

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

**微量検体による抗原量と抗原特異抗体の高感度定量法の開発、
予防に向けた抗原 affinity maturation の抑制**

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

体内へ侵入する抗原による繰返しの感作によって、抗原特異的抗体の一連のクラススイッチと、各抗体種で Low から High Affinity へと成熟変換すると予想される。アレルギー、アトピーの発症には、High Affinity IgE が関与すると推定されるが、病態を正確に把握するためにはどの時期に、どのような経路で抗原が体内に侵入するかについての検証と、体内に侵入した抗原量の定量、どのような Affinity を持つ抗体種が体内に存在しているかを明らかにすることが必要である。現状の測定法では、遊離抗原と抗原-抗体複合体の抗原量を未だ正確に測定することはできない。本プロジェクトでは、Low から High Affinity IgE 変換時期の追跡調査と、母乳と血液中の抗原量測定法の開発を試みた。その結果、臍帯血で発見された Low Affinity IgE が乳幼児期でも見いだされる事、経口減感作療法では Low Affinity IgE は急速に減少して High Affinity に変換するが、IgE 量は減少することが見いだされた。さらに母乳中の抗原量測定では、抗原-抗体複合体から抗原を遊離させ、すでに遊離状態で存在している抗原と共に、ほぼ正確に抗原量を測定する方法として抗体アレイが有用と判定された。

研究協力者

亀村 典夫 徳島大疾患酵素学研究
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

とから、これらの因子を総合的に解析して病態を理解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研究の目標としている。

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、図 1 に示すように、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

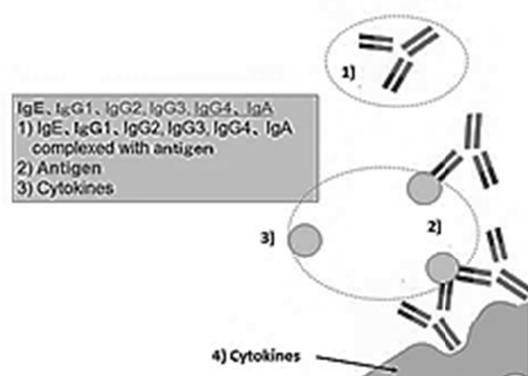


図 1 . アレルギー発症に関与する因子群

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 (Densely carboxylated protein chip: DCP chip) 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。この方法を使用することで、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、抗原との Affinity 解析が可能となった。食物アレルギーと IgE の Affinity Maturation との関係解析の結果、最初に低親和性抗体ができ、その後繰り返される抗原刺激で Affinity Maturation が起きて、高親和性 IgE に成熟して発症に至ることが明らかになった。

本年度の研究では、繰り返しの抗原刺激を、母乳中の抗原と経皮膚に想定して、母乳、血液、皮膚、環境中の抗原を高感度に測定する技術開発を実施した。さらに、卵アレルギーの小児を対象とした経口減感作療法時の抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA の変動と、抗原 Affinity の変化を追跡した。

B . 研究方法

ガラス基板 DCP チップを用いて、抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 測定と、抗アレルゲン抗体を固定化した抗体アレイで、血液、母乳中のアレルゲンの高感度定量法の開発を試みた。また、アレルゲン DCP チップを用いて、低親和性 IgE と高親和性 IgE 抗体の定量法を検討した。

C . 研究結果

本年度は、①母乳、血液、皮膚、環境中の抗原を高感度に測定する技術開発として、ガラス基板 DCP チップ上に抗原特異的 IgG 抗体を固定化したマイクロチップの開発と、アレルギーの予防と治療のための診断法の開発として、アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点と、抗原 Affinity の観点から解析する技術開発をめざした。

1) 母乳、血液、皮膚、環境中の抗原量測定技術の開発

微量の生体材料中の抗原でも定量可能な技術として、図 2 に示すようなガラス基板 DCP チップに抗原特異的 IgG 抗体を固定

化したマイクロチップの開発を実施した。抗原には食品に含まれる抗原として最もアレルギー発症の頻度の高い卵、乳、小麦、えび、かに、落花生から、Ovomucoid (OVM), Ovalbumin (OVA)、Casein、-Lactoglobulin、Gluten、Gliadin、えび、かに Tropomyosin、落花生の Ara h1, Ara h2、そば抗原、の各抗原をウサギに免疫し、得られた血清から各抗原特異的抗体を抗原アフィニティーで精製した。精製抗体を 1mg/mL の濃度まで濃縮して、抗体アレイに共有結合で固相化した。図 3 に示すように、それぞれの抗体は 0.5 ng/mL から 50-80 ng/mL の定量感度を得た。現在、この抗体アレイを用いて、母乳、血液、口周囲の皮膚からのぬぐい液に含まれる各種抗原の定量を試みている。母乳中の OVA 抗原の測定については、遊離型抗原以外に SIgA 結合型抗原の存在が知られているが、SIgA からの抗原の遊離にほぼ成功しており、定量的測定の方向性が明らかになった。しかし、血液中の IgG 結合型抗原については、部分的な抗原しか回収に成功しておらず今後さらなる検討が必要である。

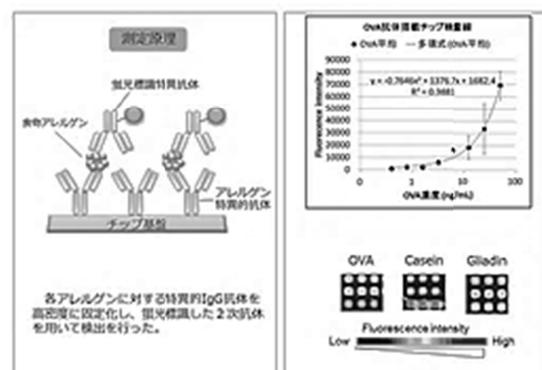


図 2 . 抗体固定化 DCP チップでのアレルゲン検出

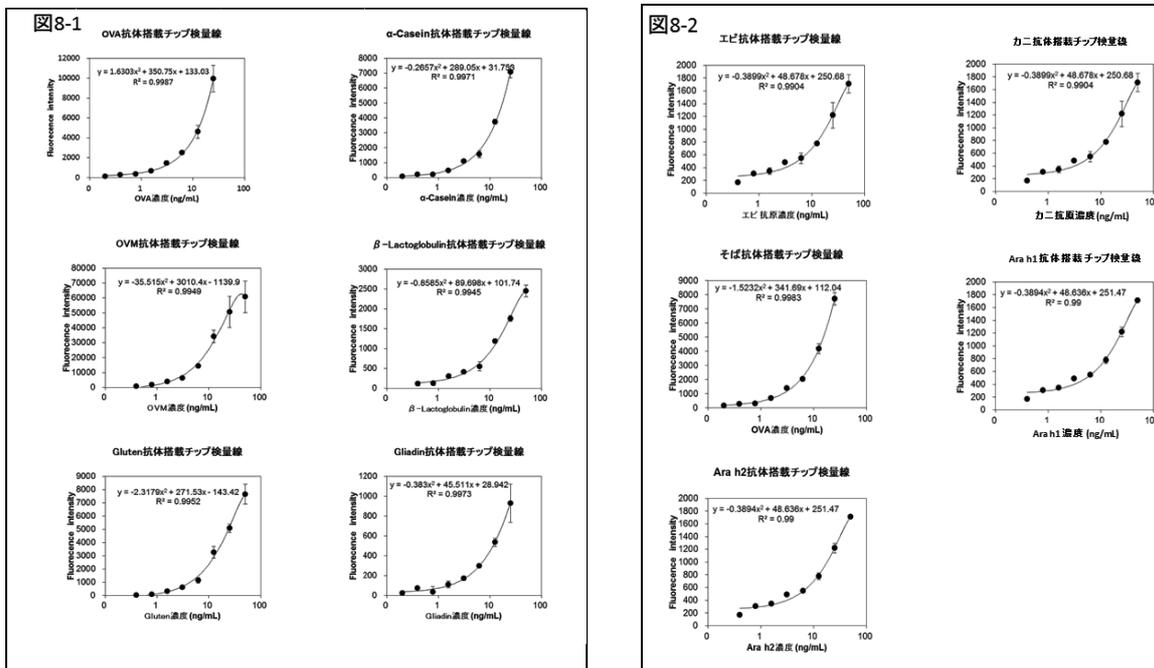


図3 . 各種抗原特異的 IgG を搭載したアレイでの抗原量の定量

2) アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点と、抗原 Affinity の観点から解析する技術の開発

図4に示すようにアレルゲン感作によって、体内の免疫系は刺激され、IgM から直接 Low affinity IgE が産生される系と、IgM-IgG3-IgG1 から High affinity IgE が産生される系、さらにアレルギーを抑制する IgG1-IgG2-IgG4 の産生系に分けることができる。体内の免疫系が、上記のいずれの状態にあり、いずれの方向に向かっているかを判定することは、アレルギーの予防と治療を考える上で重要である。図5には、アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点から調査した結果を示す。アレルギー患者を入院下に、卵の接種量を少量から徐々に増加させることで、減感作前(T0)に比べて約1月後には1個のゆで卵を食べるように治療してから(T1)、3ヶ月(T2)、6ヶ月(T3)、12ヶ月(T4)の間、卵1個を維持量として継続投与した結果である。この間抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA をモニターした。

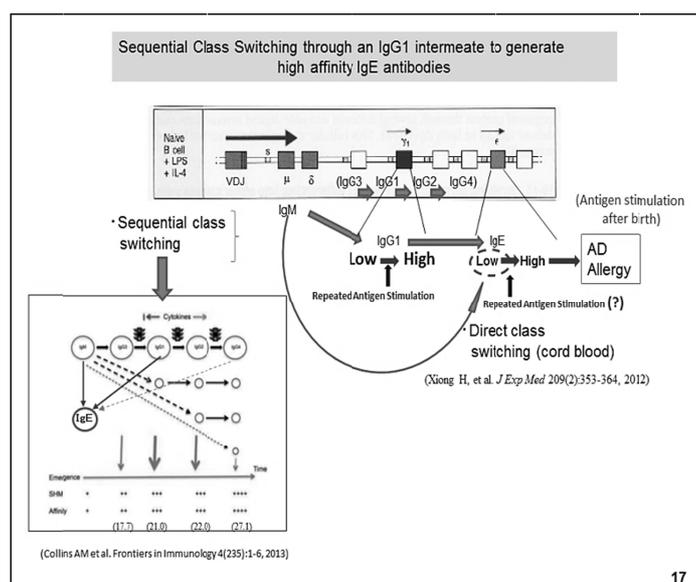


図4 . クラススイッチと Low affinity IgE, High affinity IgE の産生機序

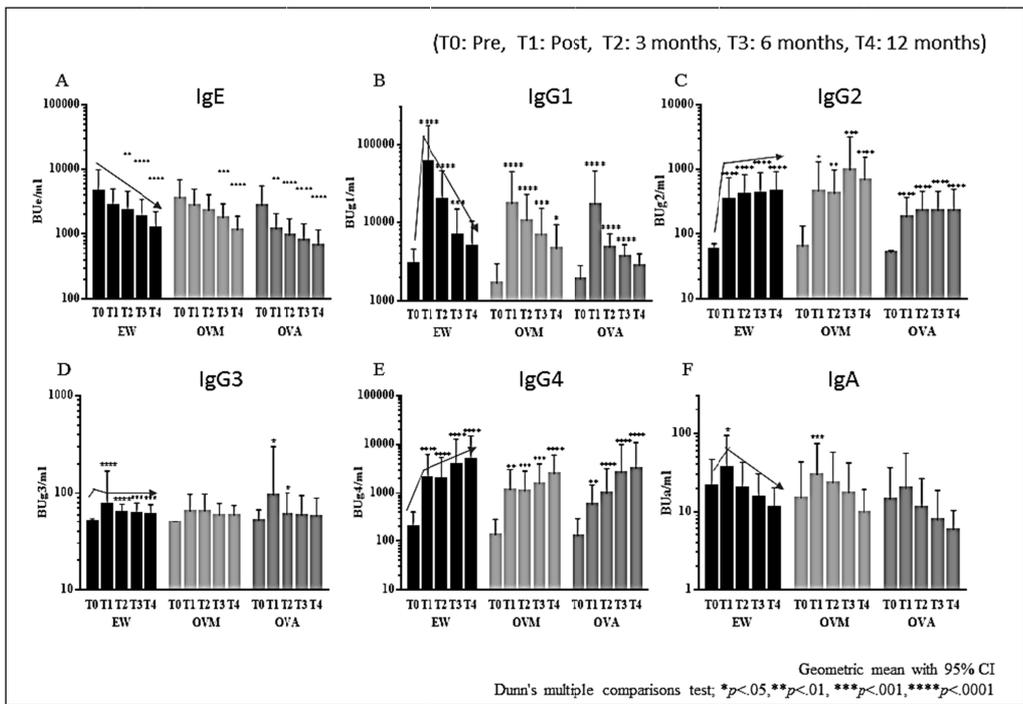


図5 . 卵減感作療法の経過に伴う抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA のモニター

その結果、近接する遺伝子座にある起炎性の IgG3-IgG1 抗体は T1 期以降低下傾向を、抗アレルギー性を示す IgG2-IgG4 抗体は T1 期以降増加傾向を示した。IgA は T1 期で軽度の増加後低下傾向を示し、IgE は T0 以後低下傾向を示した。患者群の中でも維持期にゆで卵 1 個を維持できた目標達成患者群（減感作成功群）と、アレルギー症状が増悪したため卵 1 個を維持できずに減量するか完全除去に至った群（減感作不成功群）との比較を図 6 に示す。減感作成功群と不成功群の明確な違いが明らかになった。減感作成功群では、免疫応答性が良く、経口抗原接種によりクラススイッチが IgG3-IgG1-IgG2-IgG4 へと進んだ群で、減感作不成功群では免疫応答性が不十分で、クラススイッチが進んでいないことが判る。特に急速減感作終了後の約 1 月 (T1) 後に、IgG1 の増加が著しいことが、減感作の予後判定に重要であることが示唆された。

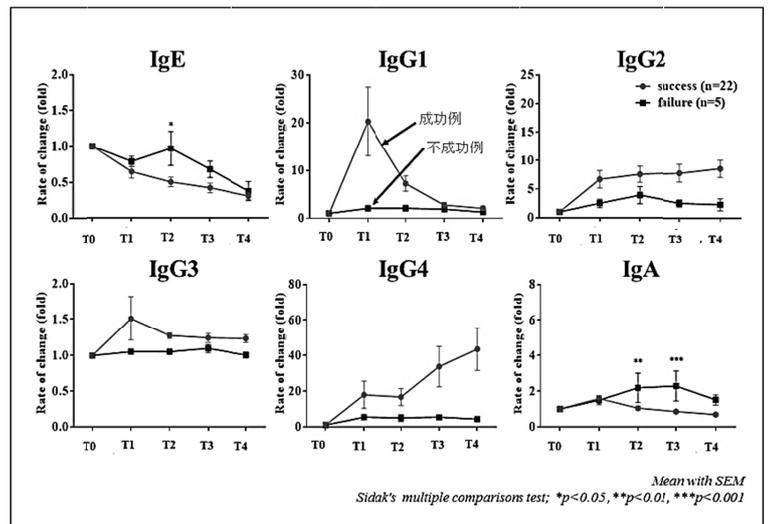


図6 . 卵減感作療法の経過に伴う減感作成功群と不成功群の各種抗体価の推移
減感作前(T0)の抗体価を 1 と表示している。

これらの卵の経口減感作療法を実施した患者の Low affinity IgE の存在比を図 7 に示す。Low affinity IgE は、40 mM の diethylamine (DEA) 存在下に抗原との結合活性を著しく減弱させることから、40 mM DEA のあり無しで Low affinity IgE 量をモニターした。その結果、減感作療法の治療前では DEA 感受性の Low affinity IgE が検出されるが、経口減感作療法開始と共に Low affinity IgE の存在比が少なくはなっていることが観察され、これに伴って IgE 量の低下が見られ、減感作は IgE の量と質の変化を誘導することが明らかになった。

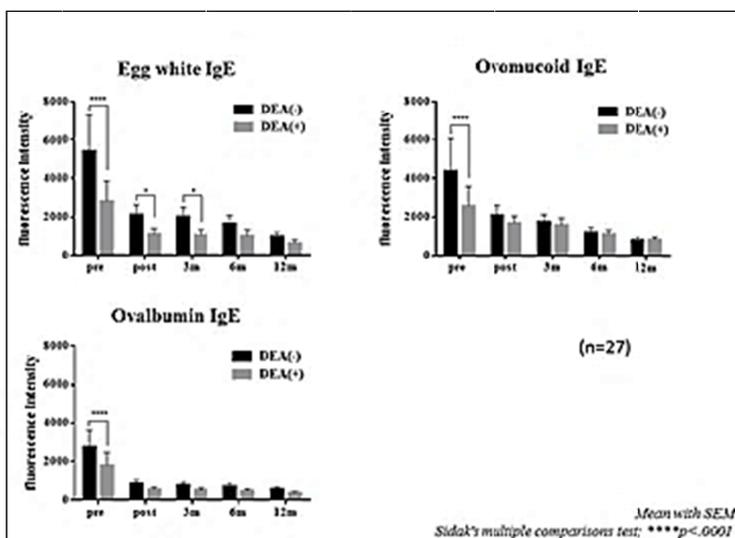


図 7 . 卵減感作療法の経過に伴う DEA 感受性 Low affinity IgE 存在率の減少経過

D . 考察

本研究によって、母乳、血液、皮膚、環境中の抗原を高感度に測定する基盤技術として、抗原特異的抗体をマイクロアレイに固相化したチップが開発された。この方法は、微量の生体材料を用いた抗原量の測定に特に有用である。この抗体アレイを用いた抗原量の測定が始まったところであるが、母乳と血液中の抗原量の測定では、大部分の抗原が抗原-抗体複合体として存在していることから、複合体から抗原を解離させる方法の開発が求められている。母乳では抗原親和性の低い SIgA 抗体が多

いため、酸性条件下に抗原の解離が比較的容易で、抗原定量のめどが立ってきた。しかし、抗原との親和性が高い血液の IgG 抗体の場合、酸性条件下でも抗原解離が不十分である。文献上でも効率の高い抗原の解離方法は報告されていない。これについては、今後新たな方法に取り組んで行く。

アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点と、抗原 Affinity の観点から解析する技術では、DCP チップを用いることで、微量の生体材料から抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA をモニターすることが可能となった。これまでのアレルギーの研究では、免疫応答性をクラススイッチの観点からモニターした例はほとんどない。今年度の研究で、経口減感作療法での免疫応答性をクラススイッチの観点からモニターして、予後の判定に有用であることを明らかにした。今後、臍帯血と生後 1 年までの乳児期の血液を用いて、Low affinity から High affinity IgE への変換と、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 のクラススイッチを詳細に追跡することで、アレルギー発症のメカニズムと、アレルギー予防法が明らかになると期待している。

E . 結論

体内に侵入した抗原量を高感度に定量する方法として、DCP チップに抗原特異的抗体を搭載したマイクロチップが開発された。このデバイスは、微量の生体材料を検体とする測定にその威力を発揮する。一方体内侵入抗原による繰返しの感作で、一連のクラススイッチと、Low から High Affinity IgE への質的变化が起きて、その過程でアレルギーが発症すると予想されるが、この過程をモニターする DCP チップ法と、その解析の有用性が初めて示された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表 (平成 26 年度)

< 論文発表 >

1. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H,

Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 824-830, 2014.

< 学会発表 >

1. 品原和加子, 亀村典生, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: 抗体固定化チップによる食品中および生体成分中のアレルギー性食物抗原の測定検討. **第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会**, 京都, 2014. 5. 9-13.
2. 木戸博, 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸: 臍帯血の抗原特異的低親和性IgE検出と, 生後6, 14ヶ月の高親和性IgEへの変化. **第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会**, 京都, 2014. 5. 9-13.
3. 杉本眞弓, 亀村典生, 鈴木宏一, 窪田賢司, 長尾みづほ, 藤沢隆夫, 木戸博: 高感度定量測定法による, 急速経口免疫療法における抗原特異的免疫グロブリンの検討. **第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会**, 京都, 2014. 5. 9-13.
4. 木戸博: 高性能タンパクチップの臨床応用: 減感作療法やアレルギー・アトピーの発症予防への応用. **第19回日本ラテックスアレルギー研究会**, 東京, 2014. 7. 27.
5. Ohya Y, Horimukai K, Morita K, Niizeki H, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Saito H: A randomized, controlled intervention trial of early emollient use in prevention of atopic dermatitis and allergic sensitization during infancy. **30th Symposium of the Collegium Internationale allergologicum**, Petersberg, Germany, 2014. 9. 13-18.
6. 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸, 木戸博: 臍帯血中の抗原特異的Low Affinity IgEの検出と生後High Affinity IgE への変化. **第87回日本生化学会大会** 京都, 2014. 10. 15-18.
7. 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 下条直樹, 深尾敏幸, 木戸博: 新規蛋白質チップによる臍帯血特異的 IgE の検出と, 離乳完了期までに見られる IgE 抗体の低親和性から高親和性への変化. **第51回日本小児アレルギー学会**, 四日市市, 2014. 11. 8-9.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし