

## 臍帯血の抗原特異的低親和性 IgE の検出と、生後の Affinity Maturation が関与する アトピー性皮膚炎の発症と、その予防

研究分担者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授

### 研究要旨

最近我々が開発した高密度に抗原を固定化したアレルゲンマイクロアレイを用いて、今年度は臍帯血と出生後の抗原特異的 IgE の定量とその性状解析を実施した。研究には、臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の血液中に測定可能な量の抗Ovomucoid IgE抗体を持つ検体を材料として用いた。その結果、臍帯血の抗原特異的 IgE抗体は全て低親和性抗原特異的 IgE抗体の性状を示し、ヒトFcγR1を介する肥満細胞からのヒスタミン遊離を引き起こさなかった。一方生後6-14ヶ月では、高親和性抗原特異的 IgE抗体の性状を示し、ヒスタミン遊離シグナルが検出された。このことから、出生時の低親和性抗原特異的 IgE抗体は、生後6-14ヶ月までに抗原刺激を受けて高親和性抗原特異的 IgE抗体に変化することが明らかになった。このことは、生後6-14ヶ月までの抗原刺激を避けることで、アレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性が示唆された。

### 研究協力者

亀村 典夫 徳島大学  
疾患酵素学研究センター  
特任助教  
杉本 眞弓 徳島大学病院 小児科  
特任助教

研究の目標としている。

最近我々は、高密度に抗原を固定化したアレルゲンマイクロアレイの作成に成功し、抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA の高感度定量法を確立した。本年度は、IgE の高感度定量法を用いることで、これまで検出することのできなかった臍帯血中の抗原特異的 IgE の検出が可能となり、抗原との Affinity 解析を実施し、乳幼児のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症と IgE の Affinity Maturation との関係を考察した。解析の結果、抗体産生課程で最初に低親和性抗体ができてその後繰り返される抗原刺激によって Affinity Maturation が起きて、アレルギーの発症に結びつく高親和性 IgE に成熟すると推定されていたが、臍帯血中に低親和性抗原特異的 IgE 抗体が存在していることを初めて証明することに成功した。さらに、この低親和性 IgE 抗体は生後6-14ヶ月で Affinity Maturation することが判明し、乳幼児のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症との関係を考察した。

### A. 研究目的

従来のアレルギー、アトピーに対する血液検査は、血液中の抗原特異的 IgE 検査への依存度が高く、アレルギーの病状、進展状況、アレルギーの治療、さらにはアレルギーの予防を考察する上で必ずしも十分とは言えない。従来の IgE 測定法を取ってみても、測定感度が低くそのため高感度化の試みが近年なされている。またアレルギー、アトピーの発症の基盤には、IgE 以外の生体分子として体内の抗原特異的 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA、さらには抗原分子が関与していることから、これらの因子を総合して病像の理解をすることが必要である。本研究では、抗原特異的 IgE を含む様々な抗体群と抗原を高感度に定量測定して、その生理的、病態医学的解析を試みることを

## B . 研究方法

我々は、シリコンあるいはガラス基板、Diamond-like carbon ( DLC ) 処理基板の表面を高密度にジカルボン酸、またはポリカルボン酸で化学修飾することによって、アミノ基を持つアレルゲンを高密度に共有結合で固定化する方法を開発したことから、微量の抗原特異的 IgE を高感度に検出することに成功した ( Anal Chim Acta 2011; 706: 321-327 )。本研究ではこれを用いて、臍帯血中の抗原特異的低親和性 IgE 抗体の検出を行った。使用した検体は、2004 年から 2005 年にかけて岐阜大学で行われた岐阜アレルギー免疫コホート研究の検体を使用した。同一乳児で臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢の検体がそろっている検体の中から、卵白特異的 IgE 抗体が全ての時期で検出される検体 ( 37 検体 ) の中から、さらに全ての時期で抗 Ovomuroid ( OVM ) IgE 抗体価が、上記検査方法で有意に検出可能な  $\geq 20$  Binding Unit IgE ( BUe ) / mL を示す 9 名の乳児検体を用いて検証した。

## C . 研究結果

アレルギー、アトピーの病歴を持つ母親から生まれる子供の大半は、胎児期から抗原特異的 IgE が検出されることをこれまでに報告してきた ( J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 113-121 )。一方、胎児血や臍帯血にはアレルギー反応を起こすレベルのアレルゲンが存在する事が報告されているが、胎児のアトピー、食物アレルギーの報告はない。これらの事から、臍帯血の抗原特異的 IgE がなぜアレルギーの発症に結びついていないのかを調べるため、その性状を解析した。なお今回は図 1 に示す如く、抗 OVM IgE 抗体を保有する 9 名の乳児の臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体を用いた。

### 1. 臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体における抗 OVM IgE 抗体の OVM との結合親和性の測定

図 2 に示すように、OVM を搭載したアレ

ルゲンチップへの抗-OVM 特異的 IgE の結合反応を競合阻害する OVM の阻害濃度のパターンから、臍帯血の OVM 特異的 IgE は 6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて競合阻害感度が低いことが判明した。50% 結合阻害を示す OVM の濃度は、臍帯血の  $3.1 \pm 0.8$  nM に比べて 6 ヶ月、14 ヶ月血ではそれぞれ  $0.9 \pm 0.2$  nM、 $0.9 \pm 0.3$  nM と有意 ( $P < 0.01$ ) に低値を示した。このことは、臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて低親和性で生後高親和性に変化していることが示された。さらに、これまで低親和性 IgG の証明に使用されてきた蛋白質変性剤の diethylamine ( DEA ) ( 10-40 mM ) の添加実験でも、図 3 に示すように臍帯血の IgE は 6 ヶ月、14 ヶ月血の IgE に比べて DEA 処理による OVM への結合力の低下が著しく、この実験でも臍帯血 IgE は DEA に対して脆弱であると共に、OVM への低親和性が確認された。具体的には、検体の希釈系列で得られる最大結合値の 50% を示す検体希釈倍率において、臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、10, 20, 40 mM の DEA 存在下における最大結合値の 50% を示す希釈倍率は、6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて有意 ( $P < 0.01$ ) に増大しており、DEA によって結合親和性が影響の受けやすい脆弱な検体であることが判明した。

### 2. OVM と抗 OVM IgE 抗体存在下におけるヒスタミン遊離シグナルの検証

Fc R1 を介する肥満細胞のヒスタミン遊離シグナルは、Rat Basophilic Leukemia ( RBL ) 細胞で再現されている。この RBL 細胞にヒトの Fc R1 を導入し、ヒスタミン遊離シグナル伝達系にルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞類似した測定系 ( RS-ATL8 ) を使用して、臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢乳児の抗-OVM 特異的 IgE 抗体のシグナル伝達系を検証した。OVM との低結合親和性を示した臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、1 pM、10 pM、100 pM、1 nM、10 nM の OVM 抗原をチャレンジしてもルシフェラーゼレポーターは活性化しなかった。一方、6 ヶ月、14 ヶ月血

の OVM 特異的 IgE 抗体の場合は、1 pM、10 pM、100 pM の OVM 抗原のチャレンジで、抗原濃度に依存したルシフェラーゼの増加が観察された。100 pM、1nM、10 nM の OVM 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

以上の結果から、臍帯血は低親和性抗原特異的 IgE のために肥満細胞でのアレルギー反応は抑制されているが、生後 6 ヶ月から 14 ヶ月までの間に繰り返される抗原感作によって、OVM 特異的 IgE 抗体は Affinity Maturation を起こしてアレルギー、アトピーを引き起こす可能性が推定された。

#### D . 考察

本研究によって、これまで理論的には低親和性抗原特異的 IgE の存在が提唱されていたが、ヒトの臍帯血 IgE で初めてその存在が証明された。この IgE は抗原との親和性が低く、肥満細胞の Fc R1 に結合してもヒスタミン遊離シグナル伝達を引き起こさないことが判明した。このことは、胎児血や臍帯血にはアレルギー反応を起こすレベルのアレルゲンが存在するにもかかわらず、胎児にアトピー、食物アレルギーがないのは、胎児血や臍帯血の抗原特異的 IgE が低親和性のためと推定された。

一方 6 ヶ月、14 ヶ月齢乳児血の高親和性 OVM 特異的 IgE 抗体は、Hyper Mutation による Affinity Maturation の結果と考えられ、これらの抗体を持つ乳児のアトピー、食物アレルギーの発症に関与していると推測された。低親和性抗体から高親和性抗体への変化は、繰り返される抗原刺激による Hyper Mutation の結果であることから、生後 6 ヶ月までの間の抗原刺激を避けることでアレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性が示唆される。抗原刺激では、消化酵素による消化を受けない抗原が最も強い抗原刺激性のあることから、抗原の経皮感作が Hyper Mutation の有力なきっかけになる

と推定された。

#### E . 結論

臍帯血の抗原特異的 IgE 抗体は、低親和性抗原特異的 IgE 抗体で、肥満細胞からのスタミン遊離を引き起こさない。しかし、生後 6 - 14 ヶ月までの間に、低親和性 IgE 抗体は高親和性 IgE に成熟することが推定された。このことから、生後 6 - 14 ヶ月までの抗原刺激を低下させることでアレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性を示唆した。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表 (平成 25 年度)

< 論文発表 >

1. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K: Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. **J Allergy Clin Immunol** 131 (2), 590-592, 2013.
2. Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H: Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. **J Allergy Clin Immunol** 133 (3), 904-905, 2014.

< 学会発表 >

1. 亀村典生, 川本典生, 深尾敏幸, 近藤直実, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: 出生から生後14ヶ月までの食物抗原特異的抗体価の変動についての検討. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
2. 品原和加子, 澤淵貴子, 亀村典生, 窪田賢司, 鈴木宏一, 木戸博: カルボキシル化DLC抗体チップを用いたアレルギー性食物抗原の高感度定量測定. **第25**

**回日本アレルギー学会春季臨床大会**、  
横浜、2013. 5. 11- 12.

3. 木戸博、亀村典生、多田仁美、品原和加子、鈴木宏一、窪田賢司: アレルギーの診断、発症、寛解の病態評価に必要な血液と粘膜の抗原量の新規高感度定量測定. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**、横浜、2013. 5. 11- 12.
4. 窪田賢司、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、大矢幸弘、森田英明、市岡隆男、木戸博: 患者の採血負担を最小限にした低侵襲性高感度DLCマルチアレルギーチップの有用性. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**、横浜、2013. 5. 11- 12.
5. 品原和加子、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、窪田賢司、木戸博: アレルギー診断・発症・寛解の病態評価に必要な血中アレルギー量の新規高感度定量測定法. **第63回日本アレルギー学会秋季学術大会**、東京、2013. 11. 28- 30.

## H . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

< 特許取得 >

1. 特許第 5322240 号、アレルギー疾患の判定方法及びアレルギー疾患の判定キット、特許権者、国立大学法人徳島大学、発明者、木戸博、多田仁美、澤淵貴子
2. 特許第 5322242 号、ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチドの固定化方法、特許権者、国立大学法人徳島大学、発明者、木戸博、多田仁美、澤淵貴子
3. 特許第 5342997 号、アレルギー疾患の判定方法、特許権者、国立大学法人徳島大学、オリエンタル酵母工業株式会社、木戸博、鈴木宏一

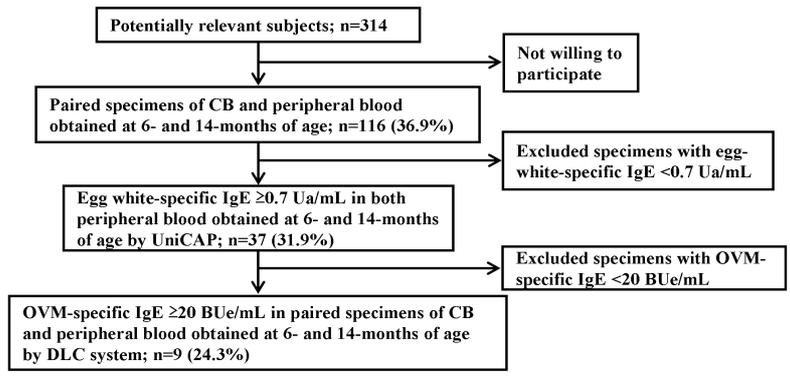


図1、検体測定に用いた患者群。抗 OVM IgE 抗体を保有する 9 名の乳児の臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体を用いた。

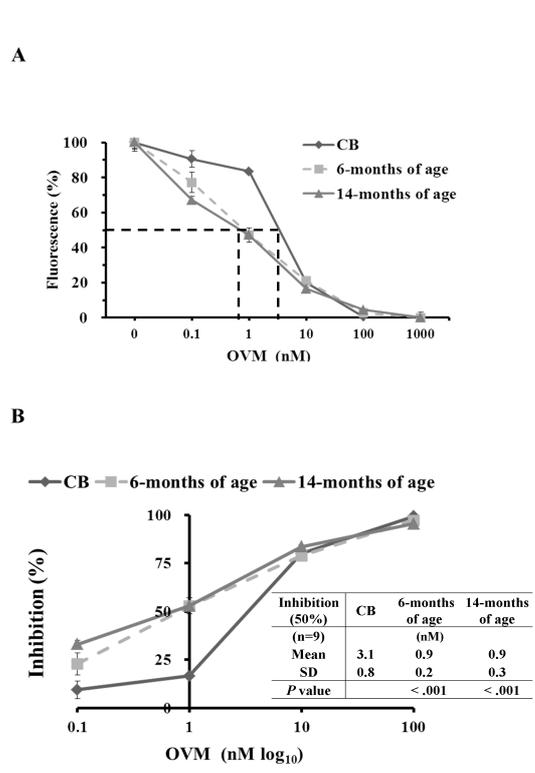


図2、OVM 固相化基板への抗 OVM IgE 抗体の結合反応における種々の濃度の OVM による結合の競合阻害反応(A)。各検体に対する 50%結合阻害に要する OVM 濃度(B)。

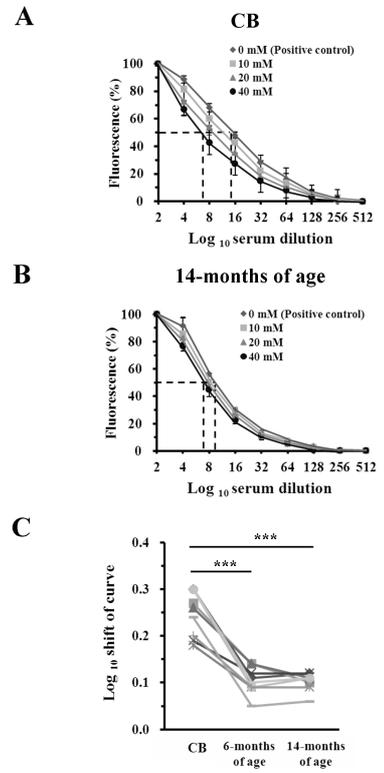
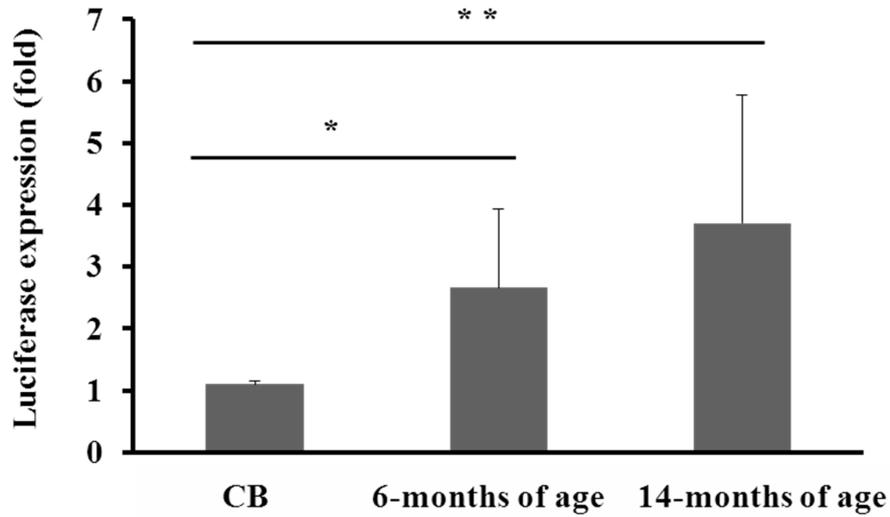


図3、臍帯血検体(A)、14ヶ月齢検体(B)の DEA による抗 OVM IgE 抗体の OVM 固相化基板への結合阻害効果と、DEA 存在下における臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢検体の 50%結合に要する検体の希釈倍率(C)。



**図4**、臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の抗-OVM特異的IgE抗体のFcγR1を介するシグナル伝達の検証

ヒトのFcγR1を導入し、ヒスタミン遊離シグナル伝達系としてルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞類似系(RS-ATL8)を使用して、1 nMのOVM抗原存在下に各検体のヒスタミン遊離シグナル伝達系を検証した。測定値は、OVMの無い無刺激時の値を1として臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の血液の値を示した。なお、各検体は抗-OVM特異的IgE抗体価として100 BUe/mLに合わせて評価した。