

2005007506

差替版

厚生労働科学研究研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

**スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と
診断・治療への応用に関する研究**

平成15～17年度 総合研究報告書

主任研究者 安枝 浩

平成18(2006)年3月

目次

I. 総合研究報告	
スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に 関する研究	1
安枝 浩	
II. 分担研究報告	
1. スギ花粉主要アレルゲンのアイソフォームの解析	16
安枝 浩	
2. スギ花粉症に対する新規ワクチンの開発に関する研究	21
阪口 雅弘	
3. 活性型組換ダニ主要アレルゲンの調整法確立、諸性質の評価、 およびアレルゲン特異的免疫療法のための改変アレルゲンの 創製	31
高井 敏朗	
4. プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの分子群 の全容解明、アレルゲンデータベースの構築	45
小埜 和久	
5. スギ花粉症に対する「食べるワクチン」の開発	55
斎藤 三郎	
6. 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	59
辻本 元	
7. Cry j 1 に対する血清中 IgE 抗体の親和性測定に関する研究	64
三田 晴久	

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）
総合研究報告書

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に関する研究

主任研究者 安枝 浩 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

研究要旨

わが国のアレルギー疾患における最大の原因アレルゲンは室外のスギ花粉と室内のダニである。本研究班は、これらのスギ花粉、およびダニのアレルゲンの分子レベルにおける構造や機能の解析を基にした新たな診断薬や治療薬の開発、ならびにスギ花粉症、ダニアレルギーの根治的治療を目標とした新規抗原特異的治療法の確立を目的として組織された。平成 15-17 年の 3 年間の研究において以下の研究成果が得られた。

スギ花粉アレルゲンのアレルゲノーム解析においては、スギ花粉には合計 131 のヒト IgE 抗体と反応するスポットがあることを見だし、その中から IgE 抗体との反応頻度が高い 3 成分のクローニングを行い新規アレルゲンとして同定した。

ダニグループ 1 アレルゲン Der f 1/Der p 1, グループ 2 アレルゲン Der f 2/Der p 2 の活性型組換体の調製法を確立した。これらの組換体は天然型と同等の構造およびアレルゲン活性を保持しているだけでなく、Der f 1/Der p 1 の組換体はプロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性や IgE/Th2 誘導活性を保持していた。さらに、プロテアーゼ活性を持たない Der f 1 変異体はマウスにおいて IgE 抗体誘導活性を持たないことを示した。

特定のモノクローナル抗体との反応性を欠失したスギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォームを 2 種類見いだした。N 末端から 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換している 352His は自然界における Cry j 1 のおよそ 20 % を占め、その存在は現行のスギ花粉アレルゲン標準化に影響を及ぼす可能性があるため、アイソフォームの存在割合によって影響を受けない新規の力価設定用 ELISA を構築した。IgE 抗体のアレルゲンに対する親和性を測定する方法を確立し、その方法を用いて、IgE 抗体の親和性が当該アレルゲンに対する生体の感受性を規定する主要な要因であること、減感作治療における治療効果の客観的指標になる可能性のあることを明らかにした。

スギ花粉症の治療のために 3 種類の新規ワクチンの開発研究を実施した。CpG-ODN を Cry j 1 に結合させた CpG-Cry j 1, Cry j 1 の T 細胞エピトープ・ペプチドに結合させた CpG-peptide, Cry j 1 の全長の約半分の断片と Listeriolysin O (LLO) の融合蛋白を発現する組換乳酸菌ワクチンの 3 種類である。CpG-Cry j 1, CpG-peptide をマウスに予防的に投与することによりアレルゲン特異的 Th1 反応を誘導することができた。

スギ花粉アレルゲン発現組換米を用いて「食べるワクチン」の評価を行った。Cry j 1 と Cry j 2 の T 細胞エピトープ連結ペプチド発現米をマウスに経口摂取させると、予防的に投与しても治療的に投与してもスギ花粉アレルゲンに対する免疫応答を抑制できることを示した。さらに、このような経口免疫寛容は摂取 6 ヶ月後においても弱いながらも維持されることが明らかになった。

イヌのアトピー性皮膚炎を動物モデル系として用い、新規免疫療法の有効性評価に関する一連の研究を行った。イヌの免疫系に対して Th1 型反応誘導能を有する CpG-ODN 配列を見出し、ダニ感作犬において CpG-ODN とダニとの混合投与による免疫療法の有用性を示した。さらに、ダニ主要アレルゲン Der f 2 と新規アレルゲン Z1 の DNA ワクチンを作製し、そのイヌにおける安全性と有効性を明らかにした。

分担研究者

阪口雅弘	(独) 理化学研究所免疫アレルギー総合科学研究センター チームリーダー
高井敏朗	順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター 講師
小埜和久	広島大学大学院先端物質科学研究科 教授
斎藤三郎	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 助教授
辻本 元	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
三田晴久	(独) 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長

A. 研究目的

わが国のアレルギー疾患における最大の原因アレルゲンは室外のスギ花粉と室内のヒョウヒダニ（以下ダニ）である。スギ花粉症はわが国の国民病ともいわれている疾患で、最近の調査では全人口のおよそ 20% が罹患している。一方、ダニについては、小児気管支喘息の原因アレルゲンの 80-90% はダニであり、成人のアトピー型気管支喘息においても大半の患者はダニに感作されている。しかもスギ花粉症や小児気管支喘息などのアレルギー疾患は、近年増加の一途をたどっており、スギ花粉、ダニを原因とするアレルギー疾患の新規治療法を確立することは社会的急務でもある。

本研究においては、これらの疾患発症の直接の原因となるスギ花粉、ダニのアレルゲンを同定、天然型アレルゲンの精製や組換え型アレルゲンの作製を行い、それらのアレルゲンの構造や機能を分子レベルで解析して、得られた成果をアレルゲンエキスの品質改善、標準化、新たな診断薬、治療薬の開発に応用する。さらに、本研究では、スギ花粉症、ダニアレルギーの根治的治療を目標とした新たなアレルゲン特異的免疫療法の開発、および免疫療法の有効性を客観的に評価できる指標の開発を行い、それらの臨床応用を目指す。

B. 研究方法

1. アレルゲンの同定、解析に関する研究（小埜・高井・安枝）

スギ花粉抽出物あるいはダニ虫体粗抗原を二次元電気泳動（一次元目：等電点電気泳動、二次元

目：SDS-PAGE）した後に、分離したタンパク質を PVDF 膜にプロットした。このプロットしたタンパク質とスギ花粉症あるいはダニアレルギー患者血清 IgE 抗体（検体数はそれぞれ n=40）とを反応させ、二次抗体などで増感させた後、これを X 線フィルム上に感光させてアレルゲンタンパク質を IgE 反応性スポットとして検出した。それぞれの IgE 抗体反応頻度を検体ごとに統合解析することで、二次元ゲル上での両アレルゲン分子種構成を反映した IgE 抗体反応頻度マップを作製した。このうち高 IgE 反応性のタンパク質スポットを二次元ゲル上から切り出し、トリプシンにてインゲル消化を行った。遊離したペプチドのアミノ酸一次配列を TOF-MS を用いて同定するとともに、これをデータベース解析に供して既知の主要抗原に対応するアイソフォームのアサインメントを行った。

新規に見いだされた高反応性スギ花粉アレルゲン（CJP-4, CPA39, CPA63）に関しては、得られた部分アミノ酸配列情報を元に primer を設計し、全長 cDNA を 5' -および 3' -RACE PCR 法によりクローニングするとともに全塩基配列を決定した。CJP-4 については天然型抗原をスギ花粉粗抗原よりキチンアフィニティー沈殿とゲルろ過クロマトグラフィーにて単離精製し、その酵素（chitinase）活性をザイモグラフィーにて確認した。更に本天然型分子の IgE 結合活性およびラテックスとの交差反応性を酵素抗体法（ELISA）ないし competitive ELISA にて評価した。また CPA39, CPA63 については全長 cDNA のクローニングと構造解析を終えた後に、昆虫細胞-バキュロウイルス分泌発現系を用いた組換え型アレルゲンの発現試験に供した。両 cDNA の 5' -末端にニワトリリゾチーム由来分泌シグナル配列、3' -末端に検出・精製用の His-tag 配列を連結し、これを組換えウイルス作製用トランスファーベクターに挿入した。得られたコンストラクトをバキュロウイルスゲノム DNA とともに昆虫細胞 Sf21 株に co-transfect することで組換えバキュロウイルスを生成させた。同ウイルスを Sf21 細胞に感染させ、組換え型抗原を発現させた。分泌発現を anti-His 抗体による Western blot 解析により確認した後に培養上清を回収し、HisTrap カラムによるニッケルアフィニティークロマトグラフィー

および HiTrap Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製標品を得た。得られた組換え型 CPA39, CPA63 の IgE 結合活性を ELISA にて評価した。

組換え型 Der f 1 および Der p 1 は、プロ体を酵母で発現させ、培養上清を回収し、活性化処理して成熟体を得た。成熟体およびプロ体をカラム精製した。組換え型 Der f 2 および Der p 2 は、大腸菌で発現させ、リフォールディング後、カラム精製した。天然型 Der f 1, Der p 1, Der f 2 および Der p 2 は、Yasueda らの方法 (Int Arch Allergy Appl Immunol, 1986.)によりダニ培養物から調製した精製天然抗原を用いた。一部の実験では市販の天然型 Der f 1 および Der p 1 を用いた。アレルギー活性は、IgE 結合試験、固相化天然型抗原への IgE 結合に対する阻害試験、およびヒスタミン遊離試験により解析した。2次構造は、CD スペクトル測定により解析し、Der f 1 のプロ体の立体構造予測は、X 線結晶構造が既に決定されているシステインプロテアーゼのプロ体および成熟体の構造を利用して、ホモロジーモデリング法により行った。

組換え型 Der p 1 および Der f 1 については各種基質 (合成基質およびコラーゲン基質)・阻害剤を用いてプロテアーゼ活性の解析を行った。精製あるいは保存中にプロテアーゼ活性触媒中心のシステイン残基が酸化されているので、使用直前に DTT あるいは L-cysteine により処理してシステインプロテアーゼ活性の再活性化を行った。後述するヒトタンパク質切断、ケラチノサイト刺激、およびマウス免疫の際も、同様に再活性化処理を行った。組換え型 Der f 1 および Der p 1 のプロテアーゼ活性によるヒト B 細胞株および末梢血 T 細胞上の CD23 および CD25 の切断は、フローサイトメトリーにより解析し、ヒト α 1-antitrypsin 標品の切断は SDS-PAGE により確認した。ヒトケラチノサイトの活性化は、ヒトケラチノサイト培養上清中の IL-8 産生を測定することにより評価した。アラムと共に各種アレルギーをマウス腹腔に免疫し、血清中 IgE, 抗原特異的 IgE および IgG を ELISA によって測定した。

林野庁関東育種区で継代されているスギ精英樹 (スギ造林事業における種苗生産のために育成、継代されている品種) 96 個体の花粉を用いた。以前に作製した 2 種類のモノクローナル抗体 (mAb, J1B01 と J1B07), ウサギポリクローナル抗体 (pAb) に対する精英樹花粉抽出液中 Cry j 1 の反応性を ELISA で調べた。特定のモノクローナル抗体に対する反応性を欠失している精英樹花粉から Cry j 1 cDNA をクローニングして、抗体との反応性の相違に関与するアミノ酸置換を特定した。各精英樹におけるアミノ酸置換に関与する遺伝子多型は PCR-RFLP 法によって調べた。

Cry j 1 に対する mAb を新たに 36 種類作製し、エピトープマッピングによりグループ分けをした。各グループの代表的な mAb と精英樹 58 個体の花粉抽出液中 Cry j 1 との反応性を調べることにより新たなアイソフォームを探索した。Cry j 1 アイソフォームの精製標品は、352His の場合はこのアイソフォームをホモで保有している精英樹花粉から既知の方法で精製、調製した。55 番目が Pro から Leu に置換した 55Leu は、これをホモで保有している個体が見いだせなかったため、これをヘテロで保有する精英樹の花分から Cry j 1 を精製し、55Leu と反応しない mAb (J1B07) で一般型 Cry j 1 を徹底的に吸収、除去することにより調製した。

Cry j 1 アイソフォームに対する IgE 抗体の測定は paper disk を固相とする RAST 法で、ELISA inhibition test はマイクロプレートウェルを固相とする方法で、ヒスタミン遊離は、同意を得たスギ花粉症患者の末梢血洗浄白血球を用いる方法で実施した。各種スギ花粉抽出液中、市販スギ花粉アレルギーエキス中の Cry j 1 含有量の測定は、2 種類の mAb を組み合わせた sandwich ELISA, ウサギ pAb を用いた sandwich ELISA で行った。「スギ花粉エキス標準品」は日本アレルギー学会から、市販の「標準化アレルギー治療エキス」の 6 ロットは鳥居薬品 (株) から提供を受けた。標準化に用いる sandwich ELISA は、さまざまな mAb 同士を組み合わせた系やいくつかの mAb をブレンドした系について、各種スギ花粉抽出液との反応性の検討を行い、その中から力価測定用として適切なものを選択した。

2. アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定 (三田)

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、血漿を用いて抗体濃度 (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。

血清のグロブリン分画から抗 IgE 抗体 (Dε2 specific, clone E124.2.8) を結合させた磁気ビーズを用いて IgE を分離した。そこにビオチン標識した Cry j 1 あるいはヒノキ花粉主要アレルゲン Cha o 1 (2 pM から 36 nM までの約 20 濃度) を加えてインキュベートし、続いて streptavidin-β-galactosidase さらに 4-methylumbelliferyl β-D-galactoside を加え、生成した蛍光強度を測定した。得られた結果から Pierson らの方法 (Pierson L et al. J Immunol Methods 1998; 211: 97-109) に従ってコンピューター解析を行い、もっとも頻度の多い親和性 (解離定数 K_D , pM) を算出した (Mita H et al. Clin Exp Allergy 2000; 30: 1582-1589)。さらに、抗 IgE 抗体の代わりに抗 IgG4 抗体 (clone HP6025) を用いて、同様な方法で Cry j 1 に対する IgG4 抗体の親和性を測定した。

減感作はスギ花粉標準化エキスをを用いて行った。平成 16 年は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 つの群に分類したが、平成 17 年には 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、平成 17 年度は新たに減感作療法を受けていない患者 (1 群) を加えて、2 群, 3 群との比較検討を行った。各群の患者は平成 17 年度の時点での減感作期間で分類した。2 群間のデーターの比較は Wilcoxon t-test により行った。3 群間のデーターの検定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は Wilcoxon t-test (Bonferroni 補正) で検定を行った。相関関係は Spearman の順位相関で検定した。

3. 治療法に関する研究 (阪口・斎藤・辻本)

BALB/c マウスに CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲンワクチン (CpG-Cry j 1) を 1 週間に 1 回, 3 週連続して皮下接種した。コントロール群として PBS, Cry j 1, GpC-結合 Cry j 1 を接種した。この最終免疫を 0 週とし、3 と 6 週目に Cry j 1-アラムを腹腔内投与した。マウス血清中 (1, 2, 4, 5, 7 週目) の Cry j 1 特異的 IgE, IgG1, IgG2a を ELISA 法で測定した。免疫後 8 週目にマウス脾臓中の CD4 陽性 T 細胞を精製し、Cry j 1 とともに 72 時間培養したときの培養上清中の IFN-γ, IL-4 を ELISA 法で測定した。

Cry j 1 T 細胞エピトープ・ペプチド (peptide 277-290) に CpG を結合させたワクチン (CpG-peptide) または PBS をマウスに毎週 1 回, 3 週連続して皮下接種した。最終免疫から第 1, 2, 4, 5, 7 週後にマウスの尾動脈より採血を行い、血清を得た。また、最終免疫から第 3, 5 週に、Cry j 1-アラムをマウス腹腔内に接種した。第 8 週に脾臓から CD4 陽性細胞を精製し、Cry j 1 とともに 72 時間培養したときの培養上清中の IFN-γ および IL-4 を ELISA 法で測定した。

乳酸菌: *Lactobacillus casei* (ATCC393) 株に対して Cry j 1 全長をコードする cDNA を組み込んだプラスミドベクターをエレクトロポレーション法で導入した。しかし、Cry j 1 の発現は確認されなかったため、既に *L.casei* における発現に成功している LLO との融合タンパクとして発現されるようにデザインしたプラスミドベクターを作製し、*L.casei* に導入した。本研究では、N 末端から 158-329 番目のアミノ酸を含む Cry j 1 (Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉; 約 20 kDa) を用いた。この Cry j 1 はヒトおよび BALB/c マウスの CD4+ T 細胞が認識するペプチド断片 (T 細胞エピトープ) を含んでいる。LLO は、*Listeria monocytogenes* の菌体由来タンパクであり、LLO 自体にマウスの脾臓細胞から IFN-γ, IL-12, および IL-18 などの Th1 サイトカインを誘導することが明らかとなっている。LLO は溶血毒性を有するため、本研究では、溶血毒性をもたらすドメインを欠損させた変異 LLO を用いた。コントロールとして、LLO のみ導入した株と空のベクターを導入した株も作製した。これらの株に関して、Cry j 1 の発現および IL-12 p70 誘導能をマウスの脾臓細胞を用いて検討した。

Cry j 1 発現組換え米は、研究協力者の鳥山博士によって作成された。導入遺伝子は、イネの種子貯蔵タンパク質グルテリン遺伝子のプロモーターである GluB-1pro と GluB-1 遺伝子のシグナル配列の下流に部分的な Cry j 1 遺伝子(前半;33-227, 後半; 252-375) と GFP 遺伝子を連結したコンストラクトをそれぞれ作成し、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 をイネ胚乳に発現させた。組換え体の抗原性は、T細胞の増殖反応およびウェスタンブロット法にて解析した。経口寛容誘導能は、B10.S マウスに前半部分の組換えイネ種子を食べさせた後に、Cry j 1 を点鼻投与し免疫応答能について検討した。

ヒトの主要なT細胞エピトープを7連結したペプチド(7 crp)を発現した米は、研究協力者の高岩博士から供与を受けた。米に発現した7 crp の抗原性は、7 連結したペプチドの一部のペプチドに反応する B10.S マウス由来の CD4 陽性ヘルパーT 細胞株を用いて検討した。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、Cry j 1 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、Cry j 1 を点鼻感作した後に、発現米を食べさせた後、もう一度 Cry j 1 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、経口摂取させるペプチド発現米の量を調節し、その後の免疫応答性を検討した。経口免疫寛容の持続期間は、1ヶ月間7 crp 発現米を経口摂取させ、6ヶ月間 wild type の米を食べさせた後に免疫応答能を解析して検討した。

7 crp の米からの抽出は、7 crp 発現米を熱処理後、アミラーゼに続いて酸処理した後に、7 crp に対するモノクローナル抗体で作製したアフィニティカラムを用いて精製した。抗原を大量に作製するために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、様々な組換え体を作製した。

ダニに対する IgE 抗体が高値を示したアトピー性皮膚炎 (AD) のイヌ 20 頭の血清を用いて、二次元イムノブロット法によってイヌにおけるダニ主要アレルゲンの解析を行った。イヌの AD における *D. farinae* (DF) の主要アレルゲンと考えられる約 170kDa のアレルゲン (Z1) のクローニン

グを実施した。次いで、組換え体 Z1 に対する抗体のカラムによって天然型 Z1 蛋白を単離し、AD に罹患したイヌの血清との反応性を検討した。

実験用ビーグル犬 10 頭の末梢血単核細胞を用い、CpG-ODN の IFN- γ 誘導能を検討した。多くの動物種において有効性が認められている CpG-ODN 配列およびイヌに種特異性を示す *Babesia gibsoni* の CpG-ODN 配列を参考にして、11 種類の CpG 配列を作製した。IFN- γ 産生については、ELISA によりタンパクを、TaqMan システムによって mRNA を測定した。実験用ビーグル 10 頭にアラムとともに DF 抽出物をアラムとともに免疫して実験的ダニ感作犬を作製した。この実験的ダニ感作犬を 2 群に分けて、1 群には CpG-ODN と DF 抽出物の混合物を、もう 1 群には DF 抽出物のみを投与した。感作開始後 35 日目に DF 抽出物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 測定を行った。

Der f 2 cDNA および Z1 cDNA をプラスミド発現ベクターに組み込み、DNA ワクチンを作製した。予定臨床投与量 (0.5 mg/dog) およびその 3 倍量を実験用ビーグル犬に投与し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 による実験的感作を行いその有効性を検討した。

C. 研究結果

1. アレルゲンの同定、解析に関する研究

スギ花粉抽出物を二次元電気泳動し、タンパク質染色すると約 400-800 のスポットが検出された。この分離したタンパク質と 40 人のスギ花粉症患者 IgE 抗体との反応性を測定し、それぞれの抗原の IgE 抗体反応頻度マップを作製した。このマップ上で少なくとも一人以上の患者 IgE 抗体と反応したタンパク質は 131 スポット存在した。主要アレルゲン Cry j 2 の IgE 抗体反応頻度 (40%) よりも高い IgE 抗体反応頻度を示すアレルゲンスポットは 31 個存在することが明らかとなった。

アレルゲノーム解析にて高い IgE 抗体反応頻度を示すスポットの TOF-MS 解析と cDNA クローニングにより、3 種類の新規スギ花粉アレルゲン、class IV chitinase (CJP-4), β -1,3-glucanase (CPA39) および aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein (CPA63) を同定した。CJP4

は chitinase アレルゲンである Hev b 11 (ラテックス), Prs a 1 (アボカド) と約 40%の同一性を示し, スギ花粉から精製した天然型 CJP-4 はラテックスアレルゲンと IgE 交差反応性を示した。バキュロウイルス-昆虫細胞で発現させた組換型 CPA39, ならびに CPA63 はスギ花粉症患者 IgE 抗体との結合能を保持していた。

酵母で発現させて活性化処理をした組換型 Der f 1 および Der p 1 成熟体の 2 次構造は天然型と一致した。成熟体のアレルゲン活性は天然型と同等であったが, プロ体は組換型成熟体および天然型とは異なる 2 次構造をとり, アレルゲン活性は低下していた。ホモロジーモデリング法によって作製した Der f 1 プロ体の予測立体構造モデルにおいて, プロ配列は Der f 1 分子表面の 2 つの領域 (プロ配列結合ループおよび基質結合クレフト) で成熟体部分と接触していた。大腸菌で発現させた組換型 Der p 2 および Der f 2 の 2 次構造も天然型と一致し, 同等のヒスタミン遊離活性を示した。

Der f 1 および Der p 1 のプロテアーゼ活性は, 組換型と天然型の基質特異性は同じであることが確認されたが, 組換型の方が高活性であった。組換型 Der f 1 および Der p 1 はヒト CD23, CD25 および α 1-antitrypsin を切断した。組換型 Der f 1 および Der p 1 刺激によりヒトケラチノサイト培養上清中の IL-8 が上昇し, システインプロテアーゼインヒビターの添加によりこれは抑制された。

L-cysteine 処理によりプロテアーゼ活性を活性化した組換型 Der f 1 および Der p 1 でマウスを免疫したときは, 天然型 Der f 1 および Der p 1 と同等の IgE 産生を誘導したが, システインプロテアーゼ特異的不可逆的阻害剤である E-64 で処理した組換体, および酵素活性を完全に消失した Der f 1 変異体でマウスを免疫した場合には総 IgE および特異的 IgE は著しく低値であった。

2 種類の mAb (J1B01 と J1B07) を組み合わせた sandwich ELISA において, Cry j 1 の反応性が低下している精英樹, および反応性の低下が見られない精英樹, 合計 3 個体の花粉から Cry j 1 cDNA のクローニングを行い, J1B01 と反応しないアイソフォーム, J1B07 と反応しないアイソフォームの 2 種類の新規 Cry j 1 アイソフォーム

を同定した。J1B01 と反応しないアイソフォームは N 末端から 55 番目のアミノ酸が Pro から Leu に置換し(55Leu), J1B07 と反応しないアイソフォームは 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換していた(352His)。精英樹 94 個体における対立遺伝子頻度は 352His が 18.6%, 55Leu が 3.7% であった。新たに 36 種類の mAb を作製して, 精英樹 58 個体を対象に新規アイソフォームを探索したが, 特定の mAb との反応性を完全に欠失している精英樹, すなわち新たなアイソフォームをホモで保有している可能性のある精英樹は 58 個体の中からは見いだせなかった。2 種類のアイソフォーム 352His, 55Leu と一般型 Cry j 1 との間でヒト IgE 抗体に対する反応性に違いは見いだせなかった。

352His は精英樹 94 個体における対立遺伝子頻度が 18.6% と高く, 自然界に存在する Cry j 1 の 20% 前後はこのアイソフォームであると推定された。スギ花粉アレルゲンエキスでは, 日本アレルギー学会が選定した「スギ花粉エキス標準品」は 26% の Cry j 1 が 352His であり, 現在市販されている「標準化アレルゲン治療エキス」の 6 ロットも標準品とほぼ同じレベルであったが, 以前に市販されていた Hollister-Stier 社製のエキスでは 90% 以上の Cry j 1 がこのアイソフォームで占められていた。現行のスギ花粉アレルゲン標準化法では, J1B07/J1B01 を用いる ELISA で, 日本アレルギー学会標準品をスタンダードとして用いて測定したときの Cry j 1 含有量を基にして力価が設定されている。この方法では 352His の割合が標準品のそれよりも低いものは, わずかではあるが本来の Cry j 1 量よりも高めの値になり, 逆に His352 が大半を占めるエキスでは測定値が極端に低くなる。そこで, このような誤差を生じない適切な力価測定用 ELISA の系を確立すべく, ELISA に使用する mAb の組み合わせについて検討を加えた結果, 一次抗体には J1B07 と新規の J1B47 を等量ブレンドしたもの, 二次抗体には J1B01 という組み合わせがアイソフォームの影響を受けにくく, 力価測定用 ELISA として最適であった。

2. アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定
ヒスタミン遊離試験における Cry j 1 と Cha o 1

に対する reactivity は有意に相関したが、Cry j 1 に対する reactivity の方が有意に高値であった。同様に、Cry j 1 と Cha o 1 に対する sensitivity の間にも有意な相関がみられたが、Cry j 1 に対する sensitivity の方が有意に低値、すなわち Cry j 1 に対してより高い感受性を示した。IgE 抗体の K_D は Cha o 1 よりも Cry j 1 に対して有意に低値、すなわち高親和性を示したが、両者に対する親和性の間には相関はみられなかった。ヒスタミン遊離の sensitivity は reactivity に連動して変動するので、ヒスタミン遊離反応への親和性の関与を解析するためには reactivity が同程度のケースを選んで比較する必要がある。Cry j 1 と Cha o 1 に対する reactivity が比較的近似している 4 例 (reactivity が約 50%) について、sensitivity と K_D は有意な相関を示し、reactivity が約 70%-99% の 6 例においても同様に有意な相関がみられた。すなわち、Cha o 1 に対する IgE 抗体の親和性は Cry j 1 に対する親和性よりも弱く、その低親和性が Cha o 1 によるヒスタミン遊離の低下という形で生物学的反応に反映されていた。

減感作治療の推移にともなう各種パラメーターの変動について解析した。total IgE 濃度はスギ花粉の飛散数 (平成 15 年 8214 個/cm², 平成 16 年 705 個/cm², 平成 17 年 23000 個/cm²) に応じた増減がみられたが、5 年以上の減感作治療を受けている群では、花粉飛散数に依存する total IgE の増大に統計的有意差はみられなかった。同様に、IgE 抗体の親和性に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ていた。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ていた。IgG4 抗体の親和性を 11 名の患者血清で測定した。IgE 抗体の K_D 13.5 pM (range 5.7-58) に対して IgG4 抗体の K_D 677 pM (10-25510) は有意に高値、すなわち低親和性であった

3. 治療法に関する研究

Cry j 1 とアラムでマウスを免疫したとき、あらかじめ CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲンワクチン (CpG-Cry j 1) を接種した群では、対照群に比べ Cry j 1 特異的 IgE の産生が有意に抑制された。また、Cry j 1 特異的 IgG1 の産生に関しては、ワ

クチン接種群と対照群では、有意な差が認められなかったが、Cry j 1 特異的 IgG2a の産生においては、ワクチン接種群の方が有意に高値を示した。さらにマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を精製し、Cry j 1 とともに培養したときの細胞上清中では、ワクチン群は対照群と比べ、有意に高い Cry j 1 特異的 IFN- γ の産生が認められ、ワクチン接種群は Cry j 1 特異的な Th1 応答を誘導することが示された。一方、Cry j 1 特異的 IL-4 の産生はワクチン接種群と対照群では有意な差が認められなかった。CpG-Cry j 1 のかわりに CpG-peptide を接種した群においても、Cry j 1 とアラムで免疫したマウスの免疫応答に同様の傾向が見られた。

スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌において、LLO-Cry j 1 が発現していることが抗 LLO 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認され、その分子量は組み込んだ LLO と Cry j 1 の分子量を加えたものに一致していた。また、Cry j 1 の mRNA が発現していることも確認された。この遺伝子組換え乳酸菌による IL-12 p70 誘導能を BALB/c マウスの脾臓細胞で検討した結果、LLO の発現によって IL-12 の産生が増強されていた。

Cry j 1-GFP 融合タンパク質はイネ胚乳のプロテインボディに局在し、種子一粒あたりに含まれる Cry j 1 のタンパク量は、数マイクログラムレベルであった。発現した Cry j 1 の抗原性は T 細胞、B 細胞レベルで保たれ、T 細胞に対する抗原性は、加熱処理後も保持されていた。Cry j 1 の前半部分の発現米を摂取させた後、Cry j 1 で点鼻感作したマウスは、wild type の種子摂取群に比べ、Cry j 1 に対する T 細胞の増殖反応、IgE 抗体産生のいずれも抑制されていた。

7 連結ペプチド (7 crp) の発現量は種子一粒あたり数十マイクログラムレベルであり、7 crp も加熱処理後の T 細胞に対する抗原性は保持されていた。Cry j 1 前半部分の発現米摂取群と同様に、7 crp 発現米の予防的経口摂取群では、T 細胞の Cry j 1 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。さらに、7 crp 発現米を治療的に経口摂取させた群においても、IgE 抗体産生が抑制されていた。経口免疫寛容の誘導に必要な摂取量についての検討では、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 μ g 経口摂取させた群では免疫応答は抑制されなかった。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 ヶ月後においても弱いながら経口免疫寛容は維持されていた。

イヌの末梢血単核球において IFN- γ 産生を強く誘導する CpG-ODN 配列 1 種類を決定することができた。この CpG-ODN 配列を用いてイヌ生体内における CpG-ODN の有効性を検討した。DF で実験的感作したイヌに、あらかじめ CpG-ODN と DF 抽出物の混合物を投与した群は、DF 抽出物のみを投与した群に比べて、ブースター感作後の血清中 DF 特異的 IgE 抗体の上昇が抑制されていることが示された。

AD に罹患したイヌの血中には天然型 Z1 に対する IgE 抗体が検出され、Z1 がイヌにおける新規ダニアレルゲンであることが証明された。また、AD のイヌの 70 % に Der f 2 と Z1 の両方、または一方に対する IgE 抗体が検出された。Der f 2 DNA ワクチン、Z1 DNA ワクチンを予定臨床投与量の 3 倍量投与してもイヌに異常は認められなかった。Der f 2 DNA ワクチン投与後に実験的感作をした群では、ワクチン非投与後に感作した群に比べて Der f 2 特異的 IgE 抗体の上昇が抑えられていた。

D. 考察

従来の方法では、スギ花粉抽出物中に存在する微量のアレルゲンタンパク質を網羅的に明らかにすることは非常に困難であった。アレルゲノーム解析の手法を用いて一連の実験を多数の患者に対して行うことにより、高頻度に患者血清と反応するアレルゲンタンパク質から、少数の患者と反応するタンパク質までのアレルゲンタンパク質の IgE 抗体反応頻度マップを作ることができ、これまで不明であったスギ花粉アレルゲンの IgE 抗体反応頻度からみた全体像が明らかになった。同時に、患者個人の感作アレルゲンタンパク質の IgE 抗体反応パターンを可視化でき、各個人によって反応性スペクトラムが著しく異なることを知ることができた。スギ花粉のアレルゲノーム解析により、Cry j 1, Cry j 2 以外の主要アレルゲンとして class IV chitinase (CJP-4), β -1,3-glucanase

(CPA39) および aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein (CPA63) の 3 種類を新たに同定した。これら以外にも、IgE 抗体反応頻度の高い未知アレルゲンについてもその cDNA クローニングが順調に完了しつつあり、本研究によって主要なスギ花粉アレルゲノームの全容を明らかにすることができたと考えている。

ダニ主要グループ 1 (Der f 1 および Der p 1), およびグループ 2 アレルゲン (Der f 2 および Der p 2) の活性型組換え体の調製法を確立した。これらの組換えダニ主要アレルゲンは分子サイズ、タンパク質 2 次構造、およびアレルゲン活性において天然型と同等であった。Der f 1 および Der p 1 については、組換え型がシステインプロテアーゼ活性を示すこと、天然型と同等の分解基質特異性を有すること、およびマウスに免疫すると天然型と同等の IgE 産生を誘導できることを示した。すなわち、組換え型 Der f 1, Der p 1 は天然型と同等の構造および IgE 結合能/アレルゲン活性を保持しており、診断や治療における標準化抗原として有用である。また、プロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性や IgE/Th2 誘導活性を保持しているため、機能と疾患の関連における作用点の解析研究においても有用である。さらに進んで、次世代型アレルゲンワクチンとして有望な変異体を設計・作製した。プロテアーゼ活性をもたない Der f 1 変異体を遺伝子工学的手法により作製しマウスに免疫したところ、IgE 誘導を含めた抗原性が著しく減弱しているという非常に興味深い事実が得られた。アレルゲンの生化学的活性の消去によって IgE/Th2 を消去、あるいは低減するという戦略に基づくアレルゲンワクチンはこれまで検討されたことがない。Der f 1 のプロテアーゼ活性中心の変異体を減感作療法のワクチンとして用いればプロテアーゼ活性による IgE/Th2 誘導が回避され、高い治療効果が得られる可能性がある。今後、この変異体がアレルギーの予防および治療効果を発揮するかどうかを実験動物モデルで検証する予定である。

スギ精英樹の花粉から特定の mAb と反応しない Cry j 1 のアイソフォームを 2 種類同定した。そのうちの N 末端から 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換している 352His は、精英樹 94

個体における対立遺伝子頻度が 18.6%であり、タンパク質レベルでのこのアイソフォームの存在割合を調べた結果からも、自然界に存在する Cry j 1 の 20%前後はこのアイソフォームであると推定され、無視できないレベルである。新たに多種類の mAb を作製し、58 種類の精英樹を対象にして新たなアイソフォームを探索した。しかし、352His のように自然界に高い割合で存在する第 3 のアイソフォームは見いだされなかった。

これまでに見いだされた 2 種類のアイソフォームはいずれも特定の mAb との反応性は欠失していたが、ヒト IgE 抗体との反応性には一般型と差は認められず、シラカンバ花粉の主要アレルゲン Bet v 1 で報告されているような hypoallergenic isoform ではなかった。したがってこのようなアイソフォームの存在が花粉症の症状に影響を及ぼすということではなく、構造解析の結果が新たな治療薬の開発へと展開する可能性があるというわけではない。しかし、アイソフォームの存在は現行の標準化には影響を及ぼす。この問題を解決すべく新たな力価測定用 ELISA の系を組み立てた。新しい ELISA はエキス中のアイソフォームの存在割合にほとんど影響を受けない。また、352His のように存在割合の高い Cry j 1 の新規アイソフォームが存在する可能性はきわめて低いので、この ELISA を用いる限り標準化における力価測定に問題の生じることはないと考えられる。

Cry j 1 と Cha o 1 に対する IgE 抗体の親和性が測定できた 18 例の K_D の値から換算すると、Cry j 1 (MW 40000) の K_D の 1.58-79.4 pM は 63.2 pg/ml-3.2 ng/ml に相当し、Cha o 1 (MW 40000) の K_D の 2-500 pM は 80 pg/ml-20 ng/ml に相当する。mAb の場合には、 K_D の値は最大結合量の半分の結合に達するのに必要な抗原濃度に相当する。これらの症例におけるヒスタミン遊離試験の sensitivity は Cry j 1 で 16 pg/ml-10 ng/ml、Cha o 1 で 21 pg/ml-100 ng/ml を示し、これらの値は K_D から換算された濃度にほぼ匹敵しており、この方法により得られた親和性は生物学的反応を良く反映しているものと考えられた。すなわち、IgE 抗体の親和性は IgE 抗体の生物学的反応の重要なパラメーターのひとつであることを強く示唆している。

減感作治療継続中の患者血中 IgE 抗体の親和性を花粉飛散量の異なる 3 年間追跡した今回の研究により、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治療の有効性の評価に有用であると考えられる。

CpG-Cry j 1 や CpG-peptide の接種により Cry j 1 特異的 IgE の産生抑制や Cry j 1 特異的 IgG2a、IFN- γ の産生が認められたことから、これらの conjugate は Cry j 1 特異的 Th1 型の免疫反応を誘導することが示唆された。特に、T 細胞エピートープを含むペプチドはアレルゲンそのものを使用した場合と比べ、副反応が少なくなり、一度に大量のペプチドを接種できる利点がある。そのため、CpG-peptide を使用した場合は、短期間で効果が得られるのではないかと期待される。本研究では、ワクチン接種後にスギ花粉アレルゲンを接種する予防的実験を行ったが、今後はスギ花粉アレルゲンを感作したマウスにワクチンを接種する治療の実験を行い、より実用化を目指した研究を行う予定である。

乳酸菌の強い Th1 誘導作用を利用したアレルゲン組換え乳酸菌ワクチンは、製造コストも低く、経口投与で行うことのできる安全性の高い治療用ワクチンとなりうる。経験的に、植物タンパクなどを乳酸菌に発現させることは難しいことが判っており、今回の研究でも Cry j 1 全長は発現しなかった。そこで、Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ を、既にその発現に成功している LLO との融合タンパクとして組込むことで、その発現に成功した。今後、この組換え乳酸菌に発現している Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ の抗原性を確認すること、組込んだタンパクの発現量をより増やすことなど課題は多く残されている。これらの課題を克服し、この組換え乳酸菌の抗アレルギー効果をスギ花粉症モデルマウスで検討する計画である。

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トレランス

が誘導され、食べるワクチンは花粉症に対し有効な免疫療法となることが示唆された。経口トレランスの有効量、持続期間、あるいはそのメカニズムの詳細については今後更に解析する必要がある。また、食べるワクチンは、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である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の結合性が少ないように改変した全長のアレルゲン蛋白である。今後も、副作用が少なく、より効果的でしかも安価にできる免疫療法の開発に取り組みたいと考えている。

本研究で開発した2種類のダニDNAワクチンは、その安全性試験において問題のないことが確認され、ダニによる実験感作犬でDer f 2をコードするDNAワクチンの予防的投与によってIgE抗体の産生を抑制することが示された。ダニへの自然感作によってADを発症したイヌを対象にした臨床的評価が今後の課題である。

イヌの末梢血単核球において効率よくIFN- γ を誘導することができるCpG-ODNを同定することができた。この配列はヒトやブタにおいてすでに報告されている配列と一致していることから、動物種を超えてIFN- γ を誘導する能力があるCpG配列であると考えられた。したがって、このCpG配列を利用した免疫療法は、イヌとヒトに共通の有効性を示すものと考えられ、本研究において得られた成果は直接ヒトに応用できる可能性があることを示唆している。

E. 結論

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と、その診断・治療への応用に関して多くの成果が得られた。これらの成果をスギ花粉症、ダニアレルギーに対する特異的治療法の実用化に向けて展開していくことが今後の課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujimura T, Shigeta S, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Yoshizato K, Ono K. Two-dimensional IgE-binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133: 125-135.
- 2) Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Hide M, Ono K. Molecular cloning of a class IV chitinase allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and competitive inhibition of its IgE-binding capacity by latex C-serum. *Clin.Exp.Allergy* 2005; 35: 234-243.
- 3) Takai T, Kato T, Yasueda H, 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* 2005; 115: 555-563.
- 4) Takai T, Mizuuchi E, Kikuchi Y, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. Glycosylation of recombinant proforms of major mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139: 181-187.
- 5) Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Dilution-method to refold bacterially expressed recombinant Der f 2 and Der p 2 to exhibit the secondary structure and histamine-releasing activity of natural allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137:1-8.
- 6) Takai T, Kato T, Sakata Y, Yasueda H, 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* 2005; 328: 944-952.

- 7) Takai T, Kato T, Ota M, Yasueda H, Kuhara T, Okumura K, Ogawa H. Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25, and α 1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 194-200.
- 8) Kato T, Takai T, Mitsuishi K, Okumura K, Ogawa H. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skin barrier against mite proteases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 169-176.
- 9) Nakazawa T, Takai T, Hatanaka H, Mizuuchi E, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. *FEBS Lett* 2005; 579: 1988-1994.
- 10) Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K. The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J Biol Chem.* 2004; 279: 5081-5087.
- 11) Sakata Y, Arima K, Takeshita K, Takai T, 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* 2004; 324: 1340-1345.
- 12) Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, Inagaki F, Hatanaka H. NMR study on the major mite allergen Der f 2: Its refined tertiary structure, epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. *J Biochem* 2005; 137: 255-263.
- 13) Roeber D, Achari A, Takai T, Okumura Y, Scott DL. Crystallization and preliminary X-ray analysis of Der f 2, a potent allergen derived from the house dust mite (*Dermatophagoides farinae*). *Acta Cryst* 2003; D59: 1046-1048.
- 14) Goto Y, Kondo T, Kuramoto N, Ide T, Yamamoto K, Inaoka K, Yasueda H. Mapping the gene encoding Cry j 1: a major *Cryptomeria japonica* pollen allergen. *Silvae Genetica* 2004; 52: 97-99.
- 15) Goto Y, Kondo T, Yasueda H. Inducing male flowering by applying gibberellic acid has no effect on the Cry j 1 content in *Cryptomeria japonica* pollen. *Silvae Genetica* 2004; 52: 139-142.
- 16) Goto Y, Kondo T, Hayashi E, Kuramoto N, Takahashi M, Yasueda H. Influences of genetic and environmental factors on the concentration of the allergen Cry j 1 in sugi (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Tree Physiol* 2004; 24: 409-414.
- 17) Goto Y, Kondo T, Ide T, Yasueda H, Kuramoto N, Yamamoto K. Cry j 1 isoforms derived from *Cryptomeria japonica* trees have different binding properties to monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1754-1761.
- 18) Tamura Y, Kawaguchi J, Serizawa N, Hirahara K, Shiraishi A, Nigi H, Taniguchi Y, Toda M, Inouye S, Takemori T, Sakaguchi M. Analysis of sequential IgE-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in humans, monkeys and mice. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 211-217.
- 19) Takahashi Y, Sakaguchi M, von-Pfaler M, el-Ghazaly G. Relationship between birch pollen count and different sizes of the pollen antigens in the air in Stockholm, Sweden. *Allergol Int*, 2003; 52: 111-114.
- 20) Ishida R, Mauda K, Sakaguchi M, Kurata K, Ohno K, Tsujimoto H. Antigen-specific histamine release in dogs with food hypersensitivity. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 435-438.
- 21) Takahashi-Omoe H, Omoe K, Sakaguchi M,

- Kameoka Y, Matsushita S, Inada T. Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 423-31.
- 22) Kurata K, Yasunaga S, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H. Immunological findings in 3 dogs with allergic rhinitis. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 25-29.
- 23) Maeda S, Ohmori K, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H: Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA. *J Vet Med Sci* 2004; 66, 337-339.
- 24) Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura I, Sakaguchi M, Yasueda H, 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* 2004; 34: 965-970.
- 25) Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Increase of CCR4-positive cells in the peripheral CD4+ cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1467-1473.
- 26) Masuda K, Sakaguchi M, Saito S, Yasueda H, Iwabuchi S, Tsukui T, Hayashi N, Kurata, K, Maeda S, Ohno K, Tsujimoto H. 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.
- 27) Kurata K, Iwata A, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H. Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences to induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 441-450.
- 28) Ohmori K, Sakaguchi M, Kaburagi Y, Maeda S, Masuda K, Ohno A, Tsujimoto H. A descriptive study of 85 dogs with suspected allergic reactions after vaccination in Japan. *Vet Rec* 2005; 156: 87-88.
- 29) Miyazawa H, Sakaguchi M, Yasueda H, Saito S, 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* 2005; 54: 159-166.
- 30) Ohmori K, Sakaguchi M, Maeda S, Masuda K, Ohno K, Kaburagi Y, Kurata K, DeBoer DJ, Tsujimoto H. IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic after vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104: 249-256.
- 31) Murasugi T, Nakagami Y, Yoshitomi T, Hirahara K, Yamashita M, Taniguchi Y, Sakaguchi M, 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* 2005; 510, 143-148.
- 32) Olsen D, Jiang J, Chang R, Duffy R, Sakaguchi M, Leigh S, Lundgard R, Ju J, Buschman F, Truong-Le V, Plarek J. Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin. *Protein Expr Purif* 2005; 40: 346-357.
- 33) Futamura N, Tani N, Tsumura Y, Mukai Y, Nakajima N, Sakaguchi M, Shinohara K. Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiol* 2006; 26: 51-62.
- 34) Takagi H, Saito S, Yang L et al. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnol J* 2005; 3: 521-533.
- 35) Maeda S, Tsukui T, Saze K, Masuda K, Ohno

- K, Tsujimoto H, 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* 2005; 103: 83-92.
- 36) Yasuda N, Tsukui T, Masuda K, Kawarai S, Ohmori K, Maeda S, Tsujimoto H. Cloning of cDNA encoding canine endothelin receptors and their expression in normal tissues. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 1075-1079.
- 37) 河本正次, 秋庸裕, 重田征子, 坪井信治, 勝谷隆, 林鷹治, 小埜和久. ダニアレルゲン--分子種構成, 分子多型, 並びに特異的免疫治療. *アレルギー科* 2005; 19: 549-556.
- 38) 河本正次, 秋庸裕, 小埜和久. プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの全容解明. *アレルギー・免疫* 2006; 13: 340-344.
- 39) 斎藤三郎. 新しい免疫療法—ペプチド療法・DNA ワクチン療法. *アレルギーの臨床* 2003; 23: 934-38.
- 40) 斎藤三郎. 花粉症に対する免疫療法. *医学のあゆみ* 2003; 206: 926-27.
- Organization Congress 2005.6.26, Munich, Germany.
- 4) Goto-Fukuda Y, Kondo T, Yasueda H, Ide T, Kuramoto N. Genetic variation of Cry j 1 concentration and isoforms in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*, Taxodiaceae). XIth International Parynological Congress 2004.7.4, Granada, Spain.
- 5) Sakaguchi M, Ohmori K, Maeda S, Masuda K, Ohno K, Kaburagi Y, Kurata K, DeBoer DJ, Tsujimoto H. Identification of allergens of vaccine components that induced immediate-type allergic reactions after vaccination in dogs. 61th American Academy of Allergy, Asthma Immunology 2005.3.20, San Antonio, USA.
- 6) 小埜和久. ダニアレルゲンの免疫生物学的解析. シンポジウム 2: アレルゲンの分子生物学的解析 第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11, 横浜.
- 7) 磯部敏秀, 秋庸裕, 石川信吾, 河本正次, 重田征子, 小埜和久. ダニ *Dermatophagoides farinae* におけるアレルゲノーム解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会 2005.3, 札幌.
- 8) 磯部敏秀, 秋庸裕, 石川信吾, 河本正次, 重田征子, 泉俊輔, 麻奥良子, 林鷹治, 巖原美穂, 小埜和久. ダニ *Dermatophagoides farinae* におけるアレルゲノーム解析. 第 17 回日本アレルギー学会春期臨床大会 2005.6, 岡山.
- 9) 高井敏朗. ダニ抗原の抗原性と変異体を用いた治療戦略. シンポジウム: アレルギーの解明と制御を目指して—遺伝子から機能分子・生体まで. 日本薬学会第 126 年会 2006.3, 仙台.
- 10) 太田幹子, 高井敏朗, 加藤武, 安枝浩, 久原孝俊, 武田健, 奥村康, 小川秀興. 組換えダニ主要アレルゲンのヒト CD23, CD25 及び α 1-antitrypsin の切断活性とマウスでの IgE 誘導活性. 日本薬学会第 126 年会 2006.3, 仙台.
- 11) 加藤武, 高井敏朗, 藤村務, 松岡裕之, 西岡夕子, 村山季美枝, 石井明, 奥村康, 小川秀興. ダニアレルゲンのプロテアーゼ活性によるケラチノサイトの活性化. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 2005.5 横浜.

2. 学会発表

- 1) Ohshita M, Ono K et al. Decrease in the antigenicity of Japanese cedar pollen allergen by the treatment with positive and negative ions. World Allergy Organization Congress- XVIII ICACI 2003.9.7-12, Vancouver, Canada.
- 2) Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hide M, Ono K. A newly identified class IV chitinase allergen from Japanese cedar pollen shows IgE crossreactivity with latex C-serum. The XIXth World Allergy Organization Congress 2005.6.26, Munich, Germany.
- 3) Kawamoto S, Baba K, Nakamura N, Tange T, Aki T, Shigeta S, Ono K. Identification of a novel house dust mite allergen that induces Th2 cell polarization. The XIXth World Allergy

- 12) 高井敏朗, 加藤武, 光石幸市, 畠中秀樹, 奥村康, 小川秀興. シスタチン A 結合は組換ダニ主要グループ 1 アレルゲンのアレルゲン活性を修飾する. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.10 盛岡.
- 13) 高井敏朗, 加藤武, 太田幹子, 安枝浩, 久原孝俊, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲンのヒト CD23, CD25 及び $\alpha 1$ -antitrypsin の切断活性とマウスでの IgE 誘導活性. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.10 盛岡.
- 14) 加藤武, 高井敏朗, 藤村務, 松岡裕之, 西岡夕子, 村山季美枝, 石井明, 奥村康, 小川秀興. ダニアレルゲンのプロテアーゼ活性によるケラチノサイトの活性化. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.10 盛岡.
- 15) 加藤耕一, 隅本尚志, 長棟輝行, 高井敏朗. アレルギー診断のためのマイクロ流路内での好塩基球株細胞内 Ca 変化のイメージ. 日本化学工学会第 37 回秋季大会 2005.9 岡山.
- 16) 西岡夕子, 高井敏朗, 加藤武, 久原孝俊, 太田幹子, 戸倉智子, 光石幸市, 奥村康, 小川秀興, 池田志幸. 組換えダニアレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性及び高次構造変化による IgE 産生能の変化. 日本研究皮膚科学会第 30 回年次学術大会・総会 2005.4 横浜.
- 17) 太田幹子, 高井敏朗, 加藤武, 久原孝俊, 武田健, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性に依存した IgE 産生と IgE 誘導能を欠く変異体の作製: 新機軸アレルゲンワクチンの提案. 日本薬学会第 125 年会 2005.3 有明・台場.
- 18) 高井敏朗, 太田幹子, 加藤武, 安枝浩, 久原孝俊, 武田健, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性に依存した IgE 産生と, IgE 誘導能を欠く変異体の作製: 新機軸アレルゲンワクチンの提案. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 2004.12 札幌.
- 19) 西岡夕子, 高井敏朗, 加藤武, 久原孝俊, 太田幹子, 戸倉智子, 光石幸市, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性に依存した in vivo IgE 誘導活性. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 2004.12 札幌.
- 20) 加藤武, 高井敏朗, 光石幸市, 奥村康, 小川秀興. 皮膚由来シスタチン A はダニ主要アレルゲン Der f 1 及び Der p 1 のプロテアーゼ活性を阻害し, ケラチノサイトの活性化を抑制する. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 2004.12 札幌.
- 21) 高井敏朗. シンポジウム 2: アレルゲンの分子生物学的解析. 組換体を用いたダニ主要アレルゲンの解析: アレルギー発症との関連と, 治療への新しいアプローチ. 第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11, 横浜.
- 22) 高井敏朗, 太田幹子, 加藤武, 安枝浩, 久原孝俊, 武田健, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性に依存した IgE 産生と, IgE 誘導能を欠く変異体の作製: 新機軸アレルゲンワクチンの提案. 第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11, 横浜.
- 23) 西岡夕子, 高井敏朗, 加藤武, 久原孝俊, 太田幹子, 戸倉智子, 光石幸市, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性及び高次構造変化が, in vivo での IgE 産生へ及ぼす影響. 第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11, 横浜.
- 24) 加藤武, 高井敏朗, 光石幸市, 奥村康, 小川秀興. ダニ主要アレルゲン Der p 1 及び Der f 1 のプロテアーゼ活性を消去する皮膚由来インヒビターの探索及び同定. 第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11, 横浜.
- 25) 西岡夕子, 高井敏朗, 加藤武, 中澤卓也, 光石幸市, 奥村康, 小川秀興. 部位特異的変異体を利用したダニ主要アレルゲン Der f 1 の IgE エピトープ解析. 日本研究皮膚科学会第 29 回年次学術大会・総会 2004.4, 京都.
- 26) 高井敏朗, 加藤武, 安枝浩, 奥村康, 小川秀興. 組換ダニ主要アレルゲン Der p 1, Der f 1 の成熟体およびプロ体の, アレルゲン活性および 2 次構造. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12, 福岡.
- 27) 光石幸市, 高井敏朗, 中村年伸, 小川秀興. ダニ抗原タンパク Der f 1 による表皮バリア機能の破壊作用について. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12, 福岡.

- 28) 坂田資尚, 有馬和彦, 高井敏朗, 増本清成, 出原賢治. IL-4/IL-13 による主要ダニ抗原 Der p 1 に対する防御機構第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12, 福岡.
- 29) 高井敏朗, 加藤武, 安枝浩, 奥村康, 小川秀興. 組換えダニ主要アレルゲン Der p 1, Der f 1 の成熟体およびプロ体の, アレルゲン活性および2次構造. 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.10, 岐阜.
- 30) 加藤武, 高井敏朗, 坂田資尚, 安枝浩, 出原賢治, 奥村康, 小川秀興. 組換えダニ主要アレルゲン Der p 1, Der f 1 のプロテアーゼ活性の解析. 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.10, 岐阜.
- 31) 中澤卓也, 高井敏朗, 畠中秀樹, 奥村康, 小川秀興. ダニ主要アレルゲン Der f 2 のプロリン残基多重変異体の解析. 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.10, 岐阜.
- 32) 有馬和彦, 坂田資尚, 増本清成, 出原賢治, 高井敏朗. プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター相互作用を基盤としたアレルギー疾患治療戦略. シンポジウム 7 : アレルギー炎症の分子医学. 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003.5, 横浜.
- 33) 後藤陽子, 近藤禎二, 井手武, 山本恵三, 倉本哲嗣, 安枝浩. Cry j 1 アイソフォームに関連する CAPS マーカー. 日本花粉学会第 45 回大会. 2004.11, 熊本.
- 34) 高橋裕一, 安部悦子, 伊藤健, 大橋武, 邊見真子, 武田久子, 安枝浩, 阪口雅弘, 名古屋隆生. 空中スギ及びイネ科花粉アレルゲンのインターネットによる情報提供と今後の課題. 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.10, 岐阜.
- 35) 宮沢博, 藤田真衣, 梅宮梨可, 阪口雅弘, 大砂博之, 池澤善郎, 堀久枝 : 大正エビ第 2 アレルゲンと各種魚介類との交差反応性の検討. 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.10, 岐阜.
- 36) 蕪木由起子, 戸田雅子, 竹森利忠, 安枝浩, 阪口雅弘. CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲンによるスギ花粉特異的 IgE 抗体の抑制. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12, 福岡.
- 37) 藤村孝志, 小埜和久, 阪口雅弘. スギ花粉アレルゲンの現在. シンポジウム 2 : アレルゲンの分子生物学的解析第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11, 横浜.
- 38) 宮沢博, 堤明恵, 西澤智恵, 阪口雅弘, 大砂博之, 池澤善郎, 堀久枝. エビ第 2 アレルゲン (arginine kinase) の抗原性はエビ科間で異なる. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2005.6, 岡山.
- 39) 宮沢博, 西澤智恵, 堤明恵, 阪口雅弘, 大砂博之, 池澤善郎 : クルマエビの第 3 アレルゲン (Pen j 3) の同定と免疫学的特性の検討. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.10.20, 盛岡.
- 40) 斎藤三郎, 秋山暢丈, 高木英典, 高岩文雄. 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. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.10.20, 盛岡.

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 小埜和久, 大西伸和, 藤村孝志, 河本正次, 重田征子, 秋庸裕, 島田弥生. スギ花粉由来の新規アレルゲン. 特願 2003-297444.
- 2) 小埜和久, 重田征子, 秋庸裕, 河本正次, 島田弥生, 力丸智史, 平川雄三, 大磯勲. スギ花粉由来の新規アレルゲン. 特願 2005-36507.
- 3) 小埜和久, 重田征子, 秋庸裕, 河本正次, 島田弥生, 力丸智史, 大西伸和, 大磯勲. スギ花粉由来の新規アレルゲン. 特願 2005-201947.
- 4) 高井敏朗 他. ダニグループ 1 アレルゲンの改変体. 特願 2004-192972.

2. 実用新案登録

なし

スギ花粉主要アレルゲンのアイソフォームの解析

分担研究者 安枝 浩 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

研究要旨

スギ精英樹から、特定の抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (mAb) との反応性を欠失した Cry j 1 のアイソフォームを 2 種類見いだした。352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換している 352His と、55 番目のアミノ酸が Pro から Leu に置換している 55Leu である。両者はいずれも特定の mAb との反応性は欠失していたが、ヒト IgE 抗体に対しては一般型 Cry j 1 と同じように反応した。352His は精英樹 94 個体における対立遺伝子頻度が 18.6% であり、自然界に存在する Cry j 1 のおよそ 20% を占めていると推定された。現行のスギ花粉アレルゲン標準化における力価測定用 ELISA では、このアイソフォームと反応しない mAb を用いるため、アレルゲン標準品、アレルゲンエキス中のこのアイソフォームの存在割合によって力価の測定値に誤差が生じる。この問題を解決するために、アイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価測定用 ELISA を新たに組み立てた。

研究協力者

福田陽子（独）林木育種センター）

齋藤明美, 石井豊太（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

A. 研究目的

スギ精英樹（木材としての優れた特性を持ち、造林事業における種苗生産のために、育成、継代されている品種）を対象として、スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォームを探索し、その構造、機能の解析を実施する。これまでに Cry j 1 に対する特定のモノクローナル抗体 (mAb) との反応性を欠失した 2 種類のアイソフォームを見だし、これらのアイソフォームの遺伝子レベル、タンパク質レベルにおける構造解析と免疫化学的性質の解析を実施した。さらに、N 末端から 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換したアイソフォーム (352His) の存在が現行のスギ花粉アレルゲン標準化法における力価測定に影響を及ぼすことが明らかになったため、その影響を排除すべくこのアイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価測定用 ELISA の系を構築した。

B. 研究方法

林野庁関東育種区で継代されているスギ精英樹 96 個体の花粉を用いた。以前に作製した 2 種類の mAb (J1B01 と J1B07)、ウサギポリクローナル抗体 (pAb) に対する精英樹花粉抽出液中 Cry j 1 の反応性を ELISA で調べた。

特定のモノクローナル抗体に対する反応性を欠失している精英樹花粉から Cry j 1 cDNA をクローニングして、抗体との反応性の相違に関与するアミノ酸置換を特定した。各精英樹におけるアミノ酸置換に関与する遺伝子多型は PCR-RFLP 法によって調べた。

Cry j 1 に対する mAb を新たに 36 種類作製し、エピトープマッピングによりグループ分けをした。各グループの代表的な mAb と精英樹 58 個体の花粉抽出液中 Cry j 1 との反応性を調べることでより新たなアイソフォームを探索した。

Cry j 1 アイソフォームの精製標品は、352His の場合はこのアイソフォームをホモで保有している精英樹花粉から既知の方法で精製、調製した。55 番目が Pro から Leu に置換した 55Leu は、これをホモで保有している個体が見いだせなかったため、ヘテロで保有する精英樹の花から Cry j 1 を精製し、55Leu と反応しない mAb (J1B07) で一般型 Cry j 1 を徹底的に吸収、除去すること

により調製した。

Cry j 1 アイソフォームに対する IgE 抗体の測定は paper disk を固相とする RAST 法で, ELISA inhibition test はマイクロプレートウェルを固相とする方法で, ヒスタミン遊離は, 同意を得たスギ花粉症患者の末梢血洗浄白血球を用いる方法で実施した。

各種スギ花粉抽出液中, 市販スギ花粉アレルゲンエキス中の Cry j 1 含有量の測定は, 2 種類の mAb を組み合わせた sandwich ELISA, ウサギ pAb を用いた sandwich ELISA で行った。「スギ花粉エキス標準品」は日本アレルギー学会から, 市販の「標準化アレルゲン治療エキス」の 6 ロットは鳥居薬品 (株) から提供を受けた。

標準化に用いる sandwich ELISA は, さまざまな mAb 同士を組み合わせた系やいくつかの mAb をブレンドした系について, 各種スギ花粉抽出液との反応性の検討を行い, その中から力価測定用として適切なものを選択した。

C. 研究結果

2 種類の mAb (J1B01 と J1B07) を組み合わせた sandwich ELISA において, 反応性が低下している精英樹 2 個体, および反応性の低下が見られない精英樹 1 個体, 合計 3 個体の花粉から Cry j 1 cDNA のクローニングを行った。その結果, J1B01 と反応しないアイソフォーム, J1B07 と反応しないアイソフォームの 2 種類の新規 Cry j 1 アイソフォームが同定された。J1B01 と反応しないアイソフォームは N 末端から 55 番目のアミノ酸が Pro から Leu に置換し(55Leu), J1B07 と反応しないアイソフォームは 352 番目のアミノ酸が Arg から His に置換していた(352His)。55 番目と 352 番目のアミノ酸置換に関与する各精英樹の遺伝子多型を PCR-RFLP で調べた。精英樹 94 個体における対立遺伝子頻度は表 1 のとおりであった。また, 352 番目のアミノ酸が His のホモである個体, すなわち花粉中 Cry j 1 が J1B07 と全く反応しない個体は 94 個体中 4 個体見いだされたが, 55 番目のアミノ酸が Leu のホモである個体は 1 例も見いだされなかった。

表 1 mAb に対する反応性と精英樹 94 個体における対立遺伝子頻度

アイソフォーム	mAb に対する反応性		対立遺伝子頻度 (%)
	J1B01	J1B07	
352His	+	-	18.6
55Leu	-	+	3.7

352His, 55Leu 以外の新規アイソフォームを探索するために, 新たに 36 種類の mAb を作製した。エピトープマッピングの結果, これらの mAb は認識するエピトープの違いにより 6 グループに大別されたので, 各グループの代表的な mAb と従来の mAb 2 種 (J1B01, J1B07) の合計 8 種類の mAb を用いて, 精英樹 58 個体の花粉抽出液中 Cry j 1 の反応性を調べた。しかし, 特定の mAb との反応性を完全に欠失している精英樹, すなわち新たなアイソフォームをホモで保有している可能性のある精英樹は 58 個体の中からは見いだせなかった。反応性がおよそ半分に減弱している精英樹, すなわち特定の mAb と反応しないアイソフォームをヘテロで保有している可能性のある精英樹はいくつか見いだされたがその頻度は低かった。

2 種類のアイソフォーム 352His と 55Leu のヒト IgE 抗体に対する反応性を一般型の Cry j 1 と比較した。352His, 55Leu と一般型 Cry j 1 に対する抗体価はほぼ完全に一致していた。図 1 に, 一般型 Cry j 1 と 352His に対する患者血清中 IgE 抗体価の相関を示した。

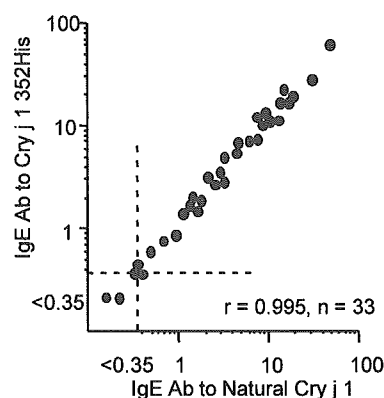


図 1 一般型 Cry j 1 と 352His に対する IgE 抗体価の相関。natural Cry j 1 はスギ林の複数の個体から採取した花粉由来の Cry j 1

同様に、患者末梢血白血球からのヒスタミン遊離試験における遊離曲線、および ELISA inhibition test における抑制曲線は完全に一致しており (図 2)、これらのアイソフォームと一般型 Cry j 1 との間で IgE 抗体に対する反応性に違いは見いだせなかった。

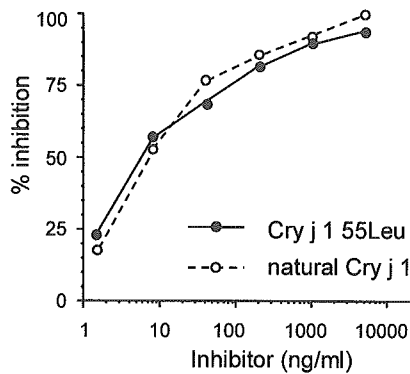


図 2 ELISA inhibition test で評価した Cry j 1 55Leu のヒト IgE 抗体に対する反応性

表 2 タンパク質レベルにおけるアイソフォーム 352His の割合

	ELISA (μg/ml)		352His (%)
	pAb/pAb	J1B07/J1B01	
精英樹花粉			
鬼泪7号 (R/R)	20.0	20.0	0
青森2号 (H/H)	6.9	< 0.5	> 93
秩父署3号 (R/H)	26.1	13.3	49.0
スギ林由来の花粉			
神奈川 (1977)	13.2	9.4	28.5
	15.3	12.9	15.7
福島 (1981)	12.5	12.6	- 0.8
	(1983)	21.2	19.2
兵庫 (2001)	15.0	9.9	33.9
アレルギーエキス			
日本アレルギー学会標準品	12.8	9.4	26.3
標準化スギ花粉エキス市販品 (鳥居薬品)			
SB5J	16.2	13.6	16.0
SB5K	18.4	15.8	14.1
SB5L 10,000 JAU/ml	17.2	14.4	16.3
SB5M	19.2	15.6	18.8
SB5T	10.2	8.0	21.6
SB5U	10.8	8.0	25.9
Hollister-Stier			
B4129671 1:20 (W/V)	16.5	< 0.5	> 97
HB87A9123	14.0	1.2	92.5

精英樹 94 個体における対立遺伝子頻度が 18.6 % と高く、自然界に存在する Cry j 1 のかなりの割合を占めると考えられる 352His のタンパク質レベルにおける存在割合は、352 番目が Arg ホモの精英樹 (鬼泪 7 号) 花粉抽出液をスタンダードにして、一次抗体とビオチン化二次抗体の両方にウサギポリクローナル抗体を用いる ELISA (pAb/pAb) と、どちらか一方の抗体に 352His と反応しない J1B07 を用いる ELISA (J1B07/J1B01, J1B07/pAb など) の測定値から見積もることができる。表 2 に示したように、His ホモの精英樹 (青森 2 号), Arg と His ヘテロの精英樹 (秩父署 3 号) における存在割合はほぼ期待値通りの値が得られた。異なった年度に異なった地域のスギ林から採集した花粉標品では 352His の存在割合は 0 % から 34 % の間に分布しており、自然界に存在する Cry j 1 の 20 % 前後はこのアイソフォームであると推定された。スギ花粉アレルギーエキスでは、日本アレルギー学会が選定した「スギ花粉エキス標準品」は 26 % の Cry j 1 が 352His であり、現在市販されている「標準化アレルギー治療エキス」の 6 ロットも標準品とほぼ同じレベルであったが、以前に市販されていた Hollister-Stier 社製のエキスでは 90 % 以上の Cry j 1 がこのアイソフォームで占められていた。

表 3 各種 ELISA で求めたアレルギーエキス中の Cry j 1 量

アレルギーエキス	ELISA (μg/ml)		
	pAb/pAb	B07/B01	(B07+B41)/B01*
日本アレルギー学会標準品	12.5	12.5	12.5
標準化スギ花粉エキス (鳥居薬品)			
SB5J	16.4	17.4	17.1
SB5K 10,000 JAU/ml	17.8	20.6	19.0
SB5L	16.5	21.7	19.9
SB5U	11.8	12.1	11.9
Hollister-Stier			
B4129671 1:20 (W/V)	13.6	< 0.5	13.0
HB87A9123	17.6	2.3	15.6
精英樹花粉			
青森 2 号	6.9	< 0.5	6.6

* : 一次抗体に J1B07 と J1B47 の 1:1 混合物を使用

現行のスギ花粉アレルギー標準化法では、J1B07/J1B01 を用いる ELISA で、日本アレルギー学会標準品をスタンダードとして用いて測定し