し得るイヌのアトピー性皮膚炎において評価することを目的とする。

私達はこれまでにイヌにおいてTh1型の免疫反応を誘導することができるCpG配列を同定した。そこで、本年度はCpGと結合させるダニアレルゲンの候補を絞り込むため、イヌのアトピー性皮膚炎におけるダニ主要アレルゲンを一次元および二次元イムノプロット法によって解析した。次いで、培養P BMCにおいてIFN- γ 誘導能が示されたCpG-ODNのイヌ生体内での有効性を検討するため、(*Dermatophagoides farinae*, DF) を実験的に感作したイヌに投与し、ダニ特異的IgE値の変化を解析した。

B. 研究方法

イヌのアトピー性皮膚炎におけるダニ主要アレルゲンの解析: ELISA法によってダニに対するIgEが高値を示したアトピー性皮膚炎のイヌ20頭から血清を採取した。これら血清をDF抗原およびイヌFcεRIαを用いた一次元イムノプロット法によって解析し、イヌにおけるダニ主要アレルゲンの解析を行った。次いで、検出された新規ダニ主要アレルゲンと考えられる分子についてプロテオーム解析を進めた。

イヌ生体内におけるCpG-ODNの有効性の検討: 実験用ビーグル10頭にアラム混合DF抽出物(300μg)を皮下注射し、7日後に再度DF抽出物(300μg)を皮下注射することによって実験的ダニ感作犬を作製した。そのうち5頭(CpG群)には感作開始後14および15日目にCpG-ODN(1mg)とDF抽出物(50μg)の混合液を皮下注射し、他の5頭(コントロール群)にはDF抽出物(50μg)のみを皮下注射した。その後ダニ感作に対する反応性を評価するため、感作開始後35日目にDF抽出物(300μg)のブースター感作を行い、42日目にCpG-ODNの有効性を評価するために血清中DF特異的IgE測定およびDF抽出物による皮内反応を行った。

C. 結果

イヌのアトピー性皮膚炎におけるダニ主要アレルゲンの解析: DF抽出物を用い、イヌFcεRIαによって検出を行う一次元イムノプロットによる解析の結果、アトピー性皮膚炎を自然発症し、DFに対する血清中IgEを有するイヌ20頭においては、14kDa, 20kDa, 25kDa, 37kDa, 50kDa, 60kDa, 75kDa, 100kDa, 170kDa, 250kDaといった多数のバンドが検出された(図1)。このうち、検出頻度の

高いバンドは、170kDa(49%), 75kDa(44%), 14kDa(43%), 100kDa(34%)の4バンドであり、これらがイヌにおけるダニ主要アレルゲンである可能性が示された。

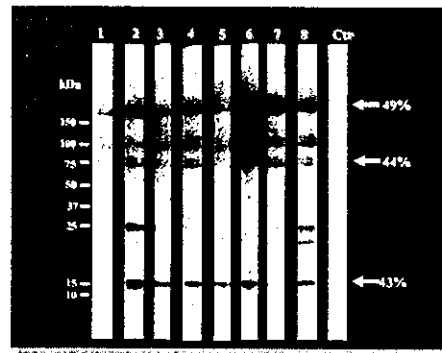


図1. イヌのアトピー性皮膚炎症例におけるダニ(*Dermatophagoidees farinae*)アレルゲンのイムノプロット解析

その分子量から、14kDaのものはDer f 2、100kDaのものはDer f 15、60kDaのものはDer f 18に相当する既知アレルゲンに相当するものと考えられた。

しかし、170kDaおよび150kDaのタンパクは既知のアレルゲンとは分子量が異なっていた。そのうち、170kDaのタンパクについては、二次元イムノグロット法(図2)およびプロテオーム解析により、新規アレルゲンである可能性が示唆され、現在、その分子クローニングを進めている。

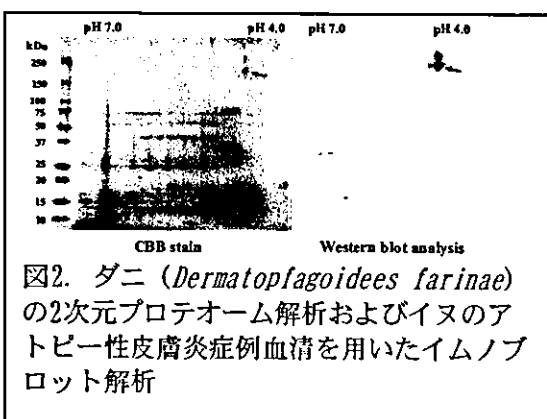


図2. ダニ(*Dermatophagoidees farinae*)の二次元プロテオーム解析およびイヌのアトピー性皮膚炎症例血清を用いたイムノプロット解析

イヌ生体内におけるCpG-ODNの有効性の検討：DFによって実験感作を行ったイヌ10頭におけるブースター感作前（35日目）の血清中DF特異的IgE値は30～30,000 μ /mlであった。ブースター感作後1週目（42日）における血清中DF特異的IgE値は、ブースター感作前（35日目）におけるものと比較した場合、CpG群の5頭では、2頭で上昇、3頭で低下がみられたのに対し、コントロール群の5頭では、4頭で上昇、1頭で低下がみられた。ブースター感作後における血清中DF特異的IgE値とブースター感作前におけるものと比は、CpG群では 0.9 ± 0.3 、コントロール群では 2.3 ± 0.7 であったことから、CpG群ではブースター感作による血清中DF特異的IgEの上昇が抑制されていることが示された。また、ブースター感作後に行ったDF抽出物に対する皮内反応では、CpG群の5頭のうち1頭が陰性化していたが、コントロール群の5頭はいずれも陽性を示した。

D. 考察

私達は、ダニに対する新規免疫療法の候補の一つとして、主要アレルゲンにTh1型の免疫応答を誘導するCpG-ODNを結合させた物質を投与するアレルゲン特異的免疫療法を開発するために研究を進めてきた。そのためには、イヌにおけるダニ主要アレルゲンの同定が不可欠である。以前の私達の研究では、ヒトにおけるダニ主要アレルゲンであるDer f 1およびDer f 2に対するIgEがアトピー性皮膚炎に罹患したイヌのそれぞれ38%および48%において検出されている。このことは、Der f 1またはDer f 2を新規治療法に用いても、半分以下の症例にしか有効性を示さないことを示している。

そこで本研究において、イムノブロット法を用いてイヌのアトピー性皮膚炎における主要アレルゲンの全体像を把握したいと考えた。その結果、Der f 2やDer f 15よりも高頻度にIgE産生を誘導している170kDaのタンパクおよび75kDaのタンパクを検出することができた。McCallら（2001）の研究ではイヌのアトピー性皮膚炎症例の90%以上がDer f 15に対するIgEを有していることが示されているが、今回の研究ではその保有率は34%に過ぎず、結果が大きく異なっていた。このことは、検査を行なったアトピー性皮膚炎症例の遺伝的背景またはイムノブロットのシステムの違いによるものと考えられた。

今後、CpG-ODNと結合させて用いるアレルゲンとしては、既知のDer f 1、Der f 2、Der f 15、Der f 18の他に、今回新たに検出された170kDaのタンパクおよび75kDaのタンパクもその候補として考慮に入れるべきであるものと考えられる。その目的のために、現在、私達はこの170kDaのタンパクの分子クローニングを行い、この分子がすでに報告されているアレルゲンとは異なる新型アレルゲンであるものと考えている。実際的には、この170kDaのタンパク、Der f 2、およびDer f 15を用い、それぞれにイヌに有効なCpG-ODNを結合させ、ダニ実験感作犬およびダニに自然感作されたアトピー性皮膚炎発症犬に投与し、その有効性を血清中DF特異的IgE値の変化および症例の変化によって検証したいと考えている。

また、イヌにおいては、さまざまなダニのタンパクがIgE産生を誘導しているため、精製した主要アレルゲンを組み合わせるだけでは十分な有効性が期待できない可能性

があるため、DF抽出物全体にCpG-ODNを結合させ、そのDF抽出物-CpG-ODN結合物を新規免疫療法に用いる必要があるかも知れない。次年度には、上記の2つの方法を用いることによりCpG-ODNを利用した新規免疫療法をイヌにおいて評価する方針である。

本年度において行ったイヌ生体内におけるCpG-ODNの有効性を検討する実験ではDF抽出物によるブースター感作による血清中DF特異的IgE値の上昇がCpG-ODN投与群において抑制されていた。しかしながら、実験用ビーグル犬におけるDF抽出物による実験感作の系では血清中DF特異的IgE値の上昇は認められるものの、アトピー性皮膚炎等の臨床症状の発現が認められないため、その臨床的な有効性を検証することができない。また、本年度において行なったCpG-ODNの投与においては、DF抽出物とCpG-ODNの混合液を使用したのみであるため、今後はDF抽出物またはDF主要アレルゲンとCpG-ODNとの化学的結合物を用いて、より有効な新規免疫療法を開発したいと考えている。

また、ダニに感作されており、アトピー性皮膚炎を発症したイヌの症例において臨床試験のパイロットスタディーを行う前には、実験用のイヌを用いた安全性試験が不可欠であり、現在その準備を進めている。

E. 結論

ダニに感作されており、アトピー性皮膚炎を自然発症したイヌの血清を用い、イムノブロット解析を行なうことにより、イヌにおけるダニ主要アレルゲンを明らかにすることができた。また、CpG-ODNをDF実験感作犬に投与することにより、血清中DF特異的IgEの上昇を抑制することができた。本年

度における研究成果から、DF主要アレルゲンとCpG-ODN結合物を用いたダニアレルギーに対する新規免疫療法の有効性を犬のアトピー性皮膚炎の系で評価する準備が整った。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurata, K., Iwata, A., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences to induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102:441-450 (2004).
2. Kurata, K., Maeda, S., Yasunaga, S., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 25-29 (2004)
3. Ishida, R., Masuda, K., Kurata, K., Ohno, K. and Tsujimoto H. Lymphocytic blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity. *J. Vet. Intern. Med.* 18: 25-30 (2004).
4. Masuda, K., Sakaguchi, M., Saito, S., Yasueda, H., Iwabuchi, S., Tsukui, T., Hayaishi, N., Kurata, K., Maeda, S., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Identification of peptides containing T-cell epitopes of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen (Cry j1) in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102: 45-52 (2004).

5. Maeda, S., Ohmori, K., Kurata, K., Sakaguchi, M., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 66:337-339 (2004).
 6. Maeda, S., Ohmori, K., Yasuda, N., Kurata, K., Sakaguchi, M., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Increase of CC chemokine receptor 4-positive cells in the peripheral CD4 cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Clin. Exp. Allergy* 34: 1467-1473 (2004).
 7. Ohmori, K., Maeda, S., Okayama, T., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto H. Molecular cloning of canine activation-induced cytidine deaminase (AID) cDNA and its expression in normal tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 66:739-741 (2004).
 8. Kurata, K., Iwata, A., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences that induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102:441-450 (2004).
 9. Ohmori, K., Masuda, K., Maeda, S., Kaburagi, Y., Kurata, K., Ohno, K., DeBoer, D.J., Tsujimoto, H. and Sakaguchi, M. IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104:249-256 (2005).
 10. Maeda, S., Tsukui, T., Saze, K., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. and Iwabu, S. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103:83-92 (2005).
 11. Ohmori, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Suspected allergic reactions after vaccination in 85 dogs in Japan. *Vet. Rec.* 156:87-88 (2005).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

スギ花粉症患者における Cry j 1 に対する血清中 IgE 抗体の親和性測定：減感作療法による変動と治療効果評価の有用性について

分担研究者：三田晴久 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長

研究協力者：齋藤明美 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター

研究要旨

減感作療法による IgE 抗体の親和性の変動を測定し、血清中抗体濃度、末梢白血球からのヒスタミン遊離などの他の要因との関係を検討した。減感作期間が異なる 3 群（1 群：1 年未満、2 群：1 年以上 5 年未満、3 群：5 年以上）に分類し、同一患者での変動を昨年花粉飛散期（平成 15 年）と今年の飛散期の時点で比較して次の結果を得た。(1) total IgE および Cry j 1 に対する IgE 抗体は 1 群で平成 16 年春に増加、一方 2 群、3 群では減少した。IgG 抗体および IgG4 抗体は 1 群で平成 16 年春に増加し、その他の群では増加量が維持された。(2) 1 群ではヒスタミン遊離の reactivity が増加し、短期間の減感作では一過性にヒスタミンの遊離が亢進した。(3) Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性は花粉飛散期に治療の継続により低減し、IgE 抗体の親和性は減感作療法の有効性を評価する指標となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

減感作療法はアレルギー性鼻炎やアトピー性喘息の有効な治療法として利用されている。減感作療法は様々な免疫学的な変化を引き起こすことが知られているものの、有効性をもたらすメカニズムについてはよくわかっていない。減感作によって、IgE 抗体の季節的変動の低減、IgE 抗体の低下、IgG 抗体とくに IgG4 抗体の増加、Th2 から Th1 へのシフト、炎症性細胞の粘膜部位での減少、メディエーター遊離の減少、T 細胞のアレルゲンへの反応性の低下、inhibitory cytokine である IL10 の増加などの変化が報告されている。本研究では、減感作療法が IgE 抗体の親和性に与える影響を明らかにし、さらに血清中抗体量やメディエーター遊離の変動を検討して、抗体の親和性が有効性を評価する指標となる可能性を検討した。

B. 研究方法

減感作はスギ花粉標準化エキスをを用いて行った。

減感作療法を受けている期間により、患者を 1 群：1 年未満、2 群：1 年以上 5 年未満、3 群：5 年以上の 3 群に分類した。

全ての患者でアレルゲン量は開始の 6 ヶ月後には維持量に達していた。同意が得られたスギ花粉症患者から昨年花粉飛散期（平成 15 年）と今年の飛散期（平成 16 年）に末梢静脈血を採取し、血漿を用いて抗体値（total IgE、Cry j 1 に対する IgE 抗体、IgG 抗体、IgG4 抗体）と Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性を測定し、さらに洗浄白血球を分離して Cry j 1 によるヒスタミン遊離試験を行った。上清に遊離されたヒスタミン量をオートアナライザーで測定し、reactivity（最大遊離率）と sensitivity（25%遊離を起こすのに必要なアレルゲン濃度）を算出した。

親和性の測定はすでに報告したような方法で行い、コンピューター解析で得られた affinity distribution pattern より、もっとも頻度の多い親

和性 (most probable Kd, pM) を算出した (Mita *et al.* Clin Exp Allergy 2000; 30: 1582-1589)。

統計方法：昨年と今年のデータの比較は Wilcoxon t-test により行い、相関関係は Spearman の rank correlation test を用いて解析した。表中の数値は median で示した。

C. 研究結果

1. 各群での患者の臨床背景を表 1 に示した。1 群の患者の多くは約 10 ヶ月の減感作療法を受けていた。各群の年齢には有意差はなかった。なお、2 群と 3 群中の 2 および 5 名は末梢血からのヒスタミン遊離が起こらない、いわゆる non-releaser だったので、これらの患者では抗体に関するデータだけを解析に使用した。
2. 血清中抗体値の結果を表 2 に示した。今年の花粉飛散期に IgE 抗体は 1 群で有意に増加し ($p=0.036$)、2 群と 3 群では有意な減少を示した。Total IgE も同様な変動を示した。IgG4 抗体は 1 群で増加し ($p=0.012$)、3 群ではわずかだが有意な減少を示した ($p=0.035$)。IgG 抗体は 1 群で減感作前 (平成 15 年春) と比べて約 10 倍に増加し ($p=0.012$)、2 群と 3 群ではその増加を維持したが変動はみられなかった。
3. 表 3 にヒスタミン遊離試験の結果を示した。1 群でヒスタミン遊離の reactivity は増加 (平成 15 年 57.5% vs. 平成 16 年 89.65%, $p=0.036$) し、sensitivity も低下傾向 (0.23 vs. 0.058 ng/ml) を示し、短期間の減感作により一過性にヒスタミン遊離が亢進することがわかった。
4. Cry j1 に対する IgE 抗体の親和性 (pM) は 1 群では変化がみられなかったが、2 群と 3 群では減少を示し ($p=0.018$, $p=0.022$, 表 3、図 1)、治療の継続により花粉飛散期で IgE 抗体の親和性の低減がみられた。さらに、平成 16 年春の 1 群の親和性に対して同時点での 3 群の親和性は有意に低減していた (median, 67.7 vs. 88.1, $p<0.05$, 図 1)。

D. 考察

IgE 抗体量や IgG4 抗体量は減感作の初期に増加するが、その後の季節的増加は抑制されることはすでに多くの報告がある。現在、我々が行っている減感作療法でも、約 10 ヶ月の減感作を受けている 1 群では IgE 抗体、IgG 抗体、IgG4 抗体は有意な増加を示していた。IgE 抗体は 2 群と 3 群では今年 (平成 16 年) 春に有意な減少がみられた。今年の花粉飛散量が昨年約 1/10 だったことから、この変化は花粉量の減少を反映しているものと考えられた。一方、IgG 抗体は 2 群、3 群で初期の増加は維持されたが、その後の変動はみられなかった。3 群で IgG4 抗体はわずかだが、有意な減少を示したが、この原因は特定できなかった。あるいは accidental error だったのかもしれない。

短期間の減感作群 (1 群) で IgE 抗体が増加し、total IgE 値に対する IgE 抗体値の割合も有意に増加を示し ($p=0.036$, data not shown)、これを反映してヒスタミン遊離の reactivity が増加したのと考えられ、短期間の減感作は一過性にヒスタミン遊離が亢進することがわかった。

IgE 抗体の Cry j1 に対する親和性は 1 年未満の治療 (1 群) では変化が現れなかったが、2 群、3 群では親和性の低下がみられ、減感作の継続により親和性が低下し、ヒスタミンが遊離しにくくなる方向への変化がおきているものと考えられた。1 群で差がみられなかったことから、花粉量の減少によって親和性の maturation が起きなかったという可能性は低いように思われた。

E. 結論

IgG4 抗体量の増加に加えて、減感作療法の継続により IgE 抗体の親和性が低減することが明らかになった。これらの変化は減感作療法の有効性に影響を与え、また有効性の評価指標となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

なし

表1 患者背景

	Number of patients	Age (median)	Sex (male/female)	Duration of immunotherapy (median)
Below one year	8	23-64 (42)	2/6	ca. 10 mo
≥one year < five years	10 (2*)	28-62 (45)	1/9	1-4 (3.0)
≥ five years	15 (5*)	31-72 (48)	5/10	8-25 (13)

* Histamine non-releaser

表2 血清中のIgE、IgGおよびIgG4抗体濃度の変動

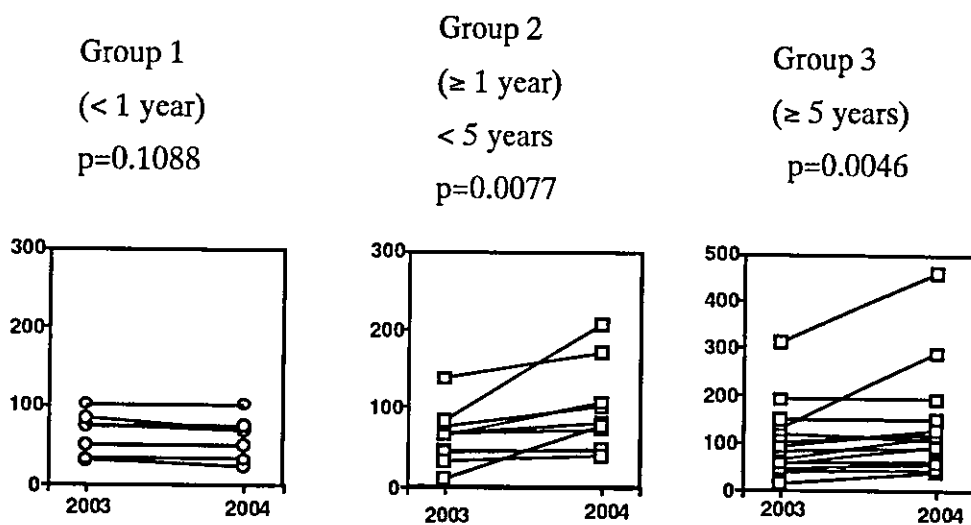
	Total IgE (IU/ml)		IgE antibody to Cry j 1 (PRU/ml)		IgE antibody to Cry j 1/total IgE		IgG antibody to Cry j 1 (U/ml)		IgG4 antibody to Cry j 1 (U/ml)	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
Below one year	195	225	20.65	35.35	0.192	0.214	4.45	36.55	2.35	4.7
	P=0.263		P=0.036		P=0.036		P=0.012		P=0.012	
≥one year < five years	140	100	31.7	22.3	0.167	0.188	41.6	38.8	2.25	3.5
	P=0.005		P=0.022		P=0.333		P=0.879		P=0.401	
≥ five years	135	98.5	13.9	11.3	0.124	0.110	15.8	21.3	3.6	2.9
	P=0.038		P=0.002		P=0.496		P>0.999		P=0.035	

Data are expressed as median and analyzed by Wilcoxon t-test.

表3 ヒスタミン遊離の変動

	Histamine release test						Affinity of IgE antibody to Cry j 1 (pM)	
	Cry j 1 reactivity (%)		Cry j 1 sensitivity (ng/ml)		Anti-IgE sensitivity (ng/ml)		2003	2004
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
Below one year	57.50	89.65	0.23	0.058	295	145	73.65	67.7
	P=0.036		P=0.142		P=0.142		P=0.109	
≥one year < five years	69.55	67.45	0.14	0.165	240	415	55.05	78.04
	P=0.674		P=0.327		P>0.999		P=0.018	
≥ five years	90.45	88	0.082	0.083	22.5	35.5	59.95	88.1
	P=0.647		P=0.541		P=0.721		P=0.022	

図1 IgE抗体のCry j 1に対する親和性の変動



Affinity of IgE antibody to Cry j 1 was significantly different between the patients in group 1 and the patients in group 3 at the time of 2004 (median, 67.7 vs. 88.1, $p<0.05$).

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Goto Y, Kondo T, Ide T, <u>Yasueda H</u> , Kuramoto N, Yamamoto K.	Cry j 1 isoforms derived from <i>Cryptomeria japonica</i> trees have different binding properties to monoclonal antibodies.	Clin Exp Allergy	34	1754-1761	2004
Kurata K, Maeda S, Yasunaga S, Masuda K, <u>Sakaguchi M</u> , Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis.	J Vet Med Sci	66	25-29	2004
Maeda S, Ohmori K, Kurata K, <u>Sakaguchi M</u> , Masuda K, Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA.	J Vet Med Sci	66	337-339	2004
Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura JI, <u>Sakaguchi M</u> , <u>Yasueda H</u> , Suzuki N	Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model.	Clin Exp Allergy	34	965-970	2004
Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, Kurata K, <u>Sakaguchi M</u> , Masuda K, Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Increase of CC chemokine receptor 4-positive cells in the peripheral CD4+ cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen.	Clin Exp Allergy	34	1467-1473	2004
Masuda K, <u>Sakaguchi M</u> , <u>Saito S</u> , <u>Yasueda H</u> , Iwabuchi S, Tsukui T, Hayashi N, Kurata, K, Maeda S., Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Identification of peptides containing T cell epitopes of Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>) pollen allergen (Cry j 1) in dogs.	Vet Immunol Immunopathol	102	45-52	2004
Kurata K, Iwata A, Masuda K, <u>Sakaguchi M</u> , Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences to induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells.	Vet Immunol Immunopathol	102	441-450	2004
Miyazawa H, <u>Sakaguchi M</u> , <u>Yasueda H</u> , <u>Saito S</u> , Tanaka K, Nagata K, Inouye S	Non-IgE, -IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients.	Allergol Int	54	159-166	2005
Murasugi T, Nakagami Y, Yoshitomi T, Hirahara K, Yamashita M, Taniguchi Y, <u>Sakaguchi M</u> , Ito K	Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice.	Eur J Pharmacol	150	143-148	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

2

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Takai T</u> , Kato T, <u>Yasueda H</u> , Okumura K, Ogawa H.	Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro and mature Der p 1 and Der f 1: Major conformational IgE-epitopes blocked by prodomains.	J Allergy Clin Immunol	115	555-563	2005
<u>Takai T</u> , Kato T, Sakata Y, <u>Yasueda H</u> , Izuhara K, Okumura K, Ogawa H.	Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity.	Biochem Biophys Res Commun	328	944-952	2005
Sakata Y, Arima K, Takeshita K, <u>Takai T</u> , Aoki S, Ogawa H, Sugihara H, Fujimoto K, Izuhara K.	Characterization of novel squamous cell carcinoma antigen-related molecules in mice.	Biochem Biophys Res Commun	324	1340-1345	2004
Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Hide M, <u>Ono K</u>	Molecular cloning of a class IV chitinase allergen from Japanese cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>) pollen and competitive inhibition of its IgE-binding capacity by latex C-serum.	Clin Exp Allergy	35	234-243	2005
Ishida R, Masuda K, Kurata K, Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Lymphocytic blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity.	J Vet Intern Med	18	25-30	2004
Ohmori K, Maeda S, Okayama T, Masuda K, Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Molecular cloning of canine activation-induced cytidine deaminase (AID) cDNA and its expression in normal tissues.	J Vet Med Sci	66	739-741	2004
Ohmori K, Masuda K, Maeda S, Kaburagi Y, Kurata K, Ohno K, DeBoer DJ, <u>Tsujimoto H</u> , <u>Sakaguchi M</u>	IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination.	Vet Immunol Immunopathol	104	249-256	2005
Maeda S, Tsukui T, Saze K, Masuda K, Ohno K, <u>Tsujimoto H</u> , Iwabuchi S	Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis.	Vet Immunol Immunopathol	103	89-92	2005
Ohmori K, <u>Sakaguchi M</u> , Kaburagi Y, Maeda S, Masuda K, Ohno K, <u>Tsujimoto H</u>	Suspected allergic reactions after vaccination in 85 dogs in Japan.	Vet Rec	156	87-88	2005