

200631024A

別添1

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

スギ花粉症およびダニアレルギーに対する新しい免疫療法の開発に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 阪口雅弘

平成19（2007）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
スギ花粉症およびダニアレルギーに対する 新しい免疫療法の開発に関する研究	-----1
阪口雅弘	
II. 分担研究報告	
1. TLRリガンドをアジュバントしたスギ花粉 アレルギーワクチンの開発に関する研究	-----5
阪口雅弘	
2. ダニアレルゲン遺伝子を組み込んだDNAワクチンの 開発に関する研究	-----9
辻本 元	
3. スギ花粉およびダニアレルゲン発現菌体ワクチンの開発 に関する研究	-----13
小埜和久	
4. プロテアーゼ活性を消去した組換えダニ主要アレルゲン 改変体投与による予防的IgEトランスの誘導に 関する研究	----- 16
高井敏朗	
5. 免疫療法におけるヒノキ花粉アレルゲンの必要性の検討 に関する研究	----- 19
斎藤三郎	
5. 舌下減感作療法における臨床試験および作用機序の 解析に関する研究	----- 22
岡本美孝、阪口雅弘、中山俊憲、大久保公裕、安枝 浩、斎藤三郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 27

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)
総括研究報告書

スギ花粉症およびダニアレルギーに対する新しい免疫療法の開発

主任研究者 阪口雅弘 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 特任助教授

研究要旨

新しい免疫療法の開発を行い、その有効性と安全性を比較し、最も現実的で開発可能な免疫療法について実用化の検討を行うことと、舌下減感作療法の臨床研究を行い、その有効性とメカニズムの解析も行うことがこの研究班の目的である。1) CpG-ODN結合スギ花粉アレルギーワクチンにアジュバントとして使用されているCpGの安全性が高いことが判った。2) ダニアレルギーを発現するDNAワクチンはマウスおよびヒトにおいてTh1型の免疫応答が誘導され、アレルギー特異的IgE産生が抑制された。3) スギ花粉主要アレルギーCry j 1を発現する組換え乳酸菌の開発に成功した。更に、麹菌が組換え型スギ花粉アレルギーの発現系として優れた宿主であることを明らかにした。4) プロテアーゼ活性を除去したDer f 1変異組換え体はIgE誘導活性を持たないばかりでなく、免疫寛容を誘導し、減感作抗原ワクチンとして有望であると考えられた。5) スギおよびヒノキ花粉アレルギーに対するPBMCの反応性から、それぞれのアレルギーに特異的T細胞の存在が示唆された。6) 本研究では2重盲見試験による舌下減感作療法の治療効果を評価すると共に、患者末梢血より精製したmRNAをもちいたマイクロアレイ解析により、舌下減感作療法の治療メカニズムおよび治療バイオマーカーの検索を目的とした。マイクロアレイ解析の前段階として、マイクロアレイを行うのに必要な末梢血量を検討した結果、末梢血50 ml必要であることが判った。

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
小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科 教授
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
斎藤三郎 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所 助教授
岡本美孝 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 教授
中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 教授
大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科 助教授
安枝 浩 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
室長

これらアレルギー疾患の唯一の根治的治療法として減感作療法がある。しかし、治療期間の長期化や副反応の問題等で日本ではあまり行われていない。本研究は、免疫学的な知識や理論に基づいて免疫療法を研究し、減感作療法に代わる新しい免疫療法を開発することを目的とする。すなわち、CpGワクチン、DNAワクチン、乳酸菌・麹菌ワクチン、組換え体ワクチンの4つの新しいワクチン開発を行い、その有効性と安全性を検討し、現実的で開発可能な免疫療法について実用化を図る。また、ヒノキアレルギーの必要性についても検討する。さらに、スギ花粉症に関しては緊急にその対策が求められているため、減感作用アレルギーエキスを舌下減感作療法の治療に用いた臨床研究を行い、その有効性とメカニズムの解析も行う。

A. 研究目的

日本の国民の10%以上がスギ花粉症であると推定されている。一方、小児気管支喘息の原因アレルギーの80%以上はダニであると考えられている。

B. 方法

1) CpGワクチン：スギ花粉アレルギーCry j 1にCpGを

結合させたCpG-Cry j 1ワクチンのCpGに対する安全性の検討するため、CpG（高容量60 μ g, 低容量2.5 μ g）をDBA/2マウスに毎日20日間ip投与した。0、7、20日目に採血した。また、20日目に血清中のサイトカイン濃度および病理学的検査を行った。

2) DNAワクチン：ダニアレルゲンDer f 2 遺伝子を組み込んだDNAワクチン(pCAGGSDF2)および新規ダニアレルゲンZen1 遺伝子を組み込んだDNAワクチン(pCAGGSZ1)をBALB/cマウスおよび実験用ビーグル犬に筋肉内投与し、アレルゲン特異的抗体およびサイトカイン産生プロファイルを測定した。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：乳酸菌にて構成的高発現を認める乳酸脱水素酵素 (LDH) 遺伝子プロモーターを有する乳酸菌-大腸菌シャトルベクターにLDHのN末端ドメイン (LDHN) を挿入し、その下流にスギ花粉主要抗原Cry j 1 全長またはCry j 1のC末端領域 (220-374) の遺伝子をFLAG-tagとともに融合させた。麹菌発現系では、硝酸塩資化性を賦与する発現ベクターのenolaseプロモーター制御下に新規スギ花粉アレルゲンのcDNAをHis-tag配列と共に組み込んだ。これを麹菌*Aspergillus oryzae*に導入して、組換え型アレルゲンの発現をanti-His抗体を用いたWestern blot解析にて確認した。

4) 組換え体ワクチン：ダニアレルゲンDer f 1のプロテアーゼ活性中心のアミノ酸残基に変異を導入しプロテアーゼ活性を消失させた組換え変異体を作製した。感作実験として、プロテアーゼ活性を有する組換え体、これをインヒビター処理した標品、プロテアーゼ活性を消去した変異体をアラムとマウスに免疫した。予防実験として、変異体あるいは緩衝液のみをアラムと一定期間腹腔免疫し（前処置）、その後プロテアーゼ活性を有する組換え体を免疫した（感作）。経時的に血清を採取して各種抗体価を解析した。

5) ヒノキ花粉症：スギ・ヒノキ花粉症患者61名と健常人53名についてPBMCを用いて、Cry j 1およびヒノキアレルゲン(Cha o 1)に対する増殖能を調べた。さらに、患者に共通するCry j 1の主要なT細胞エピトープ部位をPBMCのCry j 1の部分合成ペプチドに対する反応性から評価した。Cry j 1で同定された主要エピトープ部位に相当するCha o 1のアミノ酸配列について比較検討した。

6) 舌下減感作療法：スギ花粉症患者に対して高濃度投与群（8000JAU/月）、低濃度群（800JAU/月）、偽薬群に分けて減感作抗原を舌下投与した二重盲検比較試験を行なう。花粉飛散期に花粉症状・薬投与量・QOLについて各群を比較して投与抗原量により、臨床効果および副反応を評価する。また、治療メカニズムの解析および減感作バイオマーカーの探索のため、マイクロアレイ法を用いて解析する。すなわち、二重盲検比較試験とは別の患者に対して高濃度投与を

行い、同様の臨床効果および副反応の評価を行うとともに、患者からPBMC分離と抗体測定用に採血を行う。PBMCはマイクロアレイ解析のため、PBMCからのRNA抽出を行なう。抗体はスギ花粉特異的IgE, IgG, IgG4を測定する。

C. 研究結果

1) CpGワクチン：マウスのCpG高容量投与群では赤血球数・血小板の低下が起こり、重篤な貧血および出血性腹水が認められた。また、肝臓の肥大とともに炎症も認められた。低容量投与群はPBS投与群同様、何も変化が認められなかった。さらに高容量投与群では血中GOTの増加、炎症性サイトカイン (IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , IL-6) の有意な増加も認められた。低容量群およびコントロール群では、これらの増加は認められなかった。

2) DNAワクチン：マウスにおいてDNAワクチン投与後、IgG2aレベルはIgG1レベルよりも優位であった。人工感作後におけるアレルゲン特異的IgEは、コントロールベクター投与（対照）群に比べ、ワクチン投与群において低値を示した。アレルゲン刺激後の脾臓由来CD4⁺リンパ球からのサイトカイン産生レベルは、DNAワクチン投与群において、IL-5が低値を、IFN- γ が高値を示した。次にイヌにおいてワクチン投与後、それぞれのアレルゲンに対するIgG2レベルはIgG1レベルよりも優位であった。Der f 2人工感作後におけるアレルゲン特異的IgEレベルは、対照群に比べ、Der f 2 DNAワクチン投与群において低値を示した。しかし、Zen1感作後におけるZen1特異的IgEレベルは、Zen1 DNAワクチン投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。また、本実験におけるDNAワクチン投与においては、臨床的および病理学的な異常は認められず、その安全性が示された。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：本系においてLDHNと主要抗原Cry j 1全長からなる融合タンパク質の発現は確認できなかった。これを解決するためにCry j 1配列中のレアコドンを含めて全て乳酸菌型に改変して発現解析を行ったところ、全長Cry j 1を菌体内に発現させることに成功した。麹菌発現系においては、組換え型CPA39/B-1, 3-glucanaseならびにCPA63/aspartyl proteaseの安定な菌体内発現を認めた。また、CPA63について使用コドンを含めて全て麹菌型に置換・最適化したところ、その発現効率が向上することが明らかとなった。

4) 組換え体ワクチン：感作実験において、プロテアーゼ活性を有する組換え体による感作では抗原特異的IgE及びIgGが誘導されたが、プロテアーゼ活性を消去した変異体ではほとんど誘導されなかった。予防実験において、変異体で前処置した実験群に、その後プロテアーゼ活性を有する組換え体を投与しても、抗原特異的IgE及びIgGの誘導がほぼ完全に阻止された。

プロテアーゼ活性を有する組換え体による感作によって抗体が誘導されたマウスの血清中抗体結合阻害実験及び脾臓細胞刺激実験によって、変異体はB細胞エピトープ及びT細胞エピトープを保持していることを確認した。

5) ヒノキ花粉症：健常人では、Cry j 1とCha o 1に対するPBMCの反応性には、Stimulation Index で2以下であった。患者では、Cry j 1とCha o 1に対するPBMCの反応性は優位に高値を示したが、Cry j 1とCha o 1に対する反応性に相関は認められなかった。主要なT細胞エピトープ部位は6ヶ所同定されたが、P151-170およびP312-330でアミノ酸の相同性がそれぞれ60%、68%と低いことが明らかになった。

6) 舌下減感作療法：現在、高濃度投与群、低濃度投与群の舌下ワクチン接種を行っており、舌下減感作抗原投与による副反応は認められていない。スギ花粉飛散期にスギ花粉症状・薬投与量・QOLについて各群を比較して投与抗原量により、臨床効果および副反応を評価する予定である。今回の舌下減感作療法によるバイオマーカーの探索並びに治療メカニズムの解析においてPBMCにおけるマイクロアレイ解析を行う。実験に必要な量のRNAを採取するためにどの程度の血液量が必要か検討した。50mlの末梢血から平均 8.6×10^7 個のPBMCが採取された。このPBMCから 6.0×10^4 細胞をCry j 1存在下で培養し、CD4陽性T細胞に精製後、T細胞からRNAを抽出したところ、平均 $8.9 \mu\text{g}$ のRNAが採取できた。

D. 考察

1) CpGワクチン：マウスにおいて $2.5 \mu\text{g}$ を20日間連続で接種しても、安全性に影響がないことが明らかになった。この $2.5 \mu\text{g}$ は人に投与するワクチンに含まれるCpGの量に相当するため、人ではさらに安全であることが判った。また、人の場合、1週ごとの6回接種を行なうため、本研究よりも接種回数は少ない。しかし、CpG-ODNを臨床応用する場合、貧血、血小板減少症などを呈する疾患、肝疾患、全身性炎症性疾患などの基礎疾患を有する患者ではCpGによる副作用を十分注意すべきと考えられる。

2) DNAワクチン：ダニアレルゲンであるDer f 2 DNAワクチンおよび新規ダニアレルゲンであるZen1 DNAワクチンは、マウスにおいて各アレルゲンに対するTh1型の免疫応答を誘導し、IgE産生を抑制することが示された。これらの効果はイヌにおいても部分的に証明された。アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの75%以上はDer f 2またはZen1に感作されていることがわかっているため、この2種類のDNAワクチンを投与することにより、ダニに対するIgE産生を抑制し、その症状を改善できる可能性が示された。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：今回、LDH 融合タンパク質発現系や使用コドンの最適化などの独自手法を組

み合わせるにより、組換え型 Cry j 1 を乳酸菌にて発現させることに初めて成功した。この結果は今後のアレルゲン発現菌体ワクチン開発へと大きな弾みをつけるものであるばかりでなく、これまで本邦で成功例が殆どなかった Cry j 1 の発現技術そのものにも革新的なブレークスルーをもたらすものであると考えている。麹菌を宿主としたスギ花粉アレルゲン発現系については、今回の初期検討でも十分に組換え菌体の作製に有用であることを実証できた。現在これを更に凌駕する高発現ベクターの構築を試みており、Cry j 1 発現菌体の作製にも着手したい考えである。

4) 組換え体ワクチン：感作実験の結果から、本実験系のマウス感作過程においてプロテアーゼ活性が抗体誘導に決定的に重要であることが示唆された。さらに、予防実験の結果から、変異体の投与は免疫寛容を誘導していることが示唆された。感作実験においてプロテアーゼ阻害剤で処理した標品及び変異体の投与では抗体誘導が顕著に低減した理由がこれにより説明できる。プロテアーゼ活性依存的な感作のメカニズム、及び変異体投与によるユニークな予防的免疫寛容の誘導のメカニズムは興味深い、現時点では不明である。

5) ヒノキ花粉症：スギ・ヒノキ花粉症患者においてCry j 1とCha o 1に対する反応性に相関が認められないことは、Cry j 1特異的あるいはCha o 1特異的T細胞クローンの存在が示唆される。T細胞エピトープ部位の相同性の比較から、2ヶ所に特異的T細胞クローンの存在が推測される。

6) 舌下減感作療法：高濃度投与群および低濃度投与群による臨床効果についてはスギ花粉飛散期に評価を行う。また、50mlの患者血液でマイクロアレイ解析に必要な十分なRNA量を確保できることが判った。オープン試験の患者における解析によって明らかになったマーカーに関しては、二重盲検比較試験の高濃度投与群の患者のPBMCからRNAを抽出し、Real Time-PCRでそのマーカーの動態を調べることにより、そのマーカーの真偽を検討する。

E. 結論

1) CpGワクチン：CpG-Cry j 1ワクチンにアジュバントとして用いているCpGの安全性が高いことが判った。

2) DNAワクチン：ダニアレルゲンDNAワクチンはイヌの臨床例に適用可能であるものと考えられた。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：スギ花粉主要抗原Cry j 1を良好に発現する組換え乳酸菌の開発に成功した。更に、麹菌が組換え型スギ花粉アレルゲンの発現系として優れた宿主であることを明らかにした。

4) 組換え体ワクチン：プロテアーゼ活性のない変異体を減感作抗原として使用できる可能性が示された。

5) ヒノキ花粉症：スギ・ヒノキ花粉症患者において

Cry j 1特異的あるいはCha o 1特異的T細胞クロー
ンの存在が示唆された。

6) 舌下減感作療法: 50mlの患者血液でマイクロア
レイ解析に必要な十分なRNA量を確保できることが確認
でき、本研究においてマイクロアレイ解析が行なえ
ることが判った。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

別紙の分担研究者報告を参照

H. 知的財産の出願・登録状況

別紙の分担研究者報告を参照

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

TLRリガンドをアジュバントしたスギ花粉アレルギーワクチンの開発

分担研究者 阪口雅弘 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 特任助教授

研究協力者 藤村孝志 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 産学官連携研究員
五十君静信 国立医薬品食品研究所 食品衛生管理部 室長

研究要旨

スギ花粉症は国民の10%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。本研究では、TLRリガンドであるCpGをスギ花粉アレルギー(Cry j 1)結合させたワクチンの開発を進めている。本年度はCpG-ODN結合スギ花粉アレルギー(Cry j 1)ワクチンの安全性の検討のために、アジュバントとして使用されているCpG oligodeoxynucleotide(1018)を人に接種するのと同量である2.5 μ g/headとそれよりも25倍多い60 μ g/head/dayをマウスDBA/2に接種し、その反応性を検討した。低容量の2.5 μ gでは無接種群とほとんど変わらなかったが、高容量の60 μ gを接種したマウスでは、赤血球、血小板の減少が認められ、重度の貧血を起した。また、肝臓の腫大も認められ、病理学的検討では炎症性細胞の浸潤を認めた。さらに血中GOTの増加、炎症性サイトカイン(IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , IL-6)の有意な増加も認められたが、低容量の2.5 μ g/headではこれらの炎症性サイトカインの増加は認められなかった。CpG-Cry j 1ワクチンにアジュバントとして用いているCpG安全性が高いことが判った。

A. 研究目的

CpGモチーフは、IL-12、IFN- γ 等のサイトカイン産生の誘導作用を有すことから、Th1優位の状態に導くアジュバント様物質として注目されている。米国のブタクサ花粉症において、TLRリガンドであるCpGを結合させたワクチンの臨床試験も行われて効果が報告されている。スギ花粉症に対する根治的な治療法の開発の研究として、本研究では CpG-oligodeoxynucleotide をアジュバントとしてスギ花粉主要アレルギー(Cry j 1)に結合させたワクチンについて解析を行っている。本年度はこの水花粉アレルギーにCpGを結合させたワクチンの安全性を検討するためにマウスでのCpGの反応性の検討を行った。

B. 研究方法

マウスDBA/2を用いてCpG(1018)の副作用を検討した。7週令、メスのDBA/2に低容量(2.5 μ g/head)、高容量(60 μ g/head/day)のCpG-ODN(1018)を20日間毎日腹腔内投与した。0、7、20日目に採血した。また、20日目に血清中サイトカイン濃度および病理学的検査を行った。

C. 研究結果

高容量投与群(60 μ g/head)では、7日目から赤血球、血小板の減少および網状赤血球の増加を認め、20日まで持続した。出血性腹水を含む、重度の貧血が認められた。脾臓の著名な腫大を認め、病理学的検討では巨核球の増加など髄外造血を示す所見が認められた。肝臓の腫大も認められ、病理学的検討では炎症性細胞の浸潤を認めた。また、血中GOTの増加、炎症性サイトカイン(IL-12p70, IFN- γ , TNF- α ,

IL-6) の有意な増加も認められた。低容量群およびコントロール群では、これらの所見は認められなかった。

D. 考察

本研究から、1018の高容量の持続的投与では貧血、血小板減少症、肝障害などの重篤な副作用が誘導される可能性があるが、マウスにおいて低容量である2.5 μ gを20日間連続で接種しても、安全性に影響がないことが明らかになった。この2.5 μ gは人に投与するワクチンに含まれるCpGの量に相当するため、人ではさらに安全であることが判った。また、人の場合、1週ごとの6回接種を行なうため、本研究よりも接種回数は少ない。しかし、CpG-ODNを臨床応用する場合、貧血、血小板減少症などを呈する疾患、肝疾患、全身性炎症性疾患などの基礎疾患を有する患者ではCpGによる副作用を考慮すべきである。

E. 結論

CpG-Cry j 1ワクチンにアジュバントとして用いているCpG安全性が高いことが判った。

F. 健康危険情報

現時点では特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Futamura, N., Tani, N., Tsumura, Y., Nakajima, N., Sakaguchi, M. and Shinohara, K.: Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiology* 26, 51-62, 2006.
- 2) Futamura, N., Ujiino-Ihara, T., Nishiguchi, M., Kanamori, H., Yoshimura, K., Sakaguchi, M. and Shinohara, K.: Analysis of expressed sequence tags from the pollen of *Cryptomeria japonica* reveals novel pollen-specific transcripts. *Tree Physiology* 26, 1517-1528, 2006.
- 7) Ohmori, K., Masueda, K., DeBoer, DJ., Sakaguchi, M. and Tsujimoto, H.: Immunoblot analysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* in press.
- 8) Fujimura, T., Futamura, N., Midoro-Horiuti, T., Togawa, A., Goldblum, RM., Yasueda, H., Saito, A., Shinohara, K., Masuda, K., Kurata, K. and Sakaguchi, M.: Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* in press.
- 3) Takahashi, Y., Aoyama, M., Yoshitake, M., Abe, E.,

Ohta, N. and Sakaguchi, M.: Relationship between airborne Cry j 1 and the onset time of the symptoms of Japanese cedar pollinosis patients. *Allergology International* in press.

2. 学会発表

- 1) 阪口雅弘：CpGを用いたアレルギー治療のためのワクチン開発。第16回日本生体防御学会、2005年8月4日
- 2) 大森啓太郎、増田健一、大野耕一、阪口雅弘、辻本元：犬のワクチン接種後アレルギー反応におけるワクチン中アレルゲン解析。第140回日本獣医学会、2005年9月30日
- 3) Fujimura, T., Futamura, N., Sinohara, K., Midoro-Horiuti, T., Yasueda, H., Masuda, K., Kurata, K., and Sakaguchi, M.: The purification and characterization of the novel allergen named Cry j 3.8 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. 25th Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna, Austria, June 10, 2006.
- 4) 藤村孝志、二村典宏、篠原健司、堀内照美、安枝浩、増田健一、蔵田圭吾、阪口雅弘：天然型スギ花粉アレルゲンCry j 3の単離およびアレルゲン性解析。第56回日本アレルギー学会秋季大会、2006年11月2日
- 5) 阪口雅弘：アレルギー疾患におけるDNA免疫療法。第43回日本小児アレルギー学会、2006年11月25日
- 6) 阪口雅弘：DNA免疫療法。第15回小児臨床薬理アレルギー免疫研究会、2007年1月28日

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 血液中の赤血球および血小板数

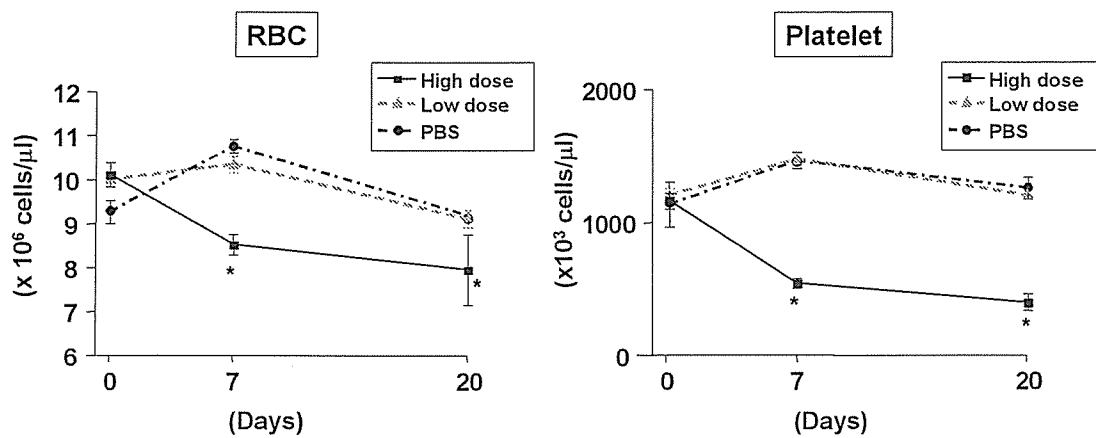


図2 肝臓重量と血液中のAST量

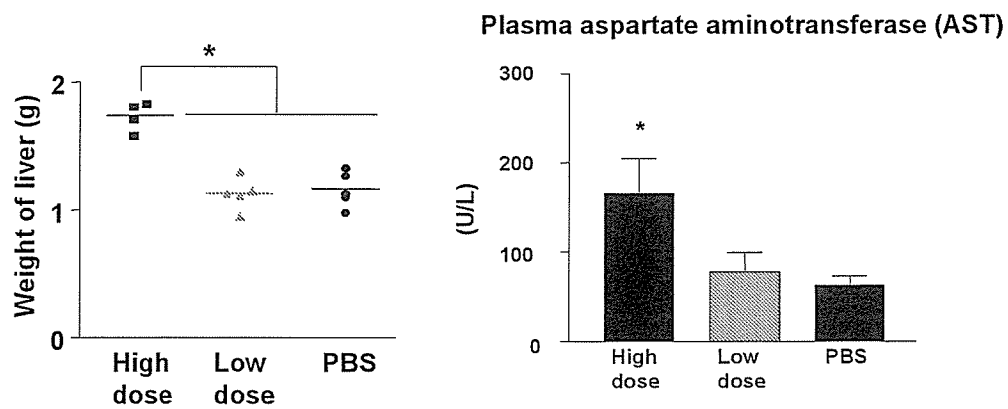
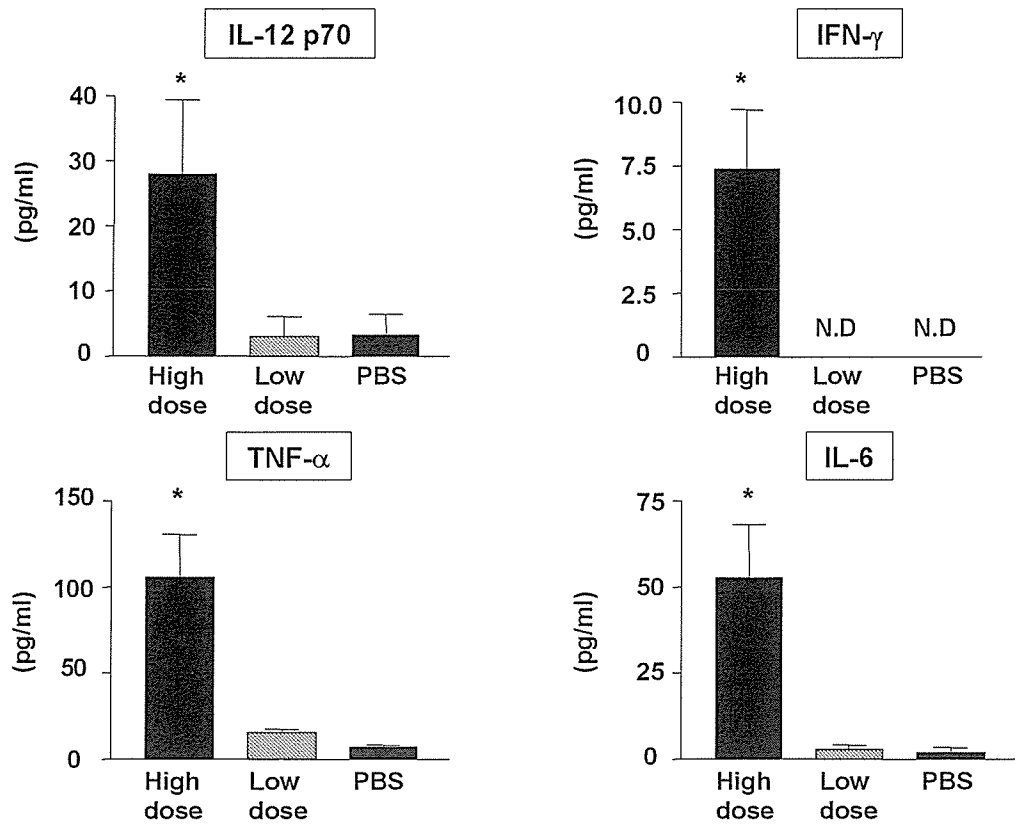


図3 投与20日目の血清中炎症性サイトカイン量



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

ダニアレルゲン遺伝子を組み込んだDNAワクチンの開発

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

ダニはヒトおよびイヌのアレルギー性疾患において最も高頻度に検出されるアレルゲンの一つである。本研究ではダニアレルゲン遺伝子を組み込んだDNAワクチンを開発することを目的として研究を進めた。本年度はDer f 2および私達が新たに同定した新規ダニアレルゲン(Zen1)の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、その免疫誘導能をマウスおよびイヌの系で検証した。

A. 研究目的

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、ダニアレルゲン遺伝子を組み込んだDNAワクチン療法の有効性を検証することを目的として研究を進めた。本年度においては、イヌのアトピー性皮膚炎における主要アレルゲンであるDer f 2および私達が同定した新規アレルゲン(Zen1)の遺伝子を組み込んだDNAワクチンを用い、その免疫誘導能をマウスおよびイヌにおいて検討した。

B. 研究方法

マウスにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能: Der f 2 cDNAを組み込んだDNAワクチン(pCAGGSDF2)およびZen1 cDNAを組み込んだDNAワクチン(pCAGGSZ1)をBALB/cマウスに1週間間隔で5回筋肉内投与し、DNAワクチン最終投与2週間後から、リコンビナントDer f 2およびリコンビナントZen1をそれぞれのマウスにアラムアジュ

バントとともに1週間間隔で4回腹腔内投与することによって人工感作を行った(図1)。人工感作終了後3週目にそれぞれのアレルゲンに特異的なIgG1, IgG2a, IgEおよびサイトカイン産生プロファイルを測定した。

イヌにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能: 上記のDer f 2 DNAワクチンおよびZen1 DNAワクチンを実験用ビーグル犬に1週間間隔で5回筋肉内投与し、DNAワクチン最終投与4週間後から、リコンビナントDer f 2およびリコンビナントZen1をそれぞれのイヌにアラムアジュバントとともに2週間間隔で3回皮下投与することによって人工感作を行った(図4)。人工感作終了後3週目にそれぞれのアレルゲンに特異的なIgG1, IgG2およびIgEを測定した。

C. 結果

マウスにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能: DNAワクチン投与後、そ

それぞれのアレルゲンに対するIgG1およびIgG2aが血清中に検出されるようになったが、IgG2aレベルはIgG1レベルよりも優位であった。人工感作後におけるアレルゲン特異的IgEレベルは、コントロールベクター投与群に比べ、DNAワクチン投与群において低値であった(図2)。アレルゲン刺激後の脾臓由来CD4⁺リンパ球におけるサイトカイン産生レベルは、コントロールベクター投与群に比べ、DNAワクチン投与群において、IL-5が低値を、IFN- γ が高値を示した(図3)。

図1. マウスにおけるDer f 2 DNAワクチン投与試験

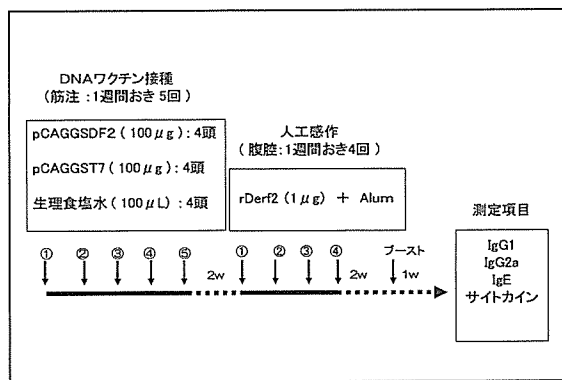


図2. マウスのDer f 2 DNAワクチン投与試験におけるDer f 2特異的IgEレベル

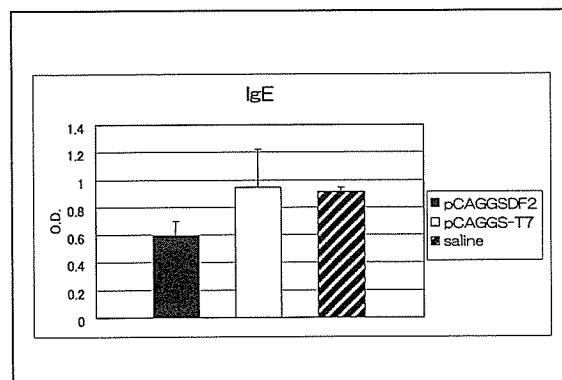
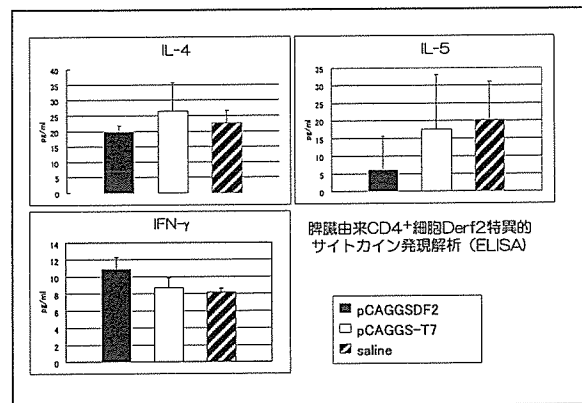


図3. マウスのDer f 2 DNAワクチン投与試験におけるサイトカイン産生プロファイル



イヌにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能: DNAワクチン投与後、それぞれのアレルゲンに対するIgG1およびIgG2が血清中に検出されるようになったが、IgG2レベルはIgG1レベルよりも優位であった(図5)。Der f 2人工感作後におけるアレルゲン特異的IgEレベルは、コントロールベクター投与群に比べ、Der f 2 DNAワクチン投与群において低値を示した。しかし、Zen1人工感作後におけるZen1特異的IgEレベルは、Zen1 DNAワクチン投与群とコントロールベクター投与群との間に有意な差は認められなかった。また、本実験におけるDNAワクチン投与においては、臨床的および病理学的な異常は認められず、その安全性が示された。

図4. イヌにおけるZen1 DNAワクチン投与試験

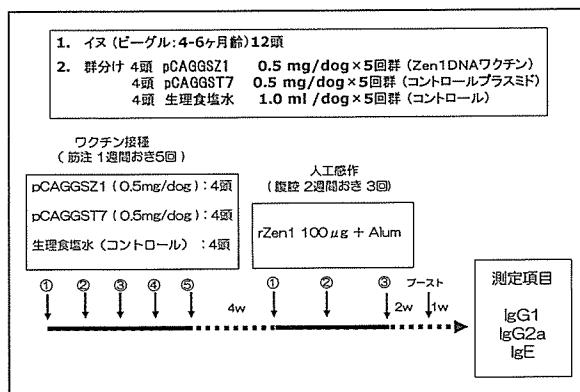
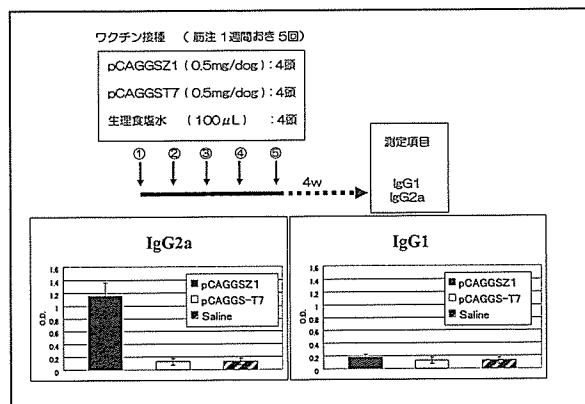


図5. イヌのZen1 DNAワクチン投与試験におけるZen1特異的IgGレベル



D. 考察

Der f 2 DNAワクチンおよびZen1 DNAワクチンは、マウスにおいてそれぞれのアレルギーに対するTh1型の免疫応答を誘導し、IgE産生を抑制することが示された。これらの効果はイヌにおいても部分的に証明された。アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの75%以上はDer f 2またはZen1に感作されていることがわかっているため、この2種類のDNAワクチンを投与することにより、ダ

ニに対するIgE産生を抑制し、その症状を改善できる可能性が示された。また、その安全性の確認により、ダニアレルゲンDNAワクチンはイヌの臨床例に適用可能であるものと考えられた。

E. 結論

ダニアレルゲンを組み込んだDNAワクチンをマウスおよび実験用のイヌに投与したところ、アレルギーに対するTh1型の免疫応答が誘導され、アレルギー特異的IgE産生が抑制された。今後、これらDNAワクチンをアトピー性皮膚炎を発症したイヌに投与し、その臨床的有効性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohmori, K., Masuda, K., DeBoer, D. J., Sakaguchi, M., Tsujimoto, H. Immunoblot analysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in sera from dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115:166-171 (2007).

2. 学会発表

1) Kawarai, S., Shirai, S., Sakaguchi, M., Ohmori, M., Yasuda, N., Yasueda, H., Yanagi, U., Ikeda, K., Tsujimoto, H.: Effect of house dust mite (HDM) avoidance measure on the clinical symptoms in dogs with atopic dermatitis (AD). 63rd American Academy of

- Allergy Asthma and Immunology, Feb 23, 2007 San Diego, California, USA.
- 2) Kawarai, S., Ishihara, J., Masuda, K., Yasuda, N., Ohmori, K., Asami, Y., Tsujimoto, H.: Elimination dietary trails using a newly developed hypoallergenic diet consisting of amino acids and potato in 20 pruritic dogs for diagnosis of food hypersensitivity. European College of Veterinary Internal Medicine–Companion Animal (ECVIM-CA) Congress, Sep 14, 2006, Amsterdam, The Netherlands.
 - 3) 川原井晋平, 石原隼, 増田健一, 安田伸巨, 大森啓太郎, 朝見恭裕, 辻本元: 新たに開発された犬のアレルギー用フード(アミノプロテクトケア)を用いた除去食試験. 第9回日本獣医皮膚科学会学術大会(2006年3月12日、神奈川)
 - 4) 川原井晋平, 白井秀治, 阪口雅弘, 大森啓太郎, 安田伸巨, 増田健一, 安枝浩, 柳宇, 池田耕一, 辻本元: 犬のアトピー性皮膚炎(AD)における低発塵防ダニ寝具を用いた室内環境改善によるコントロール. 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会(2006年5月30日、東京)
 - 5) 津久井利広, 阪口雅弘, 蔵田圭吾, 前田貞俊, 大森啓太郎, 小柳正徳, 増田健一, 大野耕一, 辻本元, 岩淵成紘: 犬のアトピー性皮膚炎におけるコナヒョウヒダニ(*D. farinae*)感作アレルゲンの解析. 第10回日本獣医皮膚科学会学術大会・総会(2007年3月10日、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

スギ花粉およびダニアレルゲン発現菌体ワクチンの開発

分担研究者 小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科教授

研究協力者 秋 庸裕 広島大学大学院先端物質科学研究科助教授
河本正次 広島大学大学院先端物質科学研究科助手

研究要旨：スギ花粉症等のアレルギーは今や国民病であり、効果的治療法の確立が急務である。本研究では食経験により安全性が保証されている乳酸菌などの発酵微生物を宿主として、アレルゲンを発現する菌体ワクチンを開発することを目的とした。スギ花粉主要抗原 Cryj 1 cDNA を強力な乳酸脱水素酵素（LDH）遺伝子プロモーター制御下に LDH 融合遺伝子として挿入した。本発現ベクターにて乳酸菌を形質転換したところ、組換え型 Cryj 1 の発現が全く認められず、本分子を乳酸菌で発現させることが極めて困難であることが判明した。そこで、本分子上で T 細胞エピトープが局在する C 末端領域の遺伝子を組み込んだベクターにて検討したところ、組換え型 Cryj 1 フラグメントの発現が認められた。更に、Cryj 1 塩基配列中のレアコドンを全て乳酸菌型に置換・最適化して本発現系に供したところ、全長 Cryj 1 を良好に発現させることに成功した。続いて、醸造用微生物である麹菌のアレルゲン発現宿主としての有望性を見極めるために、我々が同定した新規スギ花粉アレルゲン分子種の発現を試みた。その結果、3 種中 2 種の抗原において発現に成功すると共に、コドンの最適化によって発現効率が向上することを明らかにした。これらの結果は、従来成功例がなく困難とされてきた組換え型スギ花粉アレルゲンの発現技術に飛躍的なブレイクスルーをもたらすばかりでなく、アレルゲン発現菌体を基調とする花粉症ワクチンの創薬研究にも先鞭をつけることが大いに期待される。

A. 研究目的

スギ花粉症とダニアレルギーは我が国の I 型アレルギー疾患の双壁であり、唯一の根治療法である特異的免疫療法を安全かつ効果的に実施するには、ワクチン抗原に関する基礎的知見の集積はもとより、免疫学的に裏付けられた副作用のない治療法の確立が急務である。その基盤技術として組換え型ワクチンの生産系を確立することは重要であるが、その発現宿主の候補としては、長年の食経験において経口投与の安全性が保証されている醸造・発酵微生物が極めて魅力的である。そこで本研究では、プロバイオティクスや抗アレルギー作用との相乗効果が期待される乳酸菌、あるいは高い異種タンパク質生産性を誇る麹菌を宿主として、アレルゲンを発現する菌体ワクチンを開発することを目的とした。

B. 研究方法

乳酸菌にて構成的高発現を認める乳酸脱水素酵素（LDH）遺伝子プロモーターを有する乳酸菌-大腸菌シャトルベクターに LDH の N 末端ドメイン（LDHN）を挿入し、その下流にスギ花粉主要抗原 Cryj 1 全長または Cryj 1 の C 末端領域（220-374）の遺伝子を

FLAG-tag とともに融合させた。これらのベクターにて乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を形質転換し、組換えタンパク質の発現を anti-FLAG 抗体および抗スギ花粉抽出物抗血清を用いた Western blot 解析により確認した。更に Cryj 1 cDNA 配列中で乳酸菌での使用頻度の低いレアコドンを全て乳酸菌型に置換し、これを上述のベクターに導入して発現量増加の有無を検証した。麹菌発現系では、硝酸塩還元性を賦与する発現ベクターの enolase プロモーター制御下に新規スギ花粉アレルゲン（CPA16/chitinase, CPA39/ β -1,3-glucanase, CPA63/aspartyl protease）の cDNA を His-tag 配列と共に組み込んだ。これを麹菌 *Aspergillus oryzae* に導入して、組換え型アレルゲンの発現を anti-His 抗体を用いた Western blot 解析にて確認した。

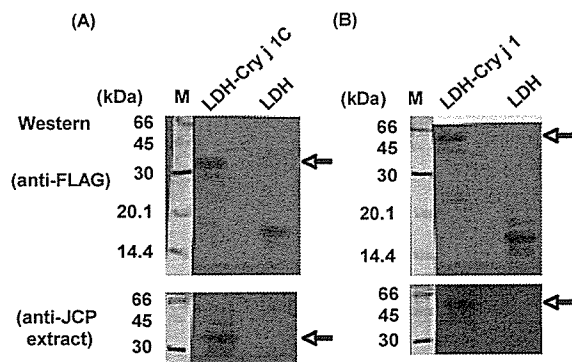
（倫理面への配慮）

該当無し

C. 研究結果

まず LDH プロモーター制御下で融合タグである LDHN タンパク質の発現を確認したところ、*L. plantarum* 菌体内で本分子が顕著量蓄積しているこ

とが認められ、基本的な乳酸菌宿主ベクター系が構築できていることが確認された。しかしながら、本系においてLDHNと主要抗原Cryj1全長からなる融合タンパク質の発現は確認できなかった。また本発現プラスミドを大腸菌DH5αに形質転換したところ、Cryj1をwholeの状態が発現させること自体が大腸菌の段階で既に不可能であることが判明した。これを解決するためにCryj1の主要T細胞エピトープが局在しているC末端ドメインとLDHNからなるキメラ分子を試した結果、*L. plantarum*にて発現が確認された(図1A)。更に、Cryj1配列中のレアコドン全てを乳酸菌型に改変して発現解析を行ったところ、全長Cryj1を菌体内に発現させることに成功した



(図1B)。

図1. 乳酸菌 *L. plantarum* における LDH 融合型 Cryj1 の発現 (A) Cryj1 C 末端ドメイン (220-374); (B) 全長 Cryj1 (コドン置換体)

麹菌発現系においては、組換え型 CPA39/ β -1,3-glucanase ならびに CPA63/aspartyl protease の安定な菌体内発現を認めた(図2A)。また、CPA63について使用コドンを全て麹菌型に置換・最適化したところ、その発現効率が向上することが明らかとなった(図2B)。

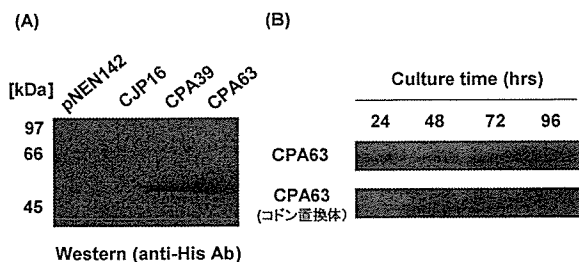


図2. 麹菌 *A. oryzae* における新規スギ花粉アレルゲンの発現 (A) CPA39/ β -1,3-glucanase および CPA63/aspartyl protease の発現 (B) コドンの最適化による組換え型 CPA63 の発現効率の向上

更に菌体ワクチンの薬効を評価する *in vivo* 病態モデル作りに向けた端緒として、アレルゲンの腹腔内投与と点鼻を基調とするマウス鼻炎モデルを確立するとともに、whole-body plethysmography による呼吸頻度の非侵襲的測定値が鼻炎症状を評価する上で有用な病態マーカーとなりうることを確認した。

D. 考察

今回、LDH 融合タンパク質発現系や使用コドンの最適化などの独自手法を組み合わせることにより、組換え型 Cryj1 を乳酸菌にて発現させることに初めて成功した。この結果は今後のアレルゲン発現菌体ワクチン開発へと大きな弾みをつけるものであるばかりでなく、これまで本邦で成功例が殆どなかった Cryj1 の発現技術そのものにも革新的なブレークスルーをもたらすものであると考えている。今後、同様の手法を用いることにより、発現の困難な他のスギ花粉アレルゲン分子種の生産も乳酸菌で達成できることが期待される。今回、菌体内に発現蓄積させるシステムを試したが、今後は菌体表面に抗原をディスプレイさせるなど、腸管局所の樹状細胞に貪食されやすい最適な発現系を模索・検討していく必要もあろう。

麹菌を宿主としたスギ花粉アレルゲン発現系については、今回の初期検討でも十分に組換え菌体の作製に有用であることを実証できた。現在これを更に凌駕する高発現ベクターの構築を試みており、Cryj1 発現菌体の作製にも着手したい考えである。更にダニアレルゲン発現菌体についても主要抗原を念頭に乳酸菌・麹菌の両系にて作製していく予定である。菌体ワクチンの効果を検証する動物病態モデルについても主要抗原 Cryj1 をアレルゲンとした花粉症モデル構築への本格検討に既に入っており、この感作条件が決まり次第、今回作製した Cryj1 発現乳酸菌ワクチンの経口投与試験を行う予定である。

E. 結論

スギ花粉主要抗原 Cryj1 を良好に発現する組換え乳酸菌の開発に本邦で初めて成功した。更に、麹菌が組換え型スギ花粉アレルゲンの発現系として優れた宿主であることを明らかにした。

F. 謝辞

乳酸菌宿主ベクター系につきご支援・ご指導を賜りました山下光雄先生(大阪大学大学院工学研究

科助教授)、ならびに麹菌発現系につきご教示を賜りました岩下和裕先生(酒類総合研究所主任研究員)に厚く御礼申し上げます。また本研究にご尽力頂きました立川健治氏、および岡野宏明氏(本学大学院先端物質科学研究科博士課程前期)に心より感謝の意を表します。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawamoto S., Oshita M., Fukuoka N., Shigeta S., Aki T., Hayashi T., Nishikawa K., Ono K. (2006) Decrease in the allergenicity of Japanese cedar pollen allergen by treatment with positive and negative cluster ions. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **141**: 313-321.

2) Oomizu S., Onishi N., Suzuki H., Ueda K., Mochizuki M., Morimoto K., Kawamoto S., Ono K., Kameyoshi Y., Hide M. (2006) Oral administration of pulverized Konjac glucomannan prevents the increase of plasma IgE and IgG levels induced by the injection of syngeneic keratinocyte extracts in BALB/c mice. *Clin. Exp. Allergy* **36**: 102-110.

3) 河本正次、秋 庸裕、小埜和久 (2006) 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* **13**: 340-344.

4) 林 鷹治、林 賢、小埜和久、菅野雅元 (2006) 免疫治療におけるスギ花粉抗原反復注射とダニ抗原反復注射による Th1/Th2 細胞応答の違いについて *アレルギー科* **21**: 308-320.

2. 学会発表

1) 崔 智英、秋 庸裕、磯部敏秀、平川規子、河本正次、津久井利広、岩淵成紘、辻本 元、小埜和久 アトピー性皮膚炎発症イヌにおけるダニ由来感作抗原の網羅的解析 日本農芸化学会 2006 年度大会 (平成 18 年 3 月 26 日-28 日、京都)

2) 磯部敏秀、秋 庸裕、河本正次、麻奥良子、林 鷹治、小埜和久 新規グループ 2 ダニアレルゲン 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 18 年 11 月 2 日-4 日、東京)

3) Ibrahim Ahmed Ragaa Nour、河本正次、島田弥生、力丸智史、大磯 勲、秋 庸裕、橋本邦彦、小埜和久 Identification of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to aspartyl protease. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 18 年 11 月 2 日-4 日、東京)

4) 黒田美沙子、秋 庸裕、森 啓太、島田弥生、力丸智史、大磯 勲、河本正次、重田征子、橋本邦彦、小埜和久 β -1,3-glucanase 活性を有する新規スギ花粉アレルゲン 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 18 年 11 月 2 日-4 日、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 小埜和久、秋 庸裕、河本正次、崔 智英 新規ダニアレルゲン 特願 2006-068146

2) 小埜和久、秋 庸裕、河本正次、磯部敏秀 新規ダニアレルゲンおよびその利用 特願 2006-215082

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

プロテアーゼ活性を消去した組換えダニ主要アレルゲン改変体投与による予防的IgEトランスの誘導

分担研究者 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

研究要旨

近年、アレルゲンの機能（酵素活性など）と疾患発症の関連性を示唆する実験結果が報告されている。アレルゲンとなる物質自身にアレルギー疾患の誘導あるいは増悪を促進する活性が内包されているのであれば、それを標的とした治療や改変型ワクチンを新たに考案することは重要である。

我々は、システインプロテアーゼであるダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1の活性中心残基を改変のターゲットとして、プロテアーゼ活性を完全に消失した変異体を作製した。マウス免疫実験において本変異体はIgE/IgG誘導活性をほぼ完全に消失していたばかりでなく、本変異体を前投与した後にプロテアーゼ活性を保持した組換えDer f 1を投与して感作を試みても、Der f 1特異的IgE/IgGが誘導されなかった。すなわち、免疫寛容が誘導されていることがわかった。全体的な高次構造を保持しているにも関わらず抗原特異的IgE/IgG誘導活性を持たず、さらにその原因が免疫寛容によるものである、という変異アレルゲンの事例は我々の知る限り存在しない。本変異体は全く新しいコンセプトに基づくワクチンといえよう。今回、予防的アプローチにおいてワクチンとして機能することを示した。

A. 研究目的

「構造」と「機能」を有したタンパク質としてアレルゲンをとらえる視点に立ち、アレルゲン特異的免疫療法（減感作療法）のための改変型アレルゲンワクチン創製を目的として研究を進めている。ダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1及びDer p 1のプロテアーゼ活性は少なくとも3通りの方法すなわち、組織のバリア機能低下、種々の細胞の刺激、免疫系の修飾、によってIgE/Th2誘導に関与する可能性が示唆されている。アレルゲンとなる物質自身にアレルギー疾患の誘導あるいは増悪を促進する活性が内包されているのであれば、それを標的とした治療や改変型ワクチンを新たに考案することは重要である。以前の我々の研究において、天然型と同等の患者IgE結合活性、分子量、プロテアーゼ活性を保持したDer f 1及びDer p 1の活性型組換え体を調製に成功し、マウス免疫実験によってそのプロテアーゼ活性がIgE及びIgG誘導に重要であることを示唆する予備的データを得た。本年度は、この現象の再現性等を確認するとともに、プロテアーゼ活性の消去によ

る抗体誘導能の消失が、単に抗原性の低下によるものなのか、あるいは免疫寛容の誘導によるものなのかを検討した。

B. 研究方法

プロテアーゼ活性を保持した組換え体は、既に確立した系を利用して調製した。プロテアーゼ活性中心のアミノ酸残基に変異を導入しプロテアーゼ活性を消失させた変異体を高純度精製した。感作実験として、プロテアーゼ活性を有する組換え体、これをインヒビター処理した標品、プロテアーゼ活性を消去した変異体、あるいは緩衝液のみをアラムとともにマウスに免疫した。予防実験として、変異体あるいは緩衝液のみをアラム一定期間腹腔免疫し（前処置）、その後プロテアーゼ活性を有する組換え体を免疫した（感作）。経時的に血清を採取して各種抗体価を解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は動物実験施設指針に則り実験を行った。

現時点では特にはない。

C. 研究結果

感作実験において、プロテアーゼ活性を有する組換え体による感作では抗原特異的IgE及びIgGが誘導されたが、プロテアーゼ阻害剤で処理した標品では顕著に低く、プロテアーゼ活性を消去した変異体ではほとんど誘導されなかった。予防実験において、変異体で前処置した実験群に、その後プロテアーゼ活性を有する組換え体を投与しても、抗原特異的IgE及びIgGの誘導がほぼ完全に阻止された（IgG2aは若干の誘導がみられた）。用いた変異体の凝集あるいはタンパク質構造の変性は観測されなかった。プロテアーゼ活性を有する組換え体による感作によって抗体が誘導されたマウスの血清中抗体結合阻害実験及び脾臓細胞刺激実験によって、変異体はB細胞エピソード及び（少なくとも主要な）T細胞エピソードを保持していることを確認した。

D. 考察

感作実験の結果から、本実験系のマウス感作過程においてプロテアーゼ活性が抗体誘導に決定的に重要であることが示唆された（データの一部は *J Immunol* 2006;177:1609-1617に発表）。さらに、予防実験の結果から、変異体の投与は免疫寛容を誘導していることが示唆された。感作実験でプロテアーゼ阻害剤で処理した標品及び変異体の投与では抗体誘導が顕著に低減した理由がこれにより説明できる。プロテアーゼ活性依存的な感作のメカニズム、及び変異体投与によるユニークな予防的免疫寛容の誘導のメカニズムは興味深い、現時点では不明である。

IgEを誘導しやすい免疫手法として利用されるアラムを用いた腹腔投与の系で、全体的な高次構造を保持しているにも関わらず抗原特異的IgE/IgG誘導活性を持たず、さらにその原因が免疫寛容によるものである、という変異アレルゲンの事例は我々の知る限り存在しない。本変異体は全く新しいコンセプトに基づくワクチンといえよう。今回、予防的アプローチにおいて強力なワクチンとして機能することを示した。引き続き再現性を含めた本変異体による予防効果の検証、治療的アプローチの検討、さらに、構築したマウス実験系を利用して、現在調製法を検討中の組換えスギ花粉主要アレルゲンについても検討を開始したい。

E. 結論

プロテアーゼ活性を除去したDer f 1変異体はIgE誘導活性を持たないばかりでなく、免疫寛容を誘導した。予防的アプローチにおいて強力なワクチンとして機能することを示した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kikuchi Y, Takai T, Kuhara T, Ota M, Kato T, Hatanaka H, Ichikawa S, Tokura T, Akiba H, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p 1 to sensitization towards IgE and IgG responses. *J Immunol* 2006;177:1609-1617.
- (2) Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, Mitsuishi K, Okuda M, Kato T, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H.: Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite allergen Der f 1. *J Invest Dermatol* 2006;126:2719-2723.
- (3) Kikuchi Y, Takai T, Ota M, Kato T, Takeda K, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Application of immunoreaction enhancer solutions to an enzyme-linked immunosorbent assay for antigen-specific IgE in mice immunized with recombinant major mite allergens or ovalbumin. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:322-330.

2. 学会発表

- (1) Kikuchi Y, Takai T, Kuhara T, Ota M, Kato T, Hatanaka H, Ichikawa S, Tokura T, Akiba H, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p 1 to sensitization towards IgE and IgG responses. 2006年、12月。日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
- (2) Takai T. Young Seminar: Structure and function of allergens and their relationship with the pathogenesis of allergy. 2006年、11月。日本アレルギー学会（東京）。
- (3) 小川尊資、高井敏朗、加藤武、菊地夕子、池田志孝、奥村康、小川秀興。Der f 1 及び Der p 1 刺激によるケラチノサイト活性化と皮膚由来プロテアーゼインヒビターによる制御。2006年、

11月、日本アレルギー学会（東京）。

- (4) 菊地夕子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、太田幹子、畠中秀樹、戸倉智子、光石幸市、奥村康、小川秀興、池田志幸。組換え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、マウス腹腔免疫での IgE 産生へ及ぼす影響
2006年、5,6月。日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし