

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。表 2 に示したように、標準品や各種エキス中の 352His の存在割合はさまざまである。このために、現行の ELISA では Cry j 1 含有量の測定値に誤差を生じる。すなわち、352His の割合が標準品のそれよりも低いものでは、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(表 3)。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。J1B01 と新規の mAb を組み合わせた系、新規 mAb 同士を組み合わせた系、一次抗体、あるいは二次抗体に 2 種類の mAb をブレンドした系などについて検討した結果、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(表 3)。

D. 考察

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。352 番目のアミノ酸が His のホモである精英樹は 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これまでのところ見いだされていない。このアイソフォームの対立遺伝子頻度が 3.7% であることから、これをホモで保有している確率はおよそ 1,000 個体に 1 個体ということになる。

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。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が、特定の mAb に対する反応性が減弱している精英樹、すなわち新たなアイソフォームをヘテロで保有している可能性のあるものは、その頻度は低いもの

のいくつか見いだされた。これらについては、今後その Cry j 1 cDNA のクローニングを実施する予定である。

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スギ花粉アレルゲン標準化には影響を及ぼす可能性がある。現状では市販の「標準化アレルゲン治療エキス」のアイソフォームの存在割合が標準品のそれと大差がないため、力価設定に大きな問題は生じていないが、将来的に問題が生じる可能性を排除するためには、アイソフォームの影響を受けない ELISA の系を確立することが必要である。2 種類の mAb, J1B07 と J1B47 をブレンドしたものを一次抗体に用いる新しい ELISA はエキス中の 352His の存在割合にほとんど影響を受けない(表 2)。また、多種類の mAb を用いた今年度の検討から、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。

E. 結論

特定の mAb との反応性を欠失した Cry j 1 アイソフォームは、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。しかし、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 で用いられている mAb に反応しないため、標準化に影響を及ぼす可能性がある。その可能性を排除するために、アイソフォームの影響を受けない力価設定用 ELISA を構築した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

2. 学会発表

- 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.
- 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. 2004.11.20. 熊本.

スギ花粉症に対する新規ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 阪口 雅弘 独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
ワクチンデザイン研究チーム
研究協力者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

スギ花粉症は国民の10%以上が発症していると推定されており、根治的な治療法の開発が急務となっている。本研究においてはスギ花粉症の治療のために、3つの新規ワクチンの開発に関する研究を行った。1つはCpG-ODNをスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)に結合させたワクチン(CpG-Cry j 1)を作製し、マウスに接種し、スギ花粉症ワクチンとしての効果を検討した。2つ目としてCpG-ODNをスギ花粉アレルゲンT細胞エピトープ・ペプチドに結合させたワクチン(CpG-peptide)を作製し、マウスを用いてそのワクチンの有効性を検討した。3つ目として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Listeriolysin (LLO)との融合蛋白として発現する組換え乳酸菌ワクチンを作製した。

A. 研究目的

スギ花粉症は典型的な1型アレルギー疾患であり、国民の10%以上が発症していると考えられている。現在、根治的な治療法の開発が急務となっている。

1, CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン ワクチン (CpG-Cry j 1)

スギ花粉症患者の多くは、スギ花粉アレルゲン特異的 IgE 抗体の産生が認められている。アレルギーを抑制し、Th1 細胞の活性を誘導するアジュバントとして、細菌由来の DNA の CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) が注目されている。この CpG-ODN は、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞等に IL-12 等のサイトカイン産生の誘導作用を有し、Th1 優位の免疫反応を導く DNA として知られている。CpG-ODN の主要な Th1 応答を誘導する活性中心は、グアニンとシトシンを含む配列(CpG モチーフ)であることが報告されている。現在までに、CpG-ODN を用い、癌、アレルギー、感染症に対するワクチンアジュバントとして実用化が期待されている。本研究では、スギ花粉症に対する根治的な治療法の開発の基礎研究として、CpG-ODN をスギ花粉主要アレルゲン (Cry j 1) に結合させたワクチン

(CpG-Cry j 1)を作製し、マウスを用いてそのワクチンの有効性を検討した。

2, CpG-ODN 結合スギ花粉ペプチドワクチン (CpG-peptide)

上述の CpG-Cry j 1 ワクチンはスギ花粉アレルゲンに CpG DNA を結合させたが、Cry j 1 アレルゲンにおける T 細胞エピトープ・ペプチドに CpG-ODN を結合させたワクチン(CpG-peptide)を作製した。一般的にT細胞エピトープにはアレルゲン性がないため、減感作療法などで起こるアナフィラキシーなどの副反応が少ないと考えられている。この CpG-peptide ワクチンをマウスに投与し、そのワクチンの有効性を検討した。

3, スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌ワクチン

近年、乳酸菌のアレルギー抑制効果が示され、治療への応用が期待されている。これまでに、多くの疫学的な研究において腸内細菌叢における乳酸菌数とアレルギー性疾患の発症との関連性は示唆されてきた。たとえば、Bjorksten らは、エストニアとスウェーデンの2歳児の腸内細菌叢においては、アレルギーを持たない子供と比較して、アレルギー性疾患を有する子供で乳酸菌数が有意に少ないと報告している。また、*in vitro* における研究では、乳酸菌は Th1 サイトカインである IL-12 産生や樹状細胞の活性化

を誘導することが明らかにされてきた。このような乳酸菌の免疫刺激効果が注目され、粘膜ワクチンのベクターとして乳酸菌を応用するという研究が行われている。実際に、破傷風菌毒素タンパクや HIV タンパクなどを組み込んだリコンビナント乳酸菌などが作製され、抗原特異的な液性免疫や細胞性免疫を刺激出来ることが示されている。新規免疫療法の開発を目的として、Cry j 1 をコードする cDNA を組込んだ乳酸菌 (*Lactobacillus casei*) の作製を試みた。

B. 研究方法

1, CpG-ODN 結合スギ花粉アレルギーワクチン (CpG-Cry j 1)

BALB/c マウスにワクチンを 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。

2, CpG-ODN 結合スギ花粉ペプチドワクチン (CpG-peptide)

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。これらの血清は特異抗体価を測定するまで -70°C で保存した。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。

3, スギ花粉アレルギー遺伝子組換え乳酸菌ワクチン

ベクターとして、乳酸菌:*Lactobacillus casei* (ATCC393) を用いた。この株に対して 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 LL0 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。LL0 は、*Listeria monocytogenes* の菌体由来タンパクであり、LL0 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。LL0 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 LL0 を用いた。コントロールとして、LL0 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。

C. 研究結果

1, CpG-ODN 結合スギ花粉アレルギー ワクチン (CpG-Cry j 1)

ワクチン接種群では、Cry j 1-アラム投与を行ったが、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 (図 1)。最終ワクチン接種後 7 週目において、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。Cry j 1 特異的 IgG2a の産生においては、ワクチン接種群では、対照群に比べ、1 回目の Cry j 1-アラム投与後に、有意に産生誘導され、2 回目の Cry j 1-アラム投与後においても有意に産生誘導が維持された (図 2)。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 の産生が認められた (図 3)。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 (図 4)。

2, CpG-ODN 結合スギ花粉ペプチドワクチン (CpG-peptide)

CpG-peptide ワクチン接種群では、対照群 (ペプチドのみ、PBS) に比べ、Cry j 1-アラム投与後も Cry j 1 特異的 IgE の産生抑制傾向が見られた

(図5)。Cry j 1 特異的 IgG1 の産生については、ワクチン接種群と対照群では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、ワクチン接種群では、対照群に比べ、増加傾向が見られた(図6)。さらにマウスの脾臓中の CD4 陽性 T 細胞を Cry j 1 存在下で培養したときの細胞上清において、ワクチン群は対照群と比べ、高い Cry j 1 特異的 IFN- γ の産生が認められた(図7)。一方、Cry j 1 特異的 IL-4 の産生はワクチン群と対照群では差が認められなかった。

3, スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌ワクチン

Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ の産生を確認するためにウサギ抗 Cry j 1 血清を用いてウェスタンブロットを行ったがその発現を検出できなかったため、LL0 に対する抗体を用いた。抗 LL0 抗体を用いたウェスタンブロット法では、Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉-LL0 導入株(図8)で約60kDaのバンドを、LL0 導入株では約40kDaのバンドを検出した(図9)。この分子量の違いは Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ (20kDa) の分子量と一致することから、導入した Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ は発現していると予想される。また、LL0 から Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ にわたるシークエンスを増幅するようにデザインされたプライマーペアを用いた RT-PCR によって、Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ mRNA の発現も確認した(図10)。これらの結果は、この組み換え *L. casei* における Cry j 1₁₅₈₋₃₂₉ の発現を示している。このリコンビナント乳酸菌による IL-12 p70 誘導能を BALB/c マウスの脾臓細胞で検討した結果、LL0 の発現によって IL-12 の産生が増強されることが明らかとなった(図11)。

C. 考察

1, CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン ワクチン (CpG-Cry j 1)

CpG-Cry j 1 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、CpG-Cry j 1 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。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 CpG-Cry j 1 のワクチンを接種する治療的実験を行い、より実用化を目指した研究を行う予定である。

2, CpG-ODN 結合スギ花粉ペプチドワクチン (CpG-peptide)

Cry j 1 アレルゲンにおける T 細胞エピトープを含むペプチドは IgE との結合性がないため、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、ペプチドワクチンを使用した場合、短期間で効果が得られるのではないかと期待されている。さらに本研究ではこのペプチドワクチンをスギ花粉治療用ワクチンとして、より効果的にするためにアジュバントとして CpG をペプチドに結合させた。本研究において、このワクチンをマウスに投与し、その効果を検討した。ワクチン接種により Cry j 1 特異的 IgE の産生抑制や Cry j 1 特異的 IgG2a、IFN- γ の産生が誘導されたことから、ワクチン接種により 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。

3, スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌ワクチン

本研究においては、Cry j 1 を組込んだ組換え乳酸菌 (*L. casei*) の作製に成功した。組換え体蛋白を発現する乳酸菌の作製は、大腸菌におけるそれと比較して非常に困難であり、菌株や組み込む遺伝子の種類によってその発現は様々である。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 LL0 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。植物タンパクの発現に成功したという点においては、非常に画期的な結果であると思われる。

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したいと考えている。

E. 結論

1, CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン ワクチン (CpG-Cry j 1)

CpG-Cry j 1 をマウスに接種することにより、Th1 免疫反応誘導がみられた。本研究で用いたワクチンは、スギ花粉症の予防用ワクチンとし

て使用し、スギ花粉症における抗原特異的な免疫治療法としての有効性が示唆された。今後は、CpG-Cry j 1 を用いた治療用ワクチンの開発への応用も期待される。

2, CpG-ODN 結合スギ花粉ペプチドワクチン (CpG-peptide)

CpG 結合ペプチドワクチンの有効性が示唆された。今後、このワクチンの有効性の再現性の確認を行い、さらにワクチン接種ルートや接種量等を検討して行く予定である。

3, スギ花粉アレルゲン遺伝子組換え乳酸菌ワクチン

本研究においては、日本スギ花粉アレルゲンの主要抗原である Cry j 1 の一部を組み込んだ組換え乳酸菌の作製に成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Hirahara, K., Shiraiishi, A., Nigi, H., Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M.: Analysis of sequential IgE-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in humans, monkeys and mice. *Clinical Experimental Allergy* 33, 211-217, 2003.

2) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., von-Pfaler, M., and el-Ghazaly, G. : Relationship between birch pollen count and different sizes of the pollen antigens in the air in Stockholm, Sweden. *Allergology International*, 52, 111-114, 2003.

3) Ishida, R., Mauda, K., Sakaguchi, M., Kurata, K., Ohno, K., Tsujimoto, H.: Antigen-specific histamine release in dogs with food hypersensitivity. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65: 435-438, 2003.

4) Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada, T.: Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27: 47-55, 2004

5) Kurata, K., Yasunaga, S., Masuda, K., Sakaguchi,

M., Ohno, K., and Tsujimoto, H.: Immunological findings in 3 dogs with allergic rhinitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 25-29, 2004.

6) 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* 66, 337-339, 2004.

7) Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura JI, 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* 34, 965-970, 2004.

8) 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* 34, 1467-1473, 2004.

9) 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* 102, 45-52, 2004.

10) 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* 102, 441-450, 2004.

11) Ohmori, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, A. and Tsujimoto, H.: A descriptive study of 85 dogs with suspected allergic reactions after vaccination in Japan. *Veterinary Record* 156, 87-88, 2005

12) Miyazawa, H., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Saito, S., Tanaka, K., Nagata, K. and Inouye, S.: Non-IgE-, IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients. *Allergology International* 54, 159-166, 2005

- 13) Ohmori, K., Sakaguchi, M., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K., Kaburagi, Y., Kurata, K., DeBoer, D.J. and Tsujimoto, H.: IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic after vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 249-256,2005
- 14) Murasugi, T., Nakagami, Y., Yoshitomi, T., Hirahara, K., Yamashita, M., Tanuguchi Y., Sakaguchi, M. and Ito, K. : Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. *European Journal of Pharmacology*, 510,143-148,2005.
- 15) Olsen, D., Jiang, J., Chang, R., Duffy, R., Sakaguchi, M., Leigh, S., Lundgard, R., Ju, J., Buschman, F., Truong-Le, V., and Plarek, J.: Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin. *Protein Expression and Purification*, 40,346-357, 2005.
- 16) Futamura, N., Tani, N., Tsumura, Y., Mukai, Y., Nakajima, N., Sakaguchi, M. and Shinohara, K.: Characterization of genes for novel Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiology* 26, 51-62, 2006.

2.学会発表

- 1) 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（2003年10月23日,岐阜）
- 2) 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（2003年10月23日,岐阜）
- 3) 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（2003年12月9日,福岡）
- 4) 藤村孝志、小埜和久、阪口雅弘： スギ花粉アレルゲンの現在。第54回日本アレルギー学会（2004年11月4日,横浜）

- 5) Sakaguchi, M., Ohmori, K., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K., Kaburagi, Y., Kurata, K., DJ, DeBoer, 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, Mar 20, 2005, San Antonio, USA
- 6) 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大会（2005年6月2日、岡山）
- 7) 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年10月20日、盛岡）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

図 1 ワクチンによるCry j 1特異的IgE産生抑制

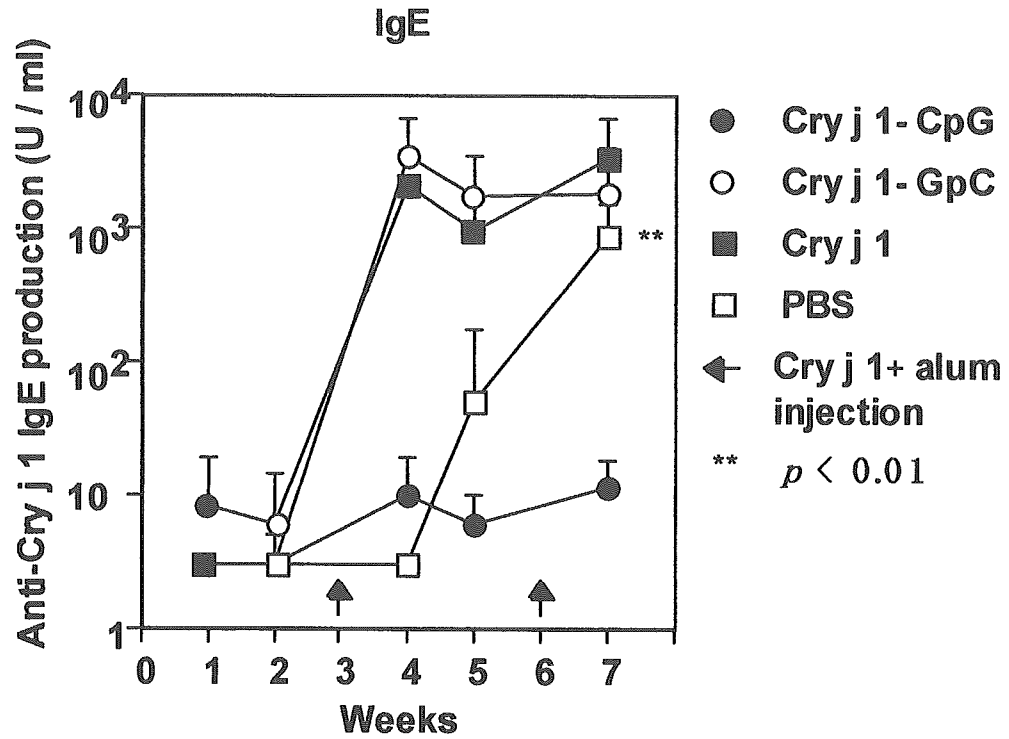


図 2 ワクチンによるCry j 1特異的IgG 2a産生抑制

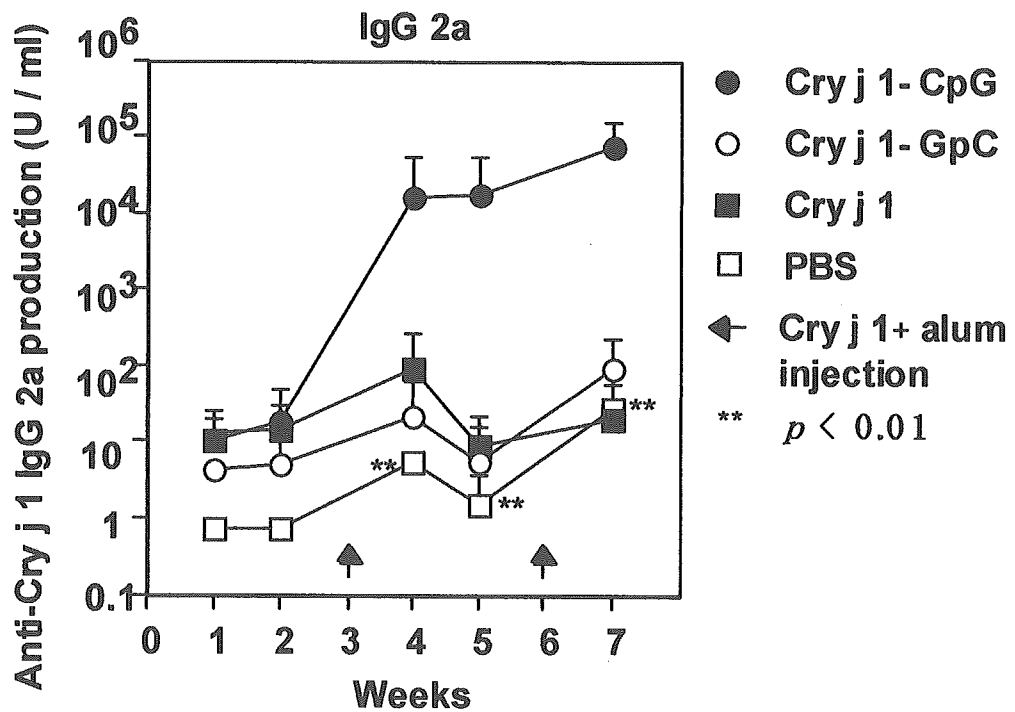


図3 ワクチンによるCry j 1特異的IFN- γ 産生誘導

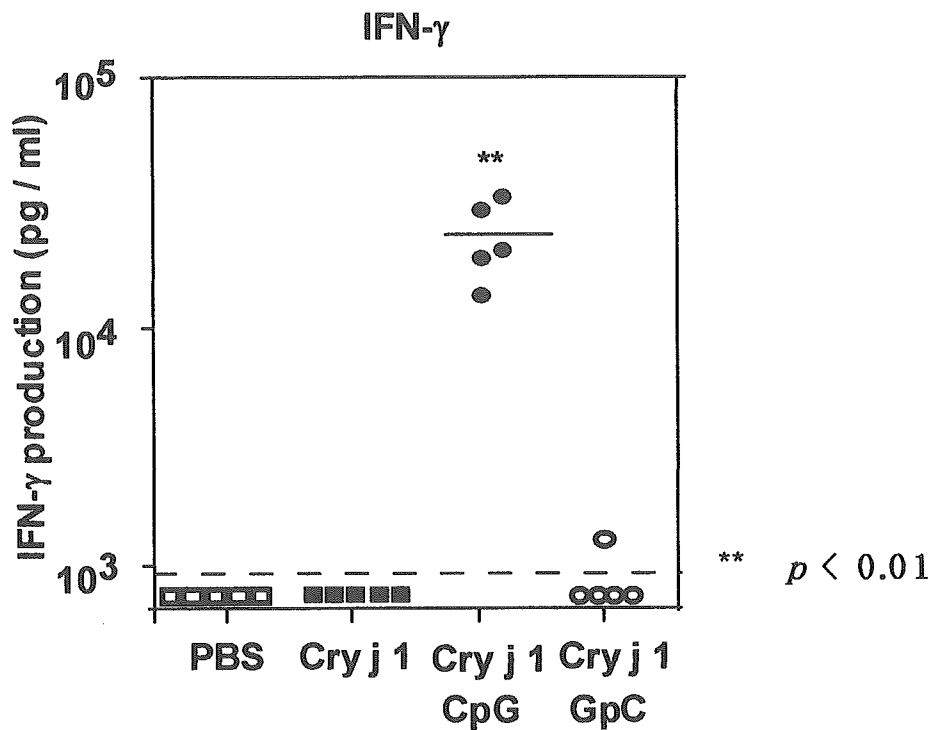
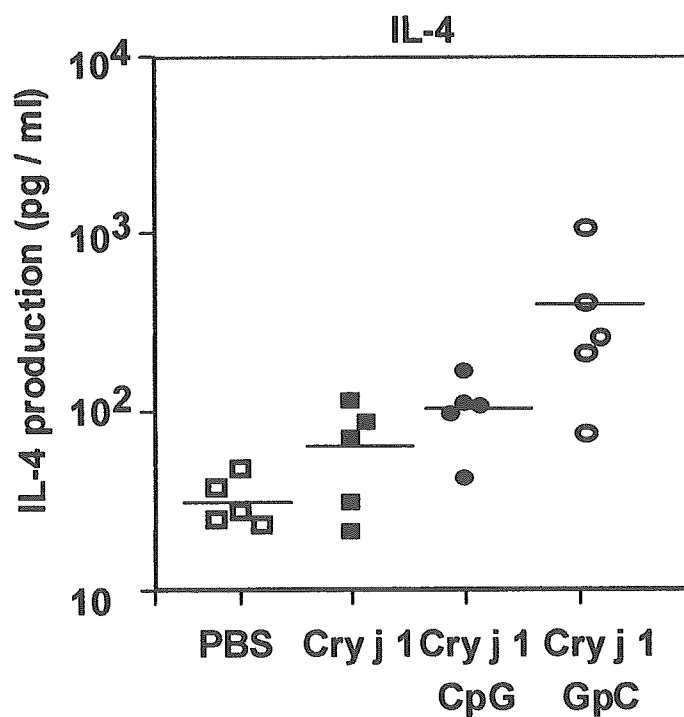


図4 ワクチンによるCry j 1特異的IL-4産生は、コントロール群と比べ違いがみられない



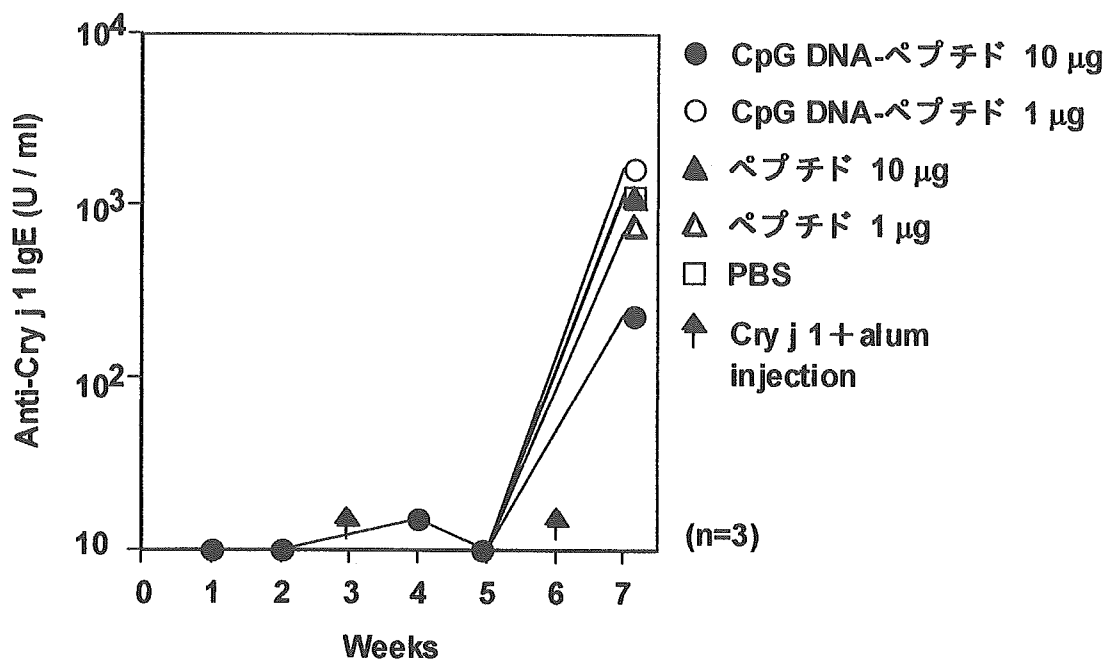


図5 ペプチドワクチン接種によるCry j 1特異的IgE産生の経時変化

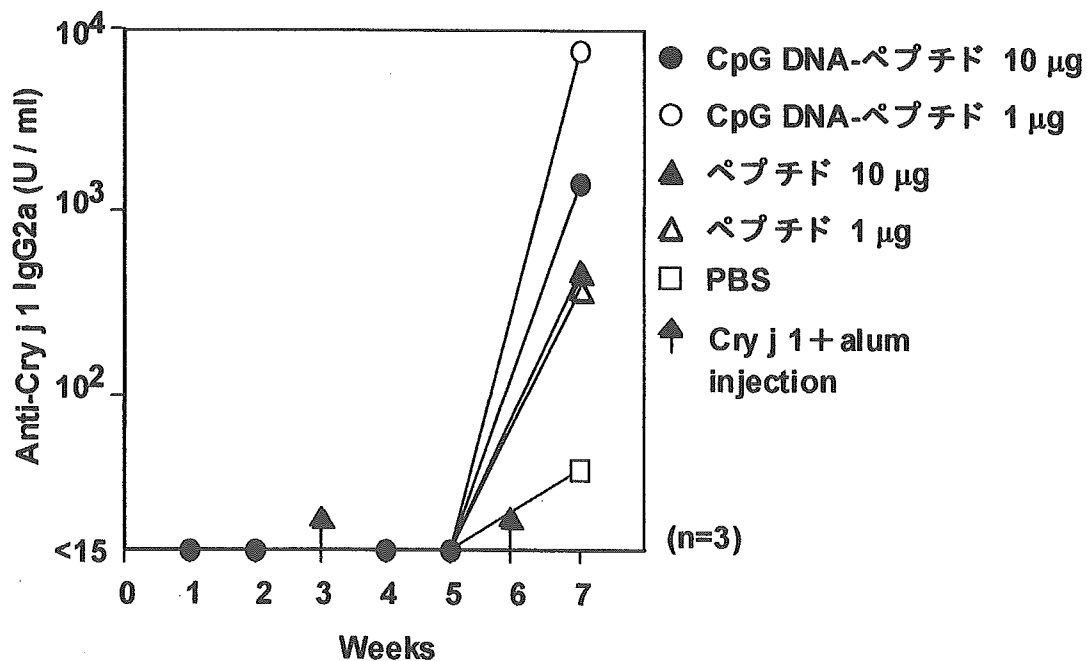


図6 ペプチドワクチン接種によるCry j 1特異的IgG2a産生の経時変化

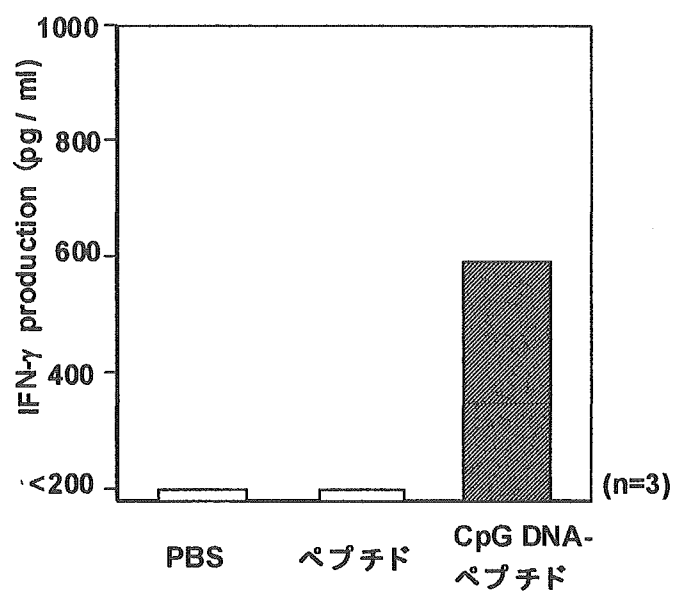


図7 ペプチドワクチン接種によるCryj1ペプチド 特異的IFN-γの産生

図8 LLO-Cry j 1導入プラスミドベクター

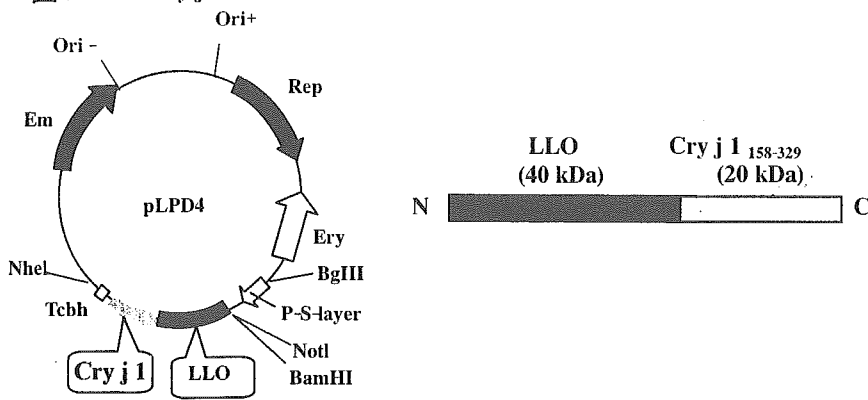


図9 LLO-Cry j 1タンパク発現の解析

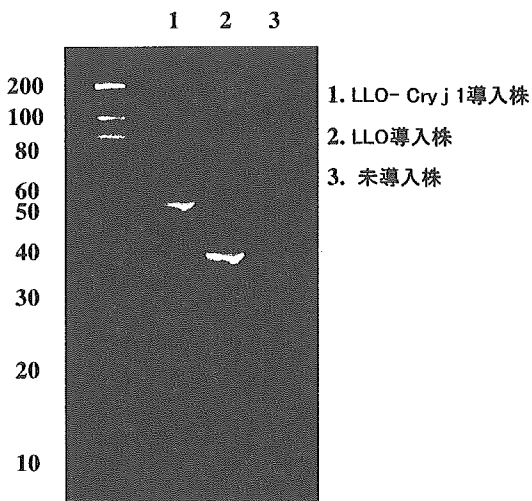


図10 LLO-Cry j 1 mRNAの発現解析

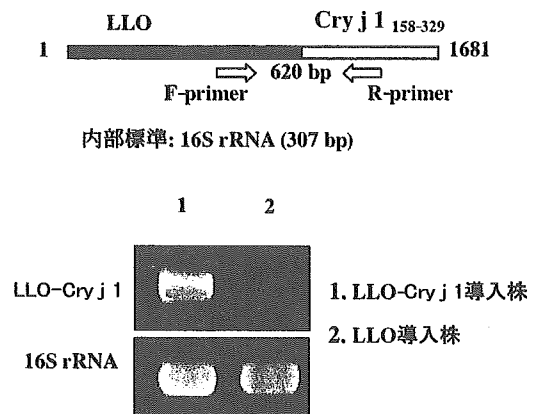
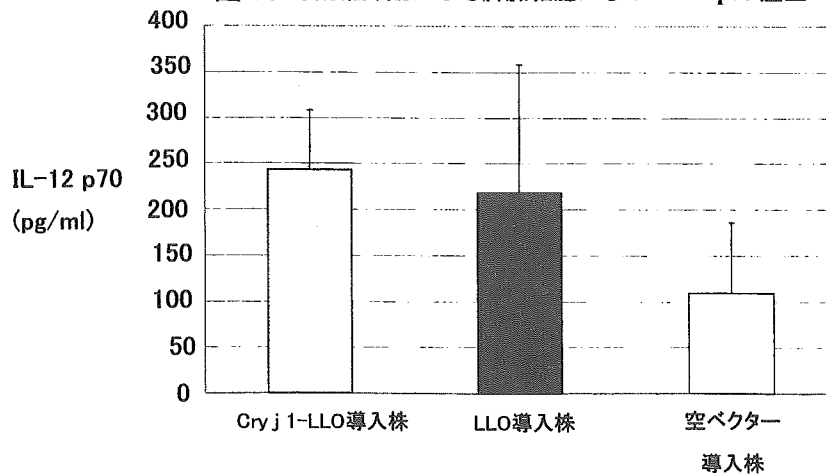


図11 乳酸菌刺激による脾臓細胞からのIL-12 p70産生



活性型組換ダニ主要アレルゲンの調製法確立、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

分担研究者 高井敏朗 順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター・講師

研究要旨

ダニ主要グループ1 (Der f 1 及び Der p 1) およびグループ2アレルゲン (Der f 2 及び Der p 2) の活性型組換体の調製法を確立した。これらの組換アレルゲンは分子サイズ、タンパク質2次構造、及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、組換体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。天然型アレルゲンと同等の構造・活性を保持したこれらの活性型組換アレルゲンは、診断および治療、さらに構造解析や疾患との関連解析においても有用性が高い。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ことがわかった。Der f 2 については3個のアミノ酸置換により全体構造を保ったままアレルギー患者血清 IgE への結合活性が減弱した変異体を得た。今後、これらの変異体がアレルゲンワクチンとしてアレルギーの予防および治療に有効であるかどうかを実験動物モデルで検証していく予定である。スギ花粉主要アレルゲンについても活性型組換体の調製法の検討を継続する。

A. 研究目的

天然型アレルゲンと同等の構造・活性を保持した「活性型」組換アレルゲンは、診断および治療、さらにアレルゲンの構造解析研究や疾患との関連解析研究においても有用性が高い。本研究では、主要アレルゲンの「活性型」組換体の調製法の確立を目指す。さらに、これらの組換体の分子レベルにおける免疫学的、生化学的、および物理化学的解析を行い、そこから得られた知見をもとに、有効性、安全性の高いアレルゲン改変体を設計して新たな診断薬、治療薬の開発をはかることを目的とする。

本研究は、以下の4つの部分に分けられる。

(1) 天然型と組換アレルゲンの構造およびアレルゲン活性の比較：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) について主として記述する。

(2) 天然型と組換アレルゲンの生化学的機能の比較：ダニ主要グループ1アレルゲンのシステインプロテアーゼ活性について解析した。

(3) 組換アレルゲンの生化学的機能と細胞・個体の相互作用：ダニ主要グループ1アレルゲンについて解析した。

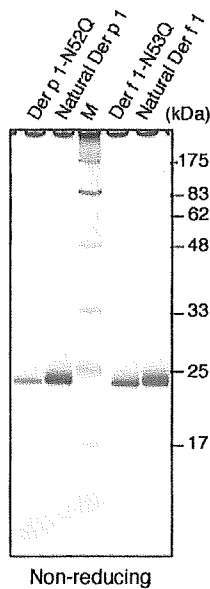
(4) 組換アレルゲン変異体の作製および解析：Der f 1 および Der f 2 の新規変異体を作製した。

以下、それぞれについて背景および研究の意義を説明する。

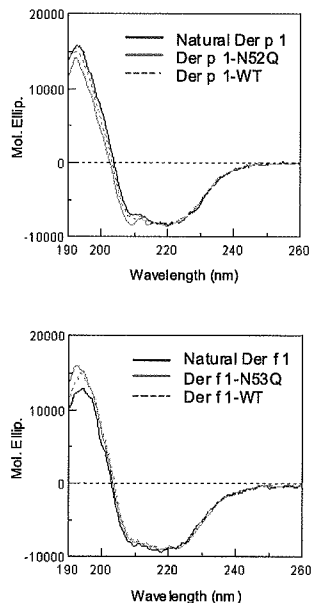
(1) 天然型と組換アレルゲンの構造およびアレルゲン活性の比較

組換アレルゲンのアレルゲン活性 (IgE 結合能やヒスタミン遊離活性などで評価できる) が天然型と同一であれば、アレルギーの診断および治療において天然型の代替として用いることが将来可能にな

A. SDS-PAGE



B. CDスペクトル (タンパク質 2 次構造の比較)



C. 末梢血好塩基球からの ヒスタミン遊離試験 (アレルゲン活性の比較)

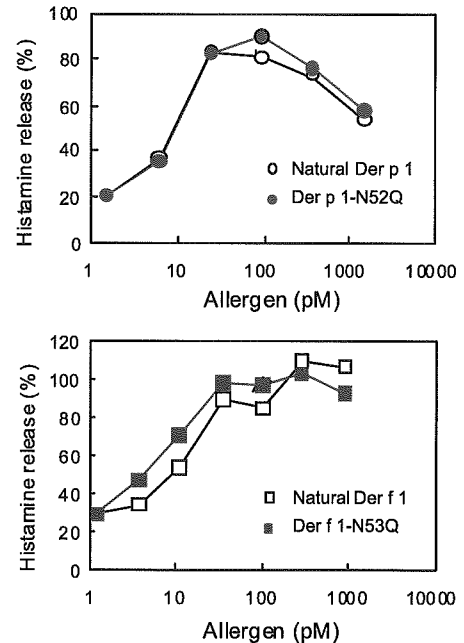


図 1. 組換え型 Der p 1 および Der f 1 の 2 次構造およびアレルゲン活性. 成熟体の N 型糖鎖付加モチーフを破壊した組換え型 Der p 1 および Der f 1 (Der p 1-N52Q および Der f 1-N53Q) は天然型と同等の分子サイズ (A)、タンパク質 2 次構造 (B)、およびアレルゲン活性 (C) を有する. アレルゲン活性は、複数の血清を用いた IgE 結合試験、競合阻害試験、および複数ボランティアの末梢血を用いたヒスタミン遊離試験によっても確認している (発表論文 1 参照). Natural : ダニ培養物より精製. WT: Asn52 および Asn53 が酵母によって過剰な糖鎖修飾を受けた組換え型.

るであろう。ダニ培養物や花粉抽出液から目的アレルゲンのみの分離精製を行う場合には一般に煩雑な精製プロセスが必要であり、しかもアレルゲン原因生物に由来する他のアレルゲンやアレルゲン以外の分子種の混入の可能性がある。組換えアレルゲンを使用することの利点のひとつは、単一のアレルゲンタンパク質標品を均一かつ高純度で大量調製することが可能になることである。調製を試みた組換え主要アレルゲンが構造およびアレルゲン活性を保持しているかどうかを調べる。

(2) ダニ主要グループ 1 アレルゲン組換え体のプロテアーゼ活性

組換え体が構造およびアレルゲン活性を保持していた主要アレルゲンのうち、ダニ主要グループ 1 ア

レルゲンの生化学的機能はシステインプロテアーゼであることが判明している。実際にダニ主要グループ 1 アレルゲン組換え体がヒトタンパク質基質に対して分解活性を示すかを検証した。この解析により、組換えアレルゲンの品質がどの程度高いレベルに保持されているかを検証するとともに、本組換え体がアレルゲンの生化学的機能と疾患との関連解析研究においても有用かどうかを評価する。

(3) ダニ主要グループ 1 アレルゲン組換え体のプロテアーゼ活性と細胞・生体の相互作用

ダニ主要グループ 1 アレルゲンのプロテアーゼ活性は種々の細胞を刺激することが報告されている。組換え体が細胞刺激活性を有するかどうかを、これまでよく調べられていなかったクラチノサイト

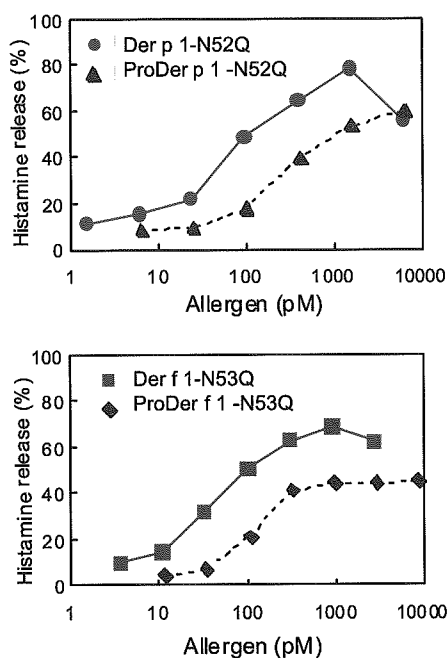


図2. 組換え型 Der p 1 および Der f 1 のプロ体のアレルギー活性は成熟体よりも低い(D). アレルギー活性は、複数の血清を用いた IgE 結合競合阻害試験および複数ボランティアの末梢血を用いたヒスタミン遊離試験によっても確認している(発表論文1参照). Der p 1-N52Q および Der f 1-N53Q: 成熟体の N 型糖鎖付加モチーフを破壊した組換え型. Pro: プロ配列が付加した組換え型.

を用いて検証した。さらに、マウスを組換え体で免疫して IgE 産生を誘導する実験系を用いて、ダニ主要グループ 1 アレルゲンのプロテアーゼ活性が抗原性賦与に果たす役割を調べた。この解析により、ダニ主要グループ 1 アレルゲンのプロテアーゼ活性を修飾することによるワクチン設計がどのような効果をもたらすのか情報を得る。

(4) 組換えアレルゲン変異体の作製および解析

遺伝子工学的手法により修飾した組換えアレルゲンの変異体を調製し、アレルゲンワクチンとして望ましい性質を有するかどうかを評価する。具体的には、IgE 誘導活性の低減を目的とした Der f 1 のプロテアーゼ活性中心の変異体の作製、および構造を保持したままアレルゲン活性を低減することを目的とした Der f 2 の変異体の作製を行った。

B. 研究方法

組換え型 Der f 1 および Der p 1

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

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

安枝らの方法 (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。一部の試験では市販の天然型 Der f 1 および Der p 1 を用いた。

アレルゲン活性

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アレルゲン活性を解析した。

2次構造

CD スペクトル測定により 2次構造を解析した。

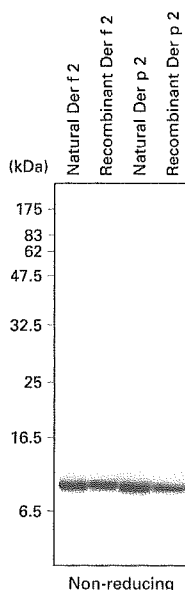
立体構造予測

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、Der f 1 のプロ体の立体構造予測を行った。

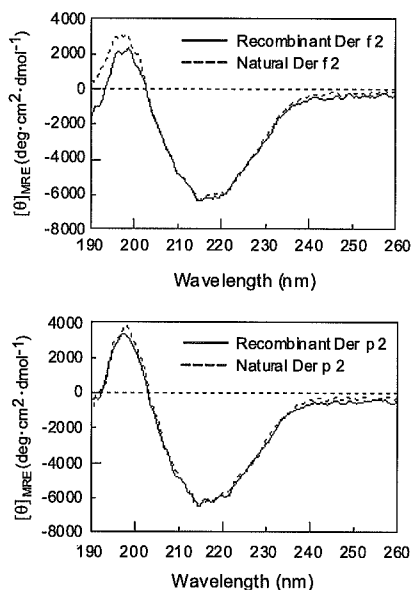
プロテアーゼ活性

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

A. SDS-PAGE



B. CDスペクトル (タンパク質2次構造の比較)



C. 末梢血好塩基球からの ヒスタミン遊離試験 (アレルゲン活性の比較)

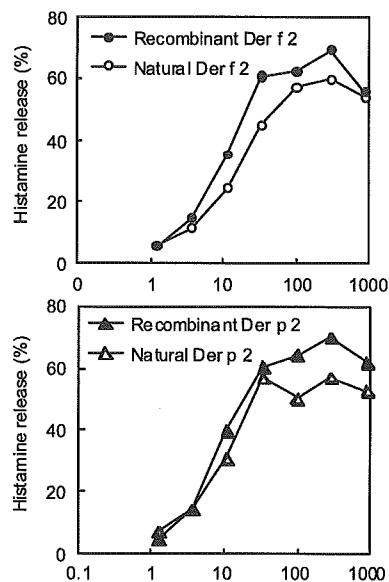


図3. 組換え型 Der f 2 および Der p 2 の2次構造およびアレルゲン活性. 組換え型 Der f 2 および Der p 2 (Der p 1-N52Q および Der f 1-N53Q) は天然型と同等の分子サイズ(A)、タンパク質2次構造(B)、およびアレルゲン活性(C)を有する。アレルゲン活性は、複数ボランティアの末梢血を用いたヒスタミン遊離試験によっても確認している(発表論文3参照)。Natural: ダニ培養物より精製。Recombinant: 組換え型。

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タンパク質切断

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た。ヒトα1-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活性化

ヒトケラチノサイト培養上清中のIL-8産生を測定した。

マウス免疫

アラムと共に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。

倫理面への配慮

インフォームドコンセントを得た上で、ボランティアより末梢血を採血し、ヒスタミン遊離試験およびIgE結合試験に用いる血液あるいは血清を得た。また、倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから、問題がないと判断された。

動物実験は動物実験施設指針に則り実験を行った。

C. 研究結果

(1) 天然型と組換えアレルゲンの構造およびアレルゲン活性の比較

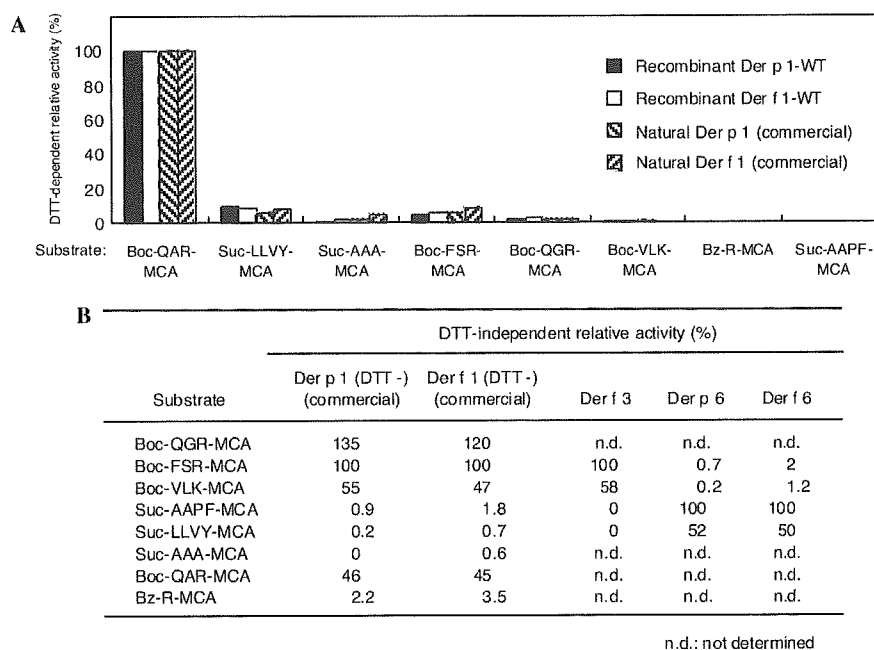


図4. 組換え型 Der p 1 および Der f 1 と市販の天然型 Der p 1 および Der f 1 のプロテアーゼ活性の基質特異性. A: 組換え型 Der p 1 および Der f 1 と市販の天然型のシステインプロテアーゼ活性の基質特異性の比較. DTT 存在下反応時の蛍光強度から DTT 非存在下反応時の蛍光強度を差し引くことにより、DTT 依存的プロテアーゼ活性による蛍光強度を算出した. Boc-QAR-MCA を基質としたときの DTT 依存的プロテアーゼ活性による蛍光強度を100%とし、これに対する各基質使用時の市販の天然型 DTT 依存的プロテアーゼ活性による蛍光強度の百分率を表示した. B: 市販の天然型 Der p 1 および Der f 1 の一部のロットに検出されるセリンプロテアーゼ活性の基質特異性. 市販の天然型 Der p 1 および Der f 1、および天然型 Der f 3 については Boc-FSR-MCA を基質としたときの DTT 非依存的プロテアーゼ活性による蛍光強度を100%とした. 天然型 Der p 6、および Der f 6 については Boc-AAPF-MCA を基質としたときの蛍光強度を100%とした. 天然型 Der f 3、Der p 6、および Der f 6 の基質特異性は安枝ら (Clin Exp Allergy, 1993) が報告した数値を引用した.

組換え型 Der f 1 および Der p 1 の成熟体の2次構造は天然型と一致した (図1AB)。アレルゲン活性は患者血清や血液提供ボランティアによって天然型よりも高いあるいは低いケースがあったが全体としては同等であった (図1C)。プロ体は、組換え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 (図2)。ホモロジーモデリング法によって Der f 1 のプロ体の予測立体構造モデルを作製した。このモデルにおいて、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。

組換え型 Der p 2 および Der f 2 の2次構造は天然型と一致し、同等のヒスタミン遊離活性を示し

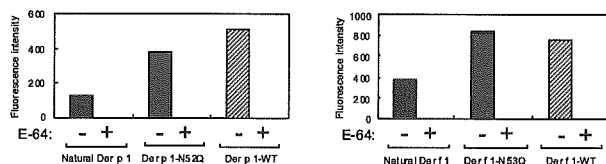
た (図3)。

(2) ダニ主要グループ1アレルゲン組換え体のプロテアーゼ活性

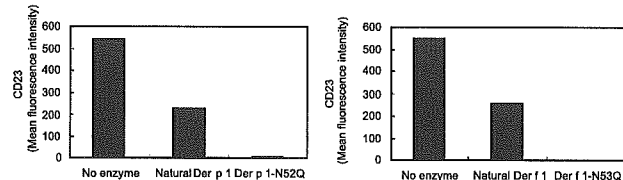
Der f 1 および Der p 1 のプロテアーゼ活性は、組換え型と天然型とで同様の基質特異性 (図4A) が確認されたが、組換え型の方が高活性であった (図5ABC)。組換え型 Der f 1 および Der p 1 はヒト CD23、CD25 および α 1-antitrypsin を切断した (図5BCD)。

市販の天然型標品の一部のロットにはセリンプロテアーゼ活性が検出されたが (図4B)、組換え型および安枝らの方法により高純度に精製した天然型にはシステインプロテアーゼ活性のみが検出された (図5A)。市販品に検出されたセリンプロテアー

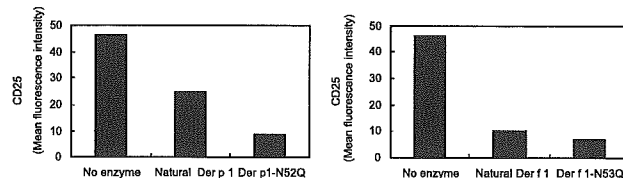
A. 合成基質の分解



B. ヒトCD23切断



C. ヒトCD25切断



D. ヒトα1-antitrypsin切断

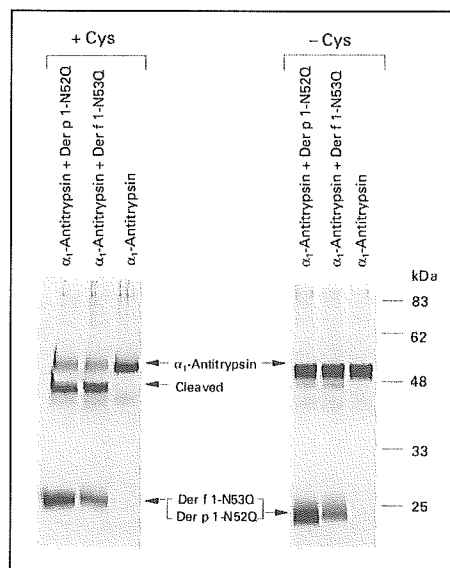


図5. 組換え型 Der p 1 および Der f 1 のプロテアーゼ活性. A: 不可逆的システインプロテアーゼ特異的阻害剤E-64 による完全な阻害. B およびC: 細胞膜上のCD23 およびCD25 の切断. D: ヒトα1-antitrypsin 標品の切断はシステインプロテアーゼ活性をL-cysteine で活性化したときに起きる. Natural: ダニ培養物より精製. Der p 1-N52Q および Der f 1-N53Q: 成熟体のN型糖鎖付加モチーフを破壊した組換え型. WT: Asn52 および Asn53 が酵母によって過剰な糖鎖修飾を受けた組換え型. Cleaved: 切断により短小化したα1-antitrypsin +Cys: L-cysteine 処理によりシステインプロテアーゼ活性を活性化後に反応. -Cys: L-cysteine 処理なしで反応.

ゼ活性は、過去に報告された天然型 Der f 3 と同様の基質特異性を示し、分子ふるいゲル濾過によって、その活性ピークはシステインプロテアーゼ活性のピークとは異なる画分に溶出された。この結果は、市販品に検出されたセリンプロテアーゼ活性が、グループ1アレルゲンに由来するのではなく、グループ3アレルゲンのわずかな混入に由来するものであることを示唆している。

(3) ダニ主要グループ1アレルゲン組換え体のプロテアーゼ活性と細胞・生体の相互作用

組換え型 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 (図6)。

免疫したマウスにおいて、L-cysteine 処理によりプロテアーゼ活性を活性化した組換え型 Der f 1

および Der p 1 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 (図7)。

さらに、活性化した高純度精製組換え型 Der f 1 および Der p 1 (活性体群) あるいは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 で処理した組換え体 (阻害群) をアラムとともにマウスに腹腔免疫し、血清中抗体を測定した。阻害剤自身の影響がないことを確かめる目的で、プロテアーゼではない主要ダニアレルゲン Der f 2 の組換え体、卵白アルブミン(OVA)、E-64 処理した組換え型 Der f 2、および E-64 処理した OVA をそれぞれ免疫した実験群も検討した。実験結果は(4)で述べる。

(4) 組換えアレルゲン変異体の作製および解析

酵素活性を完全に消失した Der f 1 変異体 (変異体群) も同様にマウスに免疫した。Der f 1 変異体標品にプロテアーゼ活性は検出されなかった。

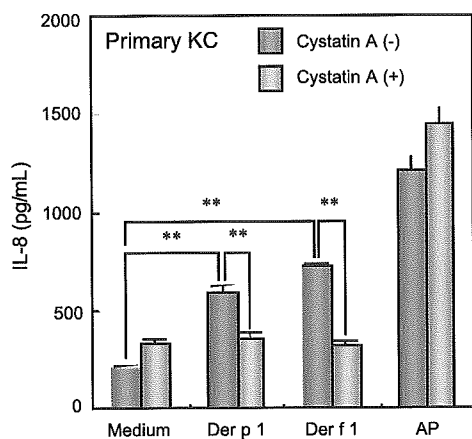


図6. 組換え型 Der p 1 および Der f 1 (Der p 1-N52Q および Der f 1-N53Q) 刺激によってケラチノサイトによる IL-8 産生が上昇する。システインプロテアーゼインヒビター-cystatin A の添加によりこの上昇は阻止された。AP: ヒト PAR-2 に対するアゴニストペプチド (ポジティブ・コントロール)。

変異体の2次構造と分子サイズは活性型と同様であった。マウスへの投与実験において、活性体群で総 IgE および Der f 1/Der p 1 特異的抗体が誘導された。総 IgE および特異的 IgE は阻害群と変異体群で顕著に低く、アラムのみの投与群と同等であった (図8)。特異的 IgG は阻害群で低下し、変異体群で顕著に低かった。変異体の投与量増大により若干の特異的 IgG が誘導されたが、IgE 誘導は低いレベルにとどまった。一方、組換え Der f 2 あるいは OVA 投与においては阻害剤処理による抗体産生への影響はなかった。よって、阻害群および変異体群における抗原性の顕著な低下は、E-64 によるものではなく、E-64 による組換え型 Der f 1 および Der p 1 のプロテアーゼ活性の消去に起因すると考えられる。

Der f 2 のプロリン多重変異体のアレルゲン活性は、単独変異体のうち最も低活性の変異体と同等にまで低下した。さらに、どの単独変異体よりも顕著に活性が低下し、多重変異導入による相乗効果があった患者が存在したが一部に限られた (図9A)。

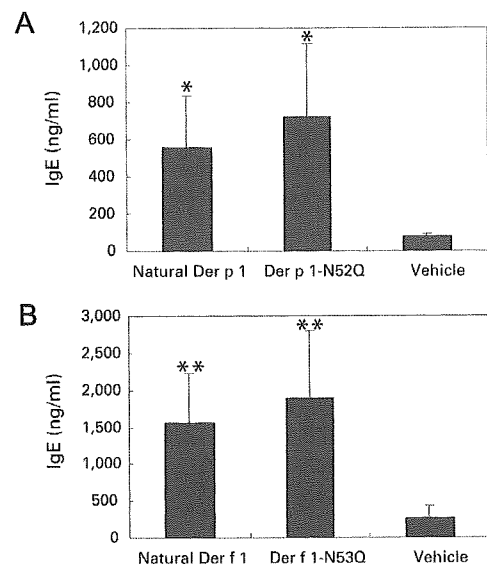


図7. 組換え型 Der p 1 および Der f 1 (Der p 1-N52Q および Der f 1-N53Q) をマウスに免疫すると、天然型と同等の血清 IgE を誘導した。

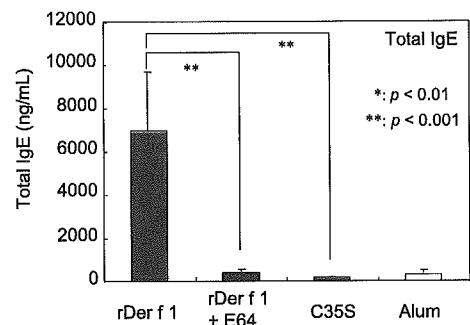
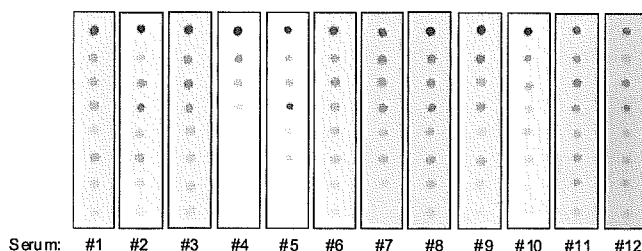


図8. 組換え型 Der f 1 の IgE 誘導は不可逆的システインプロテアーゼ特異的阻害剤 E-64 による処理あるいは遺伝子工学的に触媒中心残基 Cys35 を Ser に置換することによって顕著に低減した。マウスへの免疫実験。

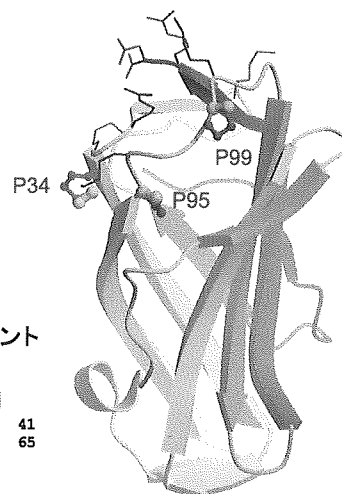
D. 考察

本研究において、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

A. ドットプロットによる IgE結合試験



B. Der f 2の立体構造



C. Der f 2への変異導入箇所周辺と NPC2, MD-2の配列アラインメント

	β	β		β	β		
Der f 2	91	TWNWKLAPKSENVVV	106	Der f 2	26	PCIIHRGRFTLEALF	41
Human NPC2	93	KLVRKSEYPSI-KLVV	107	Mouse MD-2	50	PCIRLRGTMEFVHVEF	65
Human MD-2	118	SFSFRGIKFSKGRKCK	133				
Mouse MD-2	118	FFSFEGLFFKGGHYRC	133				

図9. Der f 2の推定リガンド結合領域へ変異導入によるアレルゲン活性の低下. A: Der f 2のプロリン残基変異体の患者血清 IgE の結合 (12名). B: 変異箇所はリガンド結合ポケット (推定) の入り口の縁に位置する. リボンの色は N 末端から C 末端に進むに従い、青から赤に変化させてある. ワイヤは荷電残基を示す. C: 変異箇所 (赤字) は同じタンパク質ファミリーに属す NPC2 および MD-2 のリガンド結合残基 (青字) 周辺にアラインメントされる.

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。天然型アレルゲンと同等の構造・活性を保持したこれらの活性型組換アレルゲンは、診断および治療、さらに構造解析や疾患との関連解析においても有用性が高い。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ことがわかった。Der f 2 については 3 個のアミノ酸置換により全体構造を保ったままアレルギー患者血清 IgE への結合活性が減弱した変異体を得た。

(1) 天然型と組換アレルゲンの構造およびアレルゲン活性の比較

Der f 1 および Der p 1 の組換型は酵母発現系を利用してプロ体として発現させた後、活性化処理により成熟体を得た。成熟体の糖鎖付加モチーフを部位特異的変異によって破壊することにより、酵母による過剰な糖鎖修飾を回避し、天然型と同じ分子サイズの成熟体を得ることができた (発表論文 1)。しかし、成熟体配列中の糖鎖付加モチーフの破壊は培地中へのプロ体の分泌量が減少も引き起こした。本研究での使用においては問題にならなかったが、より大量の試料が必要な場合にはボトルネックとなる。今後改良すべき点であろう。Der p 1 については、当初 Der f 1 と比較して成熟化スピードが遅かったが、Der p 1 のプロ配列中に存在する糖鎖付加モチーフに変異を導入することによって成熟化スピードの向上を実現した (図 10) (発表論文 2)。

組換型 Der f 1 および Der p 1 と天然型のアレルゲン活性は全体としてみると同等であり、これまでに報告された組換型のうちで最も天然型に近い活性を保持している (発表論文 1)。しかし、詳細にみると一部の血清あるいはボランティア血