

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、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。第1年度においては、イヌの免疫系に対してTh1型反応誘導能を有するCpG-ODNを見出し、その臨床応用の基礎を確立した。第2年度においては、イヌのアトピー性皮膚炎における主要アレルゲンを同定し、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。第3年度においては、主要アレルゲンであるDer f 2と我々が見出した新規アレルゲン(Z1)をコードし、CpG motifを含む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。本研究における一連の成果は、新規免疫療法がアトピー性皮膚炎の動物モデル系で評価可能であることを示したものであり、これら新規免疫療法をヒトのアレルギー性疾患の治療に応用するための基盤を提供するものである。

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。

これまで、アレルギーに関する数多くのマウスモデルが研究に用いられてきたが、血清中IgE値の上昇は見られるが、症状の発現が認められないモデルが多かった。また、皮膚炎を発生するマウスモデルも開発されているが、その症状やアレルゲンに関してはヒトのアレルギーと類似しているとは言えないシステムであった。

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*, DF; *Dermatophagoides pteronyssinus*, DP) 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た。

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について、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。

本研究においては、イヌのアトピー性皮膚炎におけるダニの主要アレルゲンを解析し、明らかとなったアレルゲン分子をCpG-ODNを用いた治療法およびDNAワクチン療法に利用することによって、新規免疫療法を開発したいと考えた。

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Fc ϵ RI α を用いた一次元イムノブ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。

イヌのアトピー性皮膚炎におけるDFアレルゲノーム解析：我々が見出した約170k Da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プライマーを作成した。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CO S7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。

イヌの免疫系に対してTh1型反応誘導能を有するCpG-ODNの作製：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。

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 (300 μ g) を皮下注射し、7日後に再度DF抽出物 (300 μ g) 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 (50 μ g) 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 (50 μ g) 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 (300 μ g) 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。

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ダニ主要アレルゲンの解析：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。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。

イヌのアトピー性皮膚炎におけるDFアレルゲノーム解析：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。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。

イヌの免疫系に対してTh1型反応誘導能を有するCpG-ODNの作製：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モチーフ配列1種類を決定することができた。この事象はイヌIFN- γ mRNAの発現においても確認された。以上のことより、このCpG配列はイヌの末梢血単核球においてTh1型サイトカインを誘導することがわかった。

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30~30,000U/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値をブースター感作前(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。

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。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。

D. 考察

DFに対する血清中IgEを有するイヌ20頭においてそのアレルゲンを解析した結果、10以上の多数のバンドが検出された。また、二次元イムプロット法を行った場合にはその数倍の数のタンパク分子がアレルゲンとなっていることが示された。したがって、ダニに感作されたイヌにおいては、免疫療法に用いるアレルゲンの選択が重要となる。現状では、一次元イムプロットのレベルでは、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。本研究においては、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IgE産生抑制効果が示されたが、今後、自然感作によってアトピー性皮膚炎を発症したイヌの症例において実際に症状を軽減させることができる免疫療法を開発する際には、ダニアレルゲンの多様性をさらに検討していく必要があるものと考えられた。

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配列であることがわかった。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

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。イヌのアトピー性皮膚炎における主要アレルゲンを同定し、主要アレルゲンであるDer f 2と新規アレルゲン(Z1)をコードし、CpG motifを含む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。本研究における一連の成果は、新規免疫療法がアトピー性皮膚炎の動物モデル系で評価可能であることを示した

ものである。

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

- on 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

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：

スギ花粉症患者における IgE 抗体の Cry j 1 と Cha o 1 に対する親和性の測定およびスギ花粉症患者の減感作療法による各種パラメーターの 3 年間の変動と IgE 抗体の親和性の治療効果評価への有用性について

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 抗体のアレルゲンに対する親和性を測定する方法を確立し、次の点を明らかにした。(1) スギ花粉症患者の血清中 IgE 抗体の Cry j 1 (スギの主要アレルゲン) と Cha o 1 (ヒノキの主要アレルゲン) に対する親和性(解離定数)は Cry j 1 で 7.1 pM (median, range 1.58-79.4 pM)、Cha o 1 で 40.8 pM (median, range 2-500 pM) で Cha o 1 は有意に弱い親和性を示し (n=18, p=0.0006)、IgE 抗体の親和性はヒスタミン遊離能と密接に関係していることが確かめられた。(2) Cry j 1 に対する 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比較検討した。IgE 抗体の親和性は 3 年間の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 年以上の減感作群で低減化した。また Cry j 1 に対する IgG4 抗体の親和性は IgE 抗体と比べて有意に弱かった。これらの検討により、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質的にも変化することが初めて明らかになり、さらに 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

一連の I 型アレルギー反応はアレルゲン分子と IgE 抗体との間の抗原抗体反応によって開始され、アレルゲン分子と IgE 抗体との間の結合の強さ(親和性)はそれに続くアレルギー反応全体の強さを規定する一つの要因になるものと考えられる。本研究では IgE 抗体の親和性を測定する方法を確立し、この方法を用いて次の点を明らかにすることを目的とした。

(1) スギ花粉症患者はヒノキ花粉に暴露されて鼻症状を生じる。スギの主要アレルゲンである Cry j 1 とヒノキの主要アレルゲン Cha o 1 の間には IgE 抗体レベルで強い交叉反応性がみられ、Cha o 1 は Cry j 1 よりもヒスタミン遊離能が低いことが知られているが、そのメカニズムは明らかではない。この現象と IgE 抗体の親和性との関連を研究し、IgE 抗体の親和性がアレルギー反応全体に及ぼす影響を解明する。

(2) スギ花粉症の減感作療法による IgE 抗体量の変動、IgE 抗体の親和性の変動およびヒス

タミン遊離を 3 年間にわたって同一患者で測定し、減感作療法の有効性の指標としての IgE 抗体の親和性測定の意義を明らかにする。

B. 研究方法

1. 血漿中の抗体濃度とヒスタミン遊離試験

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。

2. 抗体親和性の測定

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 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、もつ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。

3. 減感作療法による各種パラメーターの変動

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。

4. 統計方法

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。表中の数値は median で示した。

C. 研究結果

1. スギ花粉症患者の IgE 抗体の Cry j 1 に対する親和性と Cha o 1 に対する親和性の比較

(1) Cry j 1 によるヒスタミン遊離の reactivity は Cha o 1 による reactivity と有意に相関したが ($rs=0.665$, $p=0.0019$)、Cha o 1 に対する reactivity は有意に低い値を示した (median, 58.9% vs. 32.5%, $P<0.0001$, Wilcoxon t-test)。同様に、Cry j 1 によるヒスタミン遊離試験の sensitivity と Cha o 1 による sensitivity の間には有意な相関がみられたが ($rs=0.776$ 、

$p<0.0001$)、Cry j 1 に対する sensitivity と比べて Cha o 1 に対する sensitivity は大きな値を示した (median, 0.21 ng/ml vs. 16.6 ng/ml, $p<0.01$)。

(2) IgE 抗体に対する K_D は Cry j 1 で 7.1 pM (median)、1.58-79.4 pM (range)、Cha o 1 で 40.8 pM (median)、2-500 pM (range) で Cha o 1 は有意に弱い親和性を示したが ($n=18$, $p=0.0006$)、両者の間には相関はみられなかった (図 1)。

(3) ヒスタミン遊離の sensitivity と K_D との関係: 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 ($rs=0.952$, $p=0.0118$, 図 2)、さらに reactivity が約 70%-99% の 6 例においても有意な相関がみられた ($rs=0.867$, $p=0.0040$, 図 2)。この結果は 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、この現象が Cha o 1 によるヒスタミン遊離の低下と関係していることを示しており、親和性の測定が臨床症状や治療効果の指標のひとつとして使用できる可能性が示唆された。

2. 減感作療法による各種パラメーターの変動

(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/cm²、平成 16 年 705 個/cm²、平成 17 年 23000 個/cm²) 増減がみられ、花粉の飛散数に依存する total IgE の増大は 5 年以上の減感作療法を受けている群では統計的に有意な増加はみられなかった (図 3)。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 4)。

(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 1.95×10^{-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、この抗体を使用して 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 5、 $P=0.0051$)。

D. 考察

IgE 抗体に対する Cry j 1 と Cha o 1 の親和性について：

モノクローナル抗体の場合には、 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。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 に相当する。また、Cha o 1 (MW 40000) の K_D の $2-500$ pM は 80 pg/ml- 20 ng/ml 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。これらの結果は 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示唆している。

減感作療法の指標としての IgE 抗体親和性について：

平成 16 年の時点では、血清中の total IgE 濃度、IgE 抗体濃度および IgE 抗体の親和性は前年 (平成 15 年) よりも低減していたが、これが減感作療法の効果によるものか、平成 15 年の花粉飛散量に原因しているのか結論付けられなかった。しかし、花粉飛散量が非常に多かった平成 17 年にこれらのパラメーターはいずれも増加、亢進を示したことから花粉の飛散数の影響で変動していたことが明らかになった。

花粉飛散量の異なる 3 年間の研究により、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るが、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は手技の煩雑さのために複数年での比較には耐えられず、減感作療法の有効性を評価する方法としては限界があると考えられた。

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 抗体によるアレルゲンと IgE 抗体の結合の阻害作用は結合の強さよりもむしろ抗体量の増加に依存していることが推測された。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。

E. 結論

IgE 抗体の親和性を測定する方法を確立した。Cha o 1 および Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性測定から、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が明らかになった。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

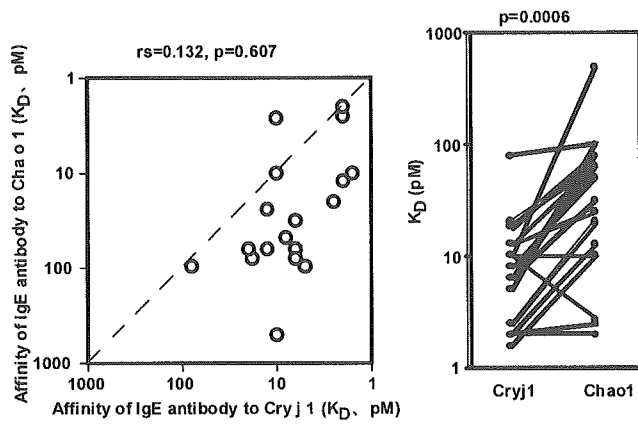


図1 Cryj 1 と Cha o 1 に対する IgE 抗体の親和性の関係

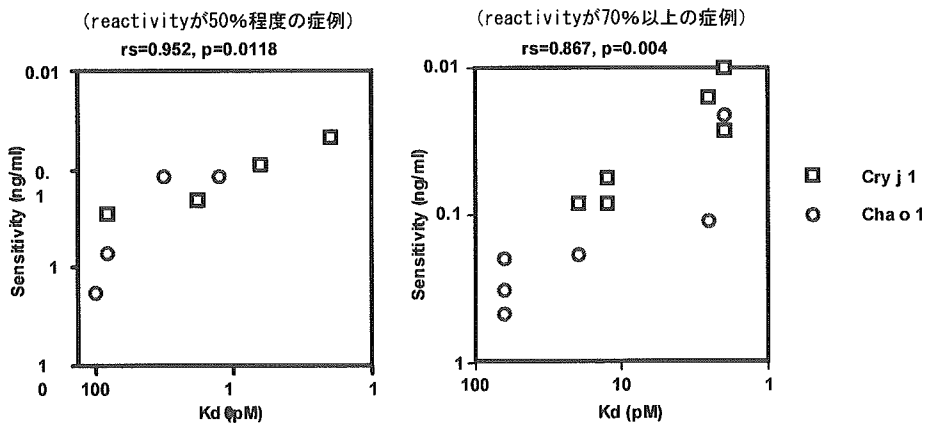


図2 IgE 抗体の親和性とヒスタミン遊離試験の sensitivity の関係

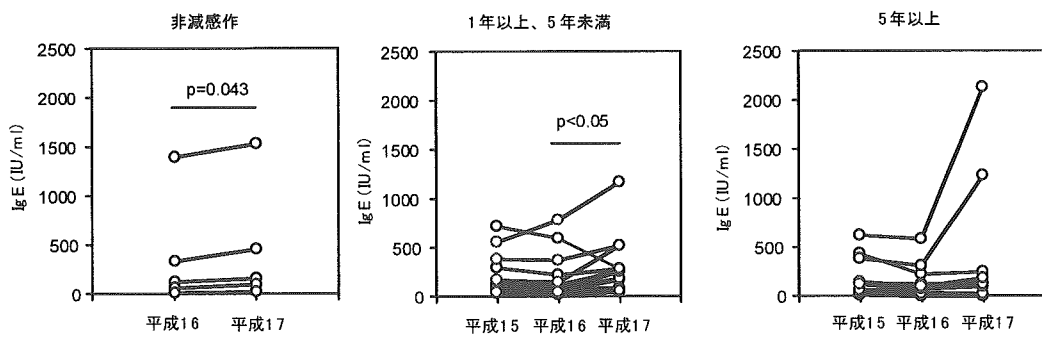


図3 減感作療法による total IgE 濃度の変動

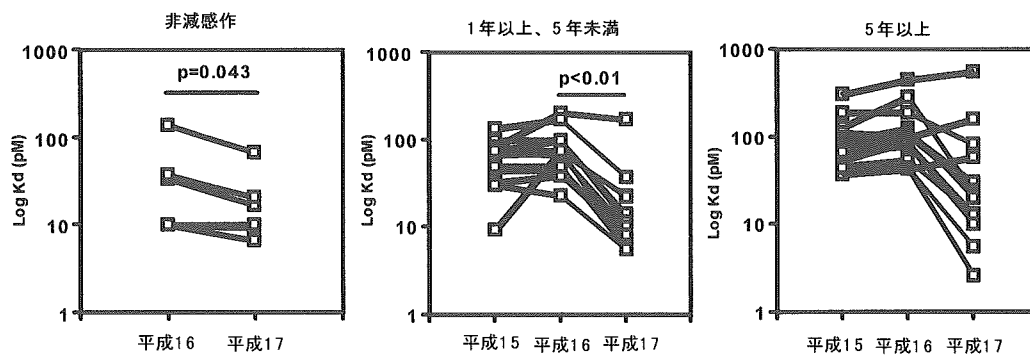


図4 減感作療法によるCry j 1に対するIgE抗体の親和性（解離定数）の変動

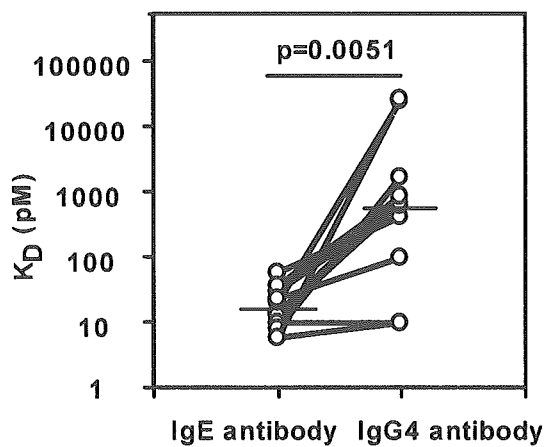


図5 Cry j 1に対するIgE抗体とIgG4抗体の親和性の比較