

図1. バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた組換え型CPA39, CPA63の発現と精製  
Lane 1; マーカー, Lane 2; 培養上清, Lane 3; His-tag精製, Lane 4; イオン交換最終精製標品

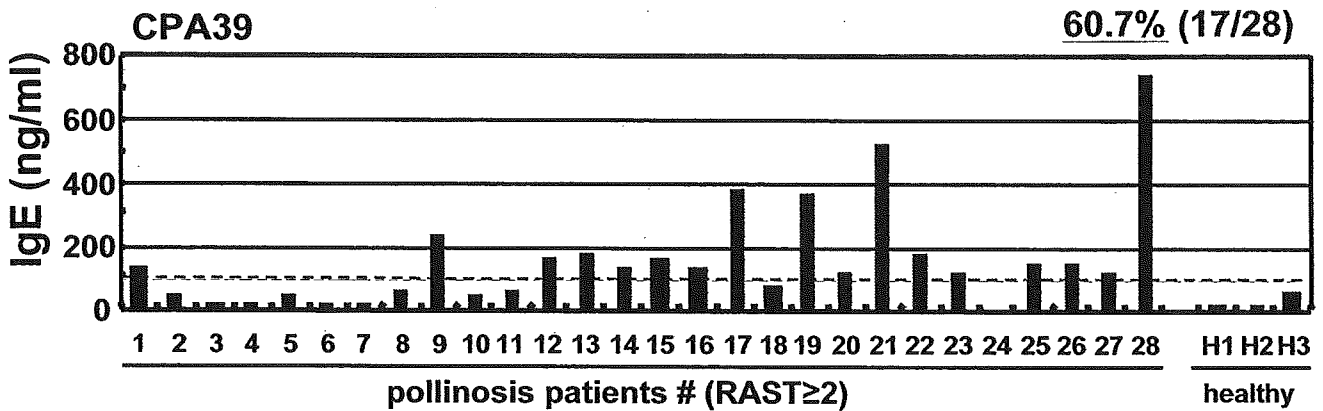


図2. 組換え型CPA39のIgE結合活性評価  
健康者 (n=3) のmean+3SDの値 (点線) より高値の検体を陽性とした。

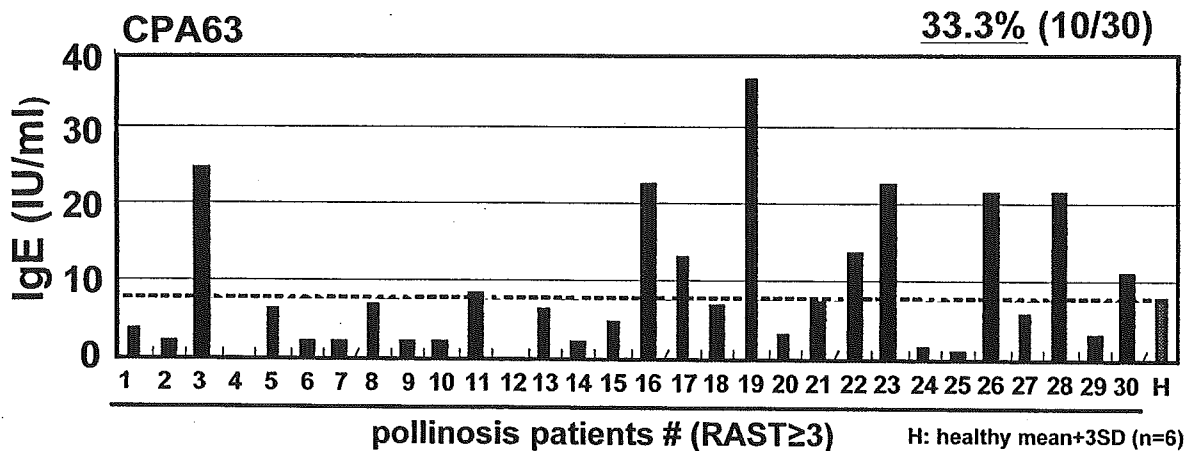


図3. 組換え型CPA63のIgE結合活性評価  
健康者 (n=6) のmean+3SDの値 (点線) より高値の検体を陽性とした。

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経口トレランスを誘導するためには、スギ花粉アレルゲン・ペプチドを大量に経口摂取させる必要性が判明した。経口摂取6ヵ月後も経口トレランスは維持されていた。モノクローナル抗体を作製し、アフィニティカラムを用いてペプチド発現米からペプチドを精製できることを確認した。スギ花粉アレルゲン蛋白さらには改変アレルゲン蛋白を大腸菌に発現させ大量に精製する系を確立したが、この蛋白は不溶性のためにアレルゲン性や有効性の評価が難しいことが判明した。

A. 研究目的

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。

平成16年度はヒト7連結ペプチド(7crp)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。その結果、予防的にも治療的にも免疫応答が抑制されることが判明した。

平成17年度は、経口トレランスを誘導するための抗原量あるいは持続期間、さらには副作用が少なく様々な実験動物で解析でき、しかもすべてのT細胞エピトープを含んだアレルゲン蛋白の作製法などについて検討を試みた。

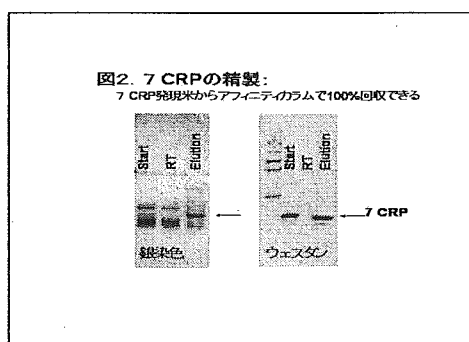
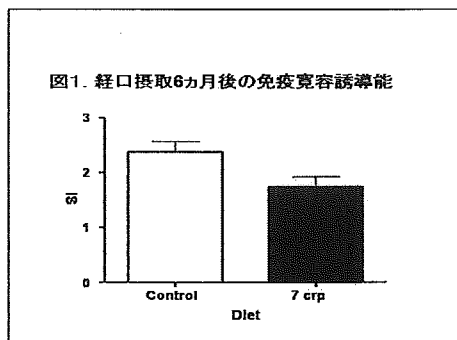
B. 研究方法

経口トレランス誘導能は、経口摂取させるペプチド発現米の量を調節して、その後の免疫応答性を検討した。経口トレランスの持続期間は、1ヶ月間経口摂取させ、6ヶ月後の免疫応答性を解析する系である。7crpに対するモノクローナル抗体を作製し、アフィニティカラムによりペプチド発現米からペプチドを精製できるか検討した。大腸菌に効率よくアレルゲン蛋白を発現させる系と目的とする蛋白を抽出する系について検討した。

C. 研究結果

経口免疫寛容が誘導される経口摂取量は、7crpに換算すると、1日当たり100マイクログラム以上必要ことが判明した。経口免疫寛容がどのくらい維持されるか解析した結果では、6ヵ

月後においても弱いながら経口免疫寛容は維持されることが判明した(図1)。7crp発現米からアフィニティカラムを用いて7crpの精製を試みた。7crp発現米から可溶化した蛋白中の7crpはアフィニティカラムにより100%回収されることが判明した(図2)。しかしながら、7crp発現米をアミラーゼ処理後酸処理した可溶性分画に含まれる7crpの量は極微量であり、不溶性分画に7crpのほとんどが存在することが後の解析で明らかになった。



特になし

#### D. 考察

経口トレランスを誘導するために、大量の抗原を必要としたのは、B10.S マウスに認識されるペプチド部位が1ヶ所しか存在しないためと考えられた。7crp 発現米からモノクローナル抗体を用いたアフィニティカラムによる7 crp の精製は、大量の抗原精製に有用と思われたが、7 crp 発現米をアミラーゼ処理後酸処理して可溶性分画に含まれる7 crp の量は極微量であり不溶性分画にほとんどが存在することが後の解析で明らかになった。したがって、米から可溶性蛋白をいかに効率よく抽出するか検討する必要がある。

本研究の食べるワクチンは、副作用の少ないスギ花粉アレルゲンのすべてのT細胞エピトープを含むペプチドを経口摂取することにより、理想的な免疫療法になると思われる。本研究で用いた7連結ペプチドは、スギ花粉症患者の主要なT細胞エピトープであるが、これで実際治療に用いる際に必要十分かどうかは疑問がある。さらに、種間でT細胞エピトープが異なるために、ヒト用に開発されたペプチドの有効性をモデル動物で評価するのは困難である。このような観点から理想の食べるワクチンとは、IgEの結合性が少ない改変アレルゲン蛋白である。本研究でこの蛋白の作製を大腸菌で試みたが、不溶性となりIgE結合性を評価できなかったことが残念である。

#### E. 結論

食べるワクチンの開発にあたり、材料を安価に大量にしかも精製できるシステムが開発できた。

F. 健康危険情報 特になし。

#### G: 研究発表

##### 1. 論文発表

Takagi H, Saito S, et al. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine.

Plant Biotechnology Journal(2005)3,521-533.

##### 2. 学会発表

スギ花粉アレルゲンの主要T細胞エピトープ・ペプチド発現米を用いた免疫療法 斎藤三郎ほか. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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開発

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

イヌにおいては、スギ花粉やダニに感作されてアレルギー性疾患を自然発症する症例が多数認められる。われわれは、このイヌのアレルギー自然発症モデルにおいて新規免疫療法の評価を行うために一連の研究を行ってきた。ダニに感作されてアトピー性皮膚炎を発症したイヌにおける主要アレルゲンはDer f 2と今回われわれが新たに同定した新規アレルゲン(Z1)であることが示された。そこで、本年度においては、この2つの主要アレルゲンをコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターをDNAワクチンとして利用し、その安全性および有効性を実験感作犬において検討した。その結果、これらDNAワクチンのイヌにおける安全性と一部の有効性が示され、DNAワクチンを用いた新規免疫療法の基礎的な知見を得ることができた。

A. 研究目的

スギ花粉やダニの感作が認められ、ヒトと同様のアレルギー性疾患を自然発症したイヌにおいて、新規免疫療法の有効性を検証することを最終目的とする。本年度においては、イヌのアトピー性皮膚炎における*Dermaphagoides farinae* (DF) のアレルゲノム解析を行い、その結果をもとにしてDF DNAワクチン療法の基盤を確立したいと考えた。

B. 研究方法

イヌのアトピー性皮膚炎におけるDFアレルゲノム解析：昨年度検出した約170kDaのアレルゲンと考えられる蛋白のプロテオーム解析を行い、そのN末アミノ酸配列およびペプチドマッピングにより、分子クローニングのためのミックスマイマーを作成

した。そのプライマーを用いたPCRによりDF cDNAから新規アレルゲンをコードする分子クローン (Z1) を単離した。次いでCOS7細胞で発現させたZ1蛋白に対するポリクローナル抗体を作製し、その抗体カラムによって天然型Z1蛋白を単離し、アトピー性皮膚炎に罹患した犬の血清との反応性を検討した。

イヌにおけるDF DNAワクチンの開発：プラスミド発現ベクター (pCAGGS) にDer f 2 cDNAおよびZ1 cDNAを組み込み、DNAワクチンとして用いるpCAGGSDF2およびpCAGGSZ1を得た。イヌにおける安全性と有効性を検討するため、それぞれのDNAワクチンについて、予定臨床投与量 (0.5 mg/dog) およびその3倍量 (1.5 mg/dog) を4頭ずつの実験用ビーグル犬に1週間間隔で5回筋肉内投与した。投与期間中および投与後3週間の間、

症状観察、身体検査、血液検査を行い、また実験終了後に殺処分して病理組織学的検査を行うことによってその安全性を評価した。また、DNAワクチン投与後にDer f 2とアラムアジュバントの混合液による実験的感作を行い、血清中Der f 2 IgE値を測定することによって予備的にその有効性を検討した。

### C. 結果

イヌのアトピー性皮膚炎におけるDFアレルギーゲノム解析：アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの50症例について検討した結果、70%の症例がDer f 2とZ1の両方またはいずれかに対するIgEを有することが示された（図1）。

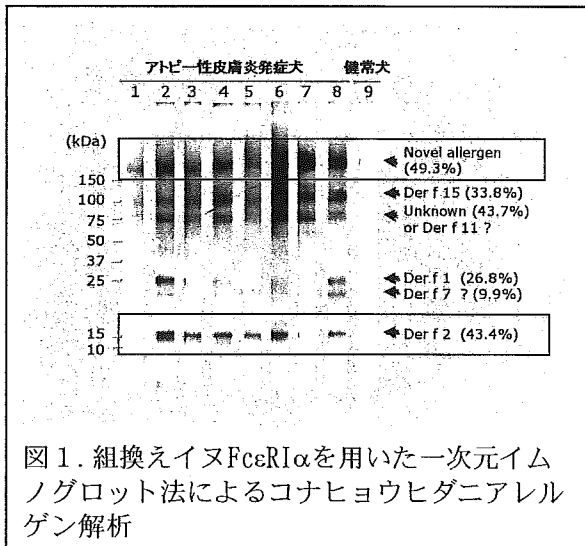


図1. 組換えイヌFcεRIαを用いた一次元イムノブロット法によるコナヒョウヒダニアレルゲン解析

DF抽出物から抗Z1抗体カラムによって単離したZ1蛋白はアトピー性皮膚炎のイヌの血清中IgEと反応することから、新規アレルゲンであることが明らかとなった。

イヌにおけるDF DNAワクチンの開発：Der f 2 DNAワクチン (pCAGGSDF2) およびZ1 DNAワクチン (pCAGGSZ1) の安全性試験では、予定臨床投与量およびその3倍投与量のい

ずれにおいても、症状観察、身体検査、血液検査、病理肉眼的・組織学的検査における異常は認められず、本実験条件下での安全性が確立された（図2）。

有効性試験に関しては、Der f 2 DNAワクチン投与群においては、コントロール群に比べて実験感作後のDer f 2特異的IgEの上昇が抑制されていることが示された（図3）。

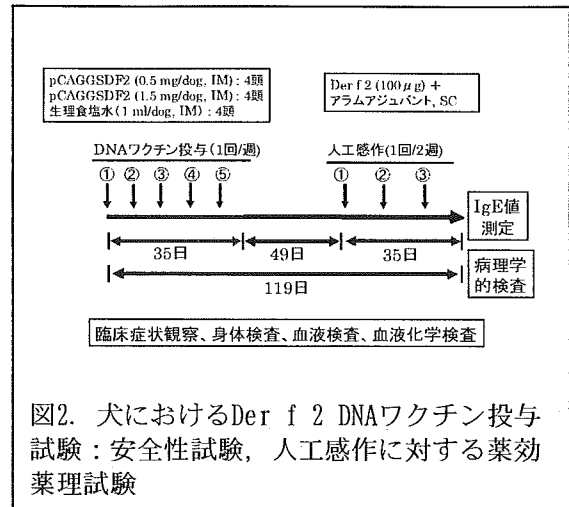


図2. 犬におけるDer f 2 DNAワクチン投与試験：安全性試験，人工感作に対する薬効薬理試験

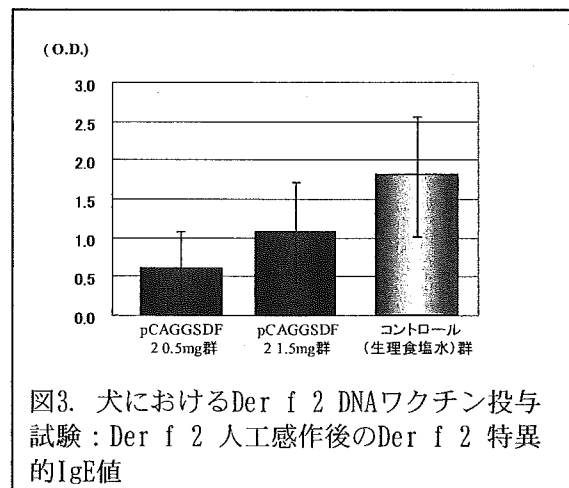
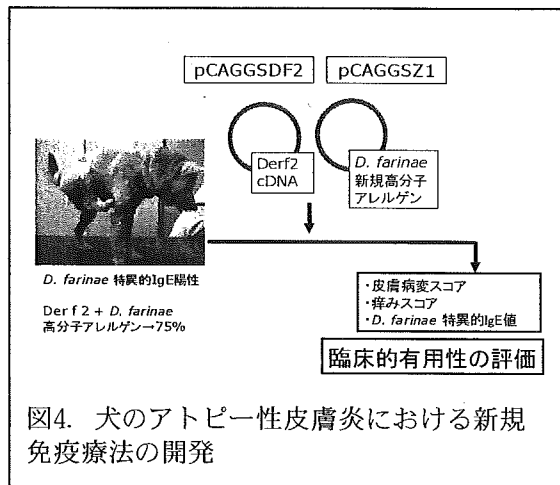


図3. 犬におけるDer f 2 DNAワクチン投与試験：Der f 2 人工感作後のDer f 2 特異的IgE値

### D. 考察

イヌのアトピー性皮膚炎におけるアレルゲンとしては、Der f 2、McCol1ら（2001）が同定したDer f 15、および本研究によって同定された新規アレルゲン（Z1）が主要アレルゲンであることが示され、これらを

標的とした免疫療法の開発が有望であるものと考えられた。本研究で開発した2種のDF DNAワクチンの臨床的有用性を検討するためにはアトピー性皮膚炎に罹患し、皮膚症状を有するイヌに投与する試験を行う必要があるものと考えられた(図4)。



#### E. 結論

イヌのアトピー性皮膚炎における新規DFアレルギー(Z1)を同定することができた。Der f 2 DNAワクチンおよびZ1 DNAワクチンのイヌにおける安全性が証明され、また実験感作に対するその有効性が示された。

#### 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., Hayashi, 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 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.* 103:83-92 (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).
  12. Yasuda, N., Tsukui, T., Masuda, K., Kawarai, S., Ohmori, K., Maeda, S. and Tsujimoto, H. Cloning of cDNA encoding canine endothelin receptors and their expression in normal tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 67:1075-1079 (2005).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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

スギ花粉症患者における Cry j 1 に対する血清中 IgE 抗体の親和性の変動に関する研究：  
減感作療法による 3 年間の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 石井豊太、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

IgE 抗体の親和性、血清中抗体濃度、末梢白血球からのヒスタミン遊離について、減感作療法による 3 年間の変動を同一患者で検討した。非減感作群と減感作期間が異なる 2 つの群（1 年以上 5 年未満群、5 年以上群）に分類し、昨年度の結果も考慮して次の結果を得た。(1) Total IgE 量は花粉飛散量に依存して増減するが、5 年以上の減感作群では total IgE 量の増大はみられなくなった。(2) IgG 抗体および IgG4 抗体は減感作により短期間で増大し、その後の減感作で高い濃度を維持した。(3) ヒスタミン遊離試験では減感作による変動をとらえることはできなかった。(4) IgE 抗体の親和性（解離定数、 $K_D$ ) は花粉飛散量に依存して変化し、花粉量に依存する親和性の亢進は 5 年以上の減感作で低減化した。(5) IgE 抗体の場合と同様の方法で Cry j 1 に対する IgG4 抗体の親和性を測定した。同一血清で比較した場合、IgE 抗体の親和性 (median、13.5 pM) に対して IgG4 抗体の親和性 (677 pM) は有意に弱かった ( $p=0.0051$ 、 $n=11$ )。以上の検討により、花粉飛散数に応じて IgE 抗体は量的に変動するだけでなく親和性も変化することが初めて明らかになり、IgE 抗体親和性は減感作療法の有用性の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 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 の増加などのさまざまな変化を引き起こすことが報告されているが、治療効果をもたらすメカニズムについてはよくわかっていない。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ヒスタミン遊離の変動を同一患者で 3 年間にわたって検討し、減感作療法の有効性の指標としての IgE 抗体の親和性の意義について検討した。

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。昨年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 群に分類したが、昨年からの 1 年間の減感作の継続により、1 群の患者は全て 2 群に移行し、2 群の患者の一部は 3 群に移行した。そこで、今年度は減感作療法を受けていない患者を新たに選択し（1 群）、2 群（1 年以上 5 年未満）、3 群（5 年以上）との比較検討を行った。各群の患者は本年度の時点での減感作期間で分類した（表 1）。

同意が得られたスギ花粉症患者から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。



IgE 抗体の親和性の測定はすでに報告したような方法で行い、もっとも頻度の多い親和性(解離定数、 $K_D$ 、pM)を算出した。

Cry j 1 に対する IgG4 抗体の親和性測定：市販されている 3 種の抗ヒト IgG4 抗体のヒト IgG4 に対する親和性を Biacore で測定し、クローン (HP6025) を用いて IgE 抗体の場合と同様な方法で親和性を測定した。

統計方法：2 年間のデータの比較は Wilcoxon t-test により行い、3 年間のデータはまずフリードマンの順位検定を行い有意差がみられた場合に Wilcoxon t-test (Bonferroni 補正) で検定を行った。表中の数値は median で示した。

### C. 研究結果

1. 血清中の抗体濃度：Total IgE 濃度はスギ花粉の飛散数に応じた(平成 15 年 8214 個/cm<sup>2</sup>、平成 16 年 705 個/cm<sup>2</sup>、平成 17 年 23000 個/cm<sup>2</sup>) 増減がみられ、花粉の飛散数に依存する total IgE の増大は 5 年以上の減感作治療を受けている群では有意な増加はみられなかった(図 1)。IgG および IgG4 抗体は短期間の減感作で増加し、減感作の継続で高い濃度を維持した。
2. ヒスタミン遊離試験では減感作による影響をとらえることはできなかった。
3. IgE 抗体の親和性：IgE 抗体の親和性も花粉飛散数に依存する変動がみられ、花粉数の増加による親和性の亢進は 5 年以上の減感作群ではみられなくなった(図 2)。
4. Cry j 1 に対する IgG4 抗体の親和性：血清中の IgG4 をトラップするために使用する抗 IgG4 抗体 (Fc specific) の IgG4 に対する解離定数をピアコアで測定した。HP6023 は  $3.9 \pm 0.9 \times 10^{-7}$  M ( $K_D$ )、HP6025 は  $2.4 \pm 0.8 \times 10^{-8}$  M、HP6013 は  $1.95 \times 10^{-7}$  M の解離定数を示し、また HP6025 の IgG のサブクラスに対する結合特異性が確認できたので(図 3)、HP6025 を使用して IgE 抗体の場合と同様に IgG4 抗体の親和性を 11 名の患者血清で測定した。IgE 抗体の親和性 13.5 pM (range 5.7-58) に対して IgG4 抗体の親和性は 677 pM (10-25510) で有意な差がみられた(図 4、

P=0.0051)。

### D. 考察

花粉の飛散数に依存して IgE 抗体量だけではなく、IgE 抗体の親和性も変動することが初めて明らかになった。花粉数による IgE 抗体量の増加と親和性の亢進は 5 年以上の減感作群では有意差がみられなくなった。IgE 抗体の親和性の増加が低減化することでヒスタミン遊離は起こりにくくなることが考えられたが、ヒスタミン遊離試験の結果では有意な差はみられなかった。ヒスタミン遊離試験のような煩雑な手技を必要とする試験で複数年のデータの比較で明確な差を得ることは難しいものと思われた。

IgG4 抗体は IgE 抗体とアレルゲンとの結合を拮抗的に抑制していると考えられているが、IgG4 抗体の Cry j 1 に対する親和性は IgE 抗体の親和性と比較して有意に弱かった。IgG4 抗体の親和性も各年度によって変動する傾向がみられたが、花粉数との関連は明確ではなかった。IgG4 抗体の親和性と花粉数との関係や治療効果との関係、さらに報告されている減感作療法の有効性との関係 (Jacobsen CG et al. Clin Exp Allergy 2005; 35: 193-198) についてはさらに多症例で検証する必要がある。

### E. 結論

Total IgE 量と Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性は飛散花粉数による変動がみられ、それらは 5 年以上の減感作療法の継続により低減化した。IgE 抗体の親和性の低減化は IgE 抗体による生物学的反応が起きにくくなる変化と考えられ、IgE 抗体の親和性の測定は減感作療法の有効性の評価に使用できるものと考えられる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

なし

表 1 患者背景

		減感作期間	患者数	m/f	減感作期間 (median)	Age (median)
減感作なし	平成 16	0	6	3/3	0	27-64
	平成 17					(37.5)
1 年以上 5 年未満	平成 15	0 or 1 年以上	7	1/6	3-4 (4)	36-63 (52)
		1 年以上 5 年未満	6	0/6		
	平成 16	1 年以上	6	1/5	2-4 (4)	36-63 (57)
		1 年以上 5 年未満	7	1/6		
	平成 17	1 年以上 5 年未満	13	1/12	1-4 (2)	36-65 (47)
5 年以上	平成 15	5 年未満	2	0/2	7-26	37-73
		5 年以上	12	4/8	(14.5)	(54.5)
	平成 16	5 年未満	2	0/2	7-26	37-73
		5 年以上	12	4/8	(14.5)	(54.5)
	平成 17	5 年以上	14	4/10	5-26 (11.5)	37-72 (51.5)

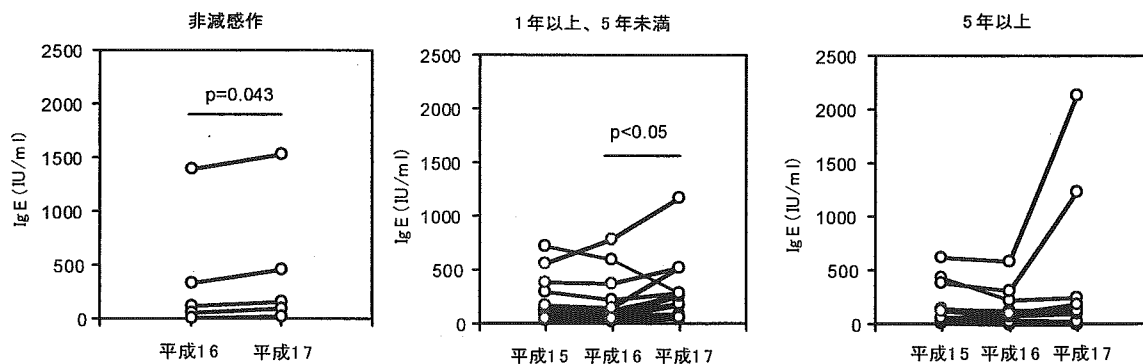


図 1 減感作療法による total IgE 濃度の変動

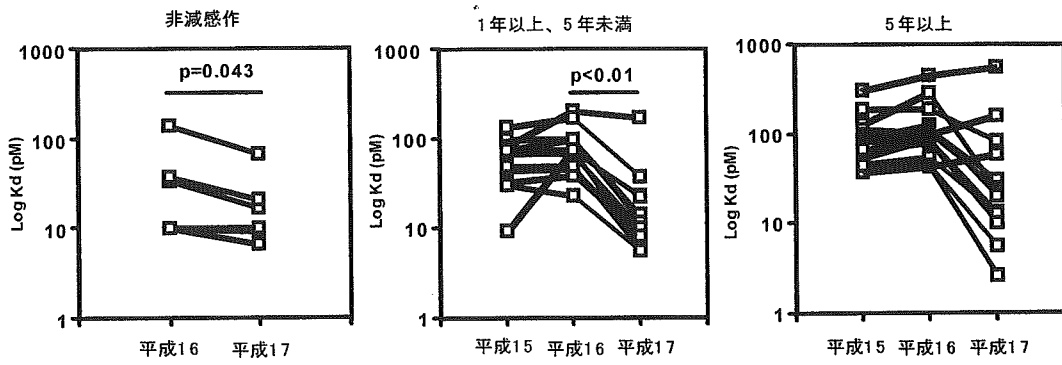


図2 減感作療法によるCry j 1に対するIgE抗体の親和性（解離定数）の変動

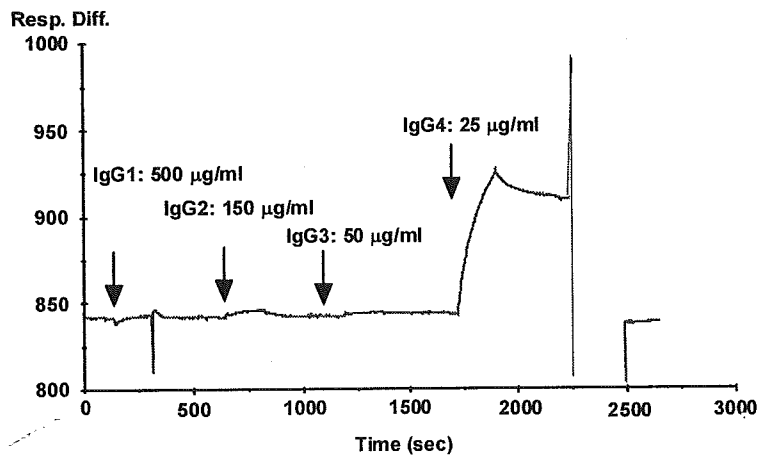


図3 Anti-IgG4抗体 (clone HP6025) の特異性

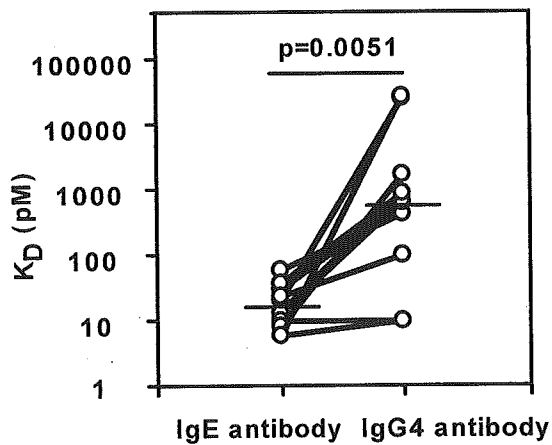


図4 Cry j 1に対するIgE抗体とIgG4抗体の親和性の比較