

養蜂家における IgG₄を中心とする免疫学的検討

東京大学医学部物療内科

高石敏昭 中川武正 吉野谷定美

伊藤幸治 宮本昭正

関東中央病院内科

宮地純樹

Key words: bee keepers — immune complex — IgG — IgG₄ — phospholipase A

(受付: 8月30日, 1983)

緒言

対象および方法

昆虫によるアレルギー、特に刺咬性昆虫によるアレルギーは、本邦においては稀な疾患とされているが、欧米では重要なアレルギー性疾患の一つであって、例えば蜂アレルギーにおいては減感作療法も試みられている。感作時期、感作方法、および感作された原因抗原が比較的明瞭であることから、この方面での研究は、花粉症、気管支喘息などの他のアレルギー性疾患におけるアレルギー機序を解明する上でも重要であると思われる。著者らは第1報¹⁾として養蜂家の臨床アレルギー学的検討を行い、アトピー素因のある方が蜂アレルギーの発症傾向が強いこと、過去3年以内に全身反応を経験した者では蜂毒による radioallergosorbent test (RAST)、プリックテストの陽性率が有意に高いが、異常反応を経験していない者でも RAST、プリックテスト陽性がありうること、抗蜂毒 IgG 抗体はアレルギー症状とは無関係に、前年度にミツバチに刺された回数の多いほど抗体価が高いことを報告した。今回、同一血清を用いて、ミツバチ毒 (honey bee venom: HBV) の主要アレルゲンである phospholipase A (PLA) に対する IgE, IgG, IgG₄ 抗体を中心とする免疫学的検討を行ったので報告する。

(i) 対象: 対象は静岡県下の養蜂家 (専業および副業) 63名、その家族3名、県や市町村の畜産関係公務員で検査、監督のためミツバチと接触する者10名で、いずれもミツバチに刺される機会の多い者総計76名である。昭和54年1月から4月にかけて、これら被検者に面接を行い前年度の蜂刺回数を含む病歴を聴取し、同時に採血を行った。血液は採血後すみやかに血清を分離し、-20℃に測定時まで保存した。なお、対照として過去に蜂刺の既往のない健常人15名より採血した。

(ii) 抗 PLA IgE 抗体: 第1報では HBV そのものに対する特異的 IgE 抗体を測定したが、今回は HBV の主要アレルゲンである PLA に対する特異的抗体を測定した。Wide らの方法を改変した宮本ら²⁾の方法に従い、RAST 法により測定し、結果を count per minute (cpm) で示した。ペーパーディスクと抗原の結合はディスク約300枚につき PLA 2mg の割合で行い、PLA は Calbiochem-Behring 社製を用い、また¹²⁵I 標識抗ヒト IgE はシオノギ製薬より供与された RAST kit 添付のものを用いた。

(iii) 抗 PLA IgG 抗体: 同じく第1報では HBV に対する特異的 IgG 抗体を測定したが、今回は PLA に対する特異的 IgG 抗体を測定した。また今回の測定は solid-phase radioimmunoassay³⁾を用いた。すなわち、ポリスチレンチューブ (シオノギ製薬社製, 10×70 mm) に EDTA を含む phosphate buffered-saline (PBS-E: 5mM sodium phosphate, 0.15M sodium chloride, 10mM EDTA, pH 7.4) で溶解した PLA 溶液 (10μg/ml) を0.5ml 入れて管壁に PLA を付着させ、PBS-E にて洗浄したのち、残存活性部位を bovine

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; HBV honey bee venom; mRF-SP monoclonal rheumatoid factor-solid phase radioimmunoassay; PBS-E phosphate buffered-saline containing EDTA; PLA phospholipase A; RAST radioallergosorbent test

serum albumin (BSA)でblockした。再度PBS-Eで洗浄後25倍に希釈した検査血清0.5mlを加えて3時間反応させ、再び洗浄して ^{125}I 標識抗IgG-Fab ($2\mu\text{g/ml}$)を0.5ml加え一晩反応後洗浄し残った放射能活性を測定してcpmで示した。なお用いた ^{125}I 標識抗IgG-Fabの特異性については既に報告した⁴⁾。

(iv) 抗PLA IgG₄抗体：測定はsolid-phase radioimmunoassay⁵⁾を用いた。抗PLA IgG抗体測定時と同様にPLAを管壁に付着させ、残存活性部位をBSAでblockし、希釈した検査血清を加えて反応させた。洗浄後ヒツジ抗ヒトIgG₄を加え2時間反応させ、再び洗浄後 ^{125}I 標識ウサギ抗ヒツジIgG-Fabを加え、一晩反応させ、洗浄後残った放射能活性を測定してcpmで示した。用いたヒツジ抗ヒトIgG₄はスイス・ベルン大学Skvaril博士より供与されたもので、精製したIgG₄ミエローマ蛋白を用いて免疫して作製したものであって、その特異性については既に報告した⁵⁾。すなわち、免疫して作製したヒツジ抗ヒトIgG₄を他の3種のIgGサブクラスで吸収したのち、二重免疫拡散法とradioimmunoassayを用いて、抗IgG₄のIgG₄に対する特異性を検討した。radioimmunoassayで、IgG₄、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgA₁、IgA₂、IgD、IgM、IgEすべてで被覆したペーパーディクスへの ^{125}I -抗IgG₄の結合が、IgG₄によってのみ阻止可能で、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgA₁、IgA₂、IgD、IgM、IgEでは阻止できないことを確認し

た。 ^{125}I 標識ウサギ抗ヒツジIgG-FabはCappel研究所製のウサギ抗ヒツジIgG-Fabをlactoperoxidase法⁴⁾にて ^{125}I を結合させて作製した。

(v) 免疫複合体：Clq-solid phase radioimmunoassay (Clq-SP), monoclonal rheumatoid factor-solid phase radioimmunoassay (mRF-SP)にて測定した⁴⁾⁶⁾。抗PLA IgG抗体測定と同様に操作を進めるが、管壁にはPLAにかえてClq ($5\mu\text{g/ml}$)あるいはmRF ($3\mu\text{g/ml}$)を吸着させ、血清、次いで ^{125}I 標識抗IgG-Fabを反応させることによってIgG-complexを測定した。結果はcpmを抗ヒトIgGの残存量に変換して示した。なお、測定は項目別に全検体同時にduplicateで行い、その測定誤差は5%であった。

結 果

PLAに対するIgE, IgG, IgG₄抗体価および免疫複合体の測定値を、蜂に刺されたことのない健康人15名、養蜂関係者76名に分け、また養蜂関係者を、無アレルギー症状者54名、有アレルギー症状者22名の2群に、更に有アレルギー症状者を、局所反応のみの者13名、全身反応を有する者9名の2群に、また更に、有全身反応者を、最近3年間に全身反応のない4名、最近3年間に全身反応を有する5名の2群に分けて、表1、

Table 1 PLA-specific IgE, IgG, IgG₄ antibodies and immune complexes in bee keepers

	PLA-specific IgE (cpm)	PLA-specific IgG (cpm)	PLA-specific IgG ₄ (cpm)	Clq-reactive IC (ng)	mRF-reactive IC (ng)
Control (n=15)	77.4±27.0 (n=14)	934±404	99.3±82.8	8.6±1.8 (n=14)	2.0±1.3
Bee keeper (n=76)	262±395 (n=75)	5721±4104 (n=74)	1720±987 (n=73)	11.4±4.1 (n=72)	2.7±2.5 (n=62)
Symptom (-) (n=54)	218±198 (n=53)	6059±4248 (n=53)	1824±979 (n=52)	11.5±3.9 (n=53)	2.7±2.6 (n=43)
Symptom (+) (n=22)	368±661	4869±3673 (n=21)	1463±985 (n=21)	11.1±4.6 (n=19)	2.8±2.3 (n=19)
Local reaction (+) (n=13)	409±824	4816±3781 (n=12)	1519±875 (n=12)	13.3±3.6 (n=11)	2.9±3.6 (n=12)
Systemic reaction (+) (n=9)	309±345	4939±3750	1389±1166	8.2±4.2 (n=8)	2.5±1.6 (n=7)
Symptom (-) for the past three years (n=4)	306±462	7010±4528	2041±1165	10.6±3.6	2.9±1.5 (n=3)
Symptom (+) for the past three years (n=5)	311±280	3283±2244	868±968	5.8±3.7 (n=4)	2.2±1.8 (n=4)

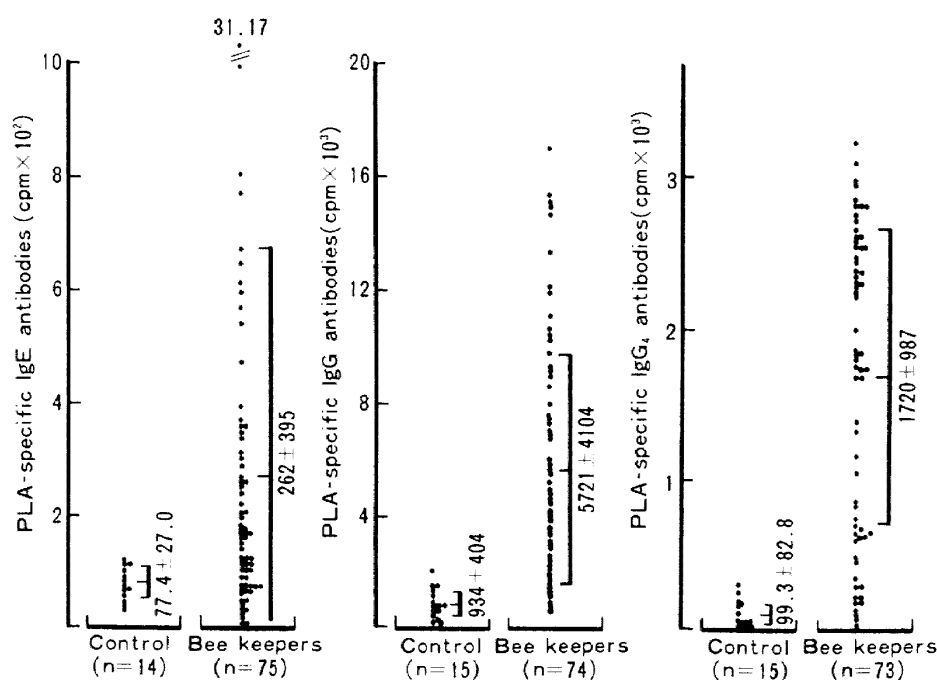
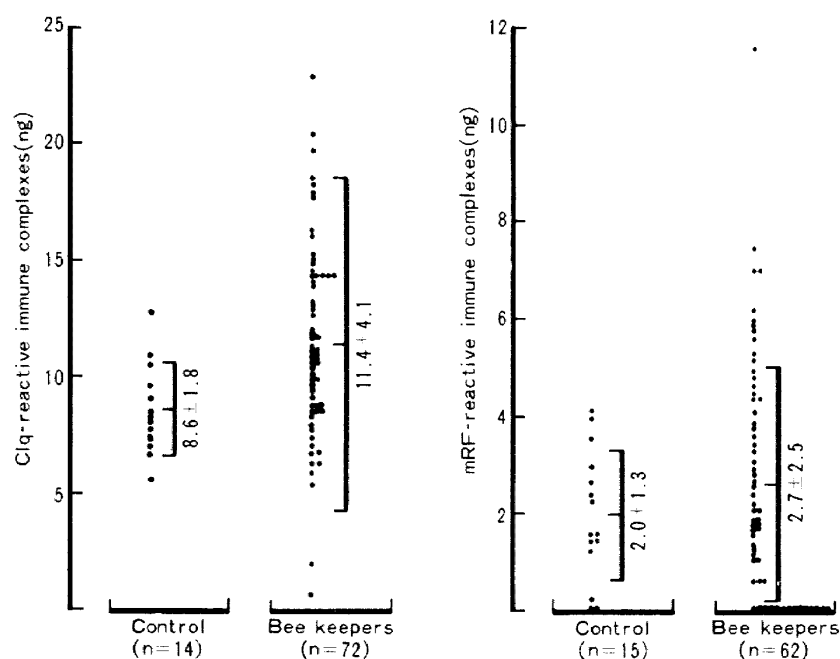
Fig. 1. PLA-specific IgE, IgG and IgG₄ antibodies in bee keepers.

Fig. 2. Immune complexes in bee keepers.

図1, 2に示した。

(1) HBV 特異的 IgE, IgG 抗体価と PLA 特異的 IgE, IgG 抗体価との相関：抗原として HBV を使用して得られた前回の抗体価と PLA を使用して得られた今回のその相関をみると, IgE 抗体価に関しては $r=0.93$, IgG 抗体価に関しては $r=0.75$ とともに有意の正の相関を示し, PLA が HBV の主要アレルゲンであることが本研究でも明らかとなった。

(2) 抗 PLA IgE 抗体：養蜂関係者において健康人より低値を示すものがあったが, 蜂アレルギーに関しては健康人中に自覚のないアレルギー保有者が存在するとは考えられないので, 健康人より低値を示す測定値は除外してよいと考えた。すなわち, 健康人平均値 + 3X 標準偏差である 159cpm 以上を陽性, 未満を陰性として再集計し表 2 を得た。最近 3 年間に全身性アレルギー反応を有する群での RAST 陽性率は 80% と高い

Table 2 RAST in bee keepers

	RAST(-)	RAST(+)
Bee keepers (n=76)	39 (51%)	37 (49%)
Symptom (-) (n=54)	29 (54%)	25 (46%)
Symptom (+) (n=22)	10 (45%)	12 (55%)
Local reaction (+) (n=13)	6 (46%)	7 (54%)
Systemic reaction (+) (n=9)	4 (44%)	5 (56%)
Symptom (-) for the past three years (n=5)	3 (75%)	1 (25%)
Symptom (+) for the past three years (n=4)	1 (20%)	4 (80%)

ものの、養蜂関係者全体の群で49%、蜂アレルギー反応を有したことの無い養蜂関係者群で46%に達し、Fischerの直接確率計算法で各群間にRAST陽性率に関して有意差を認めることはできなかった。

(3) 抗PLA IgG抗体およびIgG₄抗体：両者間には $r=0.75$ で正の相関が認められた(図3)。また、IgG抗体、IgG₄抗体ともに健常人と養蜂関係者間、あるいは健常人と養蜂関係者各群間にも有意差($p<0.01$ ある

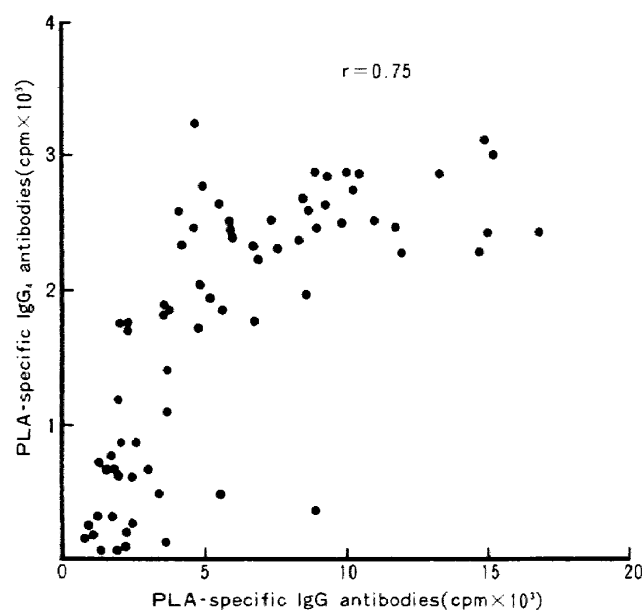


Fig. 3. Correlation between PLA-specific IgG and IgG₄ antibodies in bee keepers.

いは $p<0.001$)を認め、養蜂関係者においては症状発現の有無にかかわらず高IgG、高IgG₄抗体価を示すことは明らかであった。

(4) 前年度蜂刺回数と抗PLA IgG₄抗体：養蜂関係者における前年度蜂刺回数を10回以下、11回から100回まで、101回から1000回まで、1001回以上の4段階に分けると、健常人と前年度蜂刺回数10回以下の群間、10回以下の群と11回から100回までの群間、11回から100回までの群と101回から1000回までの群間、101回から、1000回までの群と1001回以上の群間には有意差(それぞれ、 $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.02$, $p<0.2$)を認め、前年度蜂刺回数の増加に伴いIgG₄抗体価の上昇が起こることが明らかであった(図4)。しかし、蜂刺回数とIgE抗体間では何ら関連はみられなかった。

(5) 蜂アレルギー反応の有無と抗PLA IgG₄抗体：現在あるいは過去に全身性アレルギー反応を経験したものうち、最近3年間に症状を有した群と症状を有しなかった群ではIgG₄抗体価に有意差($p<0.02$)を認めたが、前者の群では前年度蜂刺回数が極端に少なく、低IgG₄抗体価が蜂刺回数不足によって生じているとも考えられ、IgG₄抗体が症状発現に抑制的に働いているかどうかは不明であった。

(6) PLA IgE抗体とIgG₄抗体：養蜂関係者において両者に相関はなく($r=0.19$)、また養蜂関係者の各群

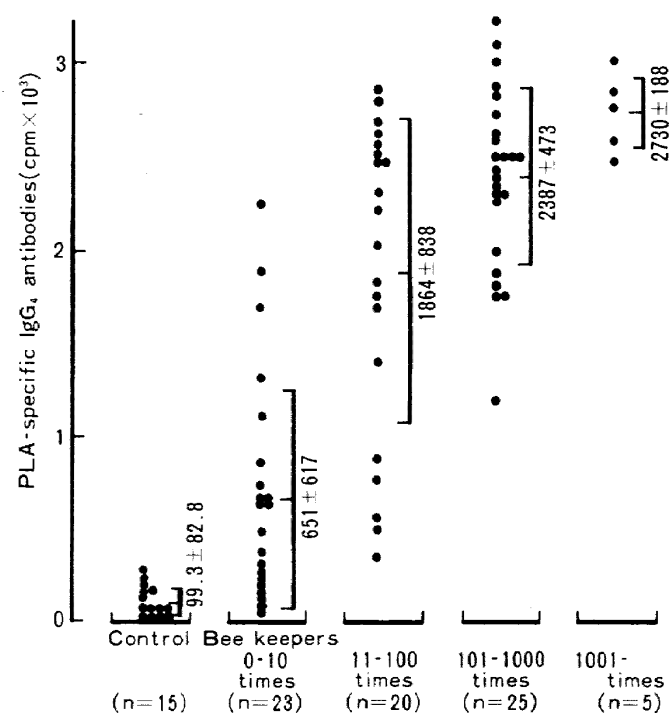


Fig. 4. Relationship between PLA-specific IgG₄ antibodies and bee stings for the last year.

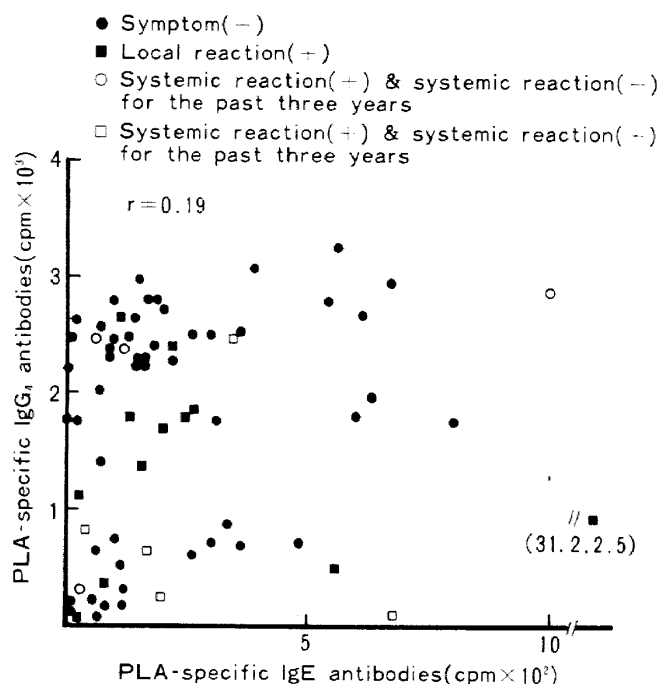


Fig. 5. Correlation between PLA-specific IgE and IgG₄ antibodies in bee keepers.

においても一定の傾向、例えば有症者には高 IgE、低 IgG₄ 抗体価を示すものが多く、無症状者には低 IgE、高 IgG₄ 抗体価を示すものが多いという傾向もなかった。

(7) 免疫複合体：Clq 反応性免疫複合体、mRF 反応性免疫複合体はともに健常人、養蜂関係者間で有意差を認めなかった。また、健常人と養蜂関係者各群間にも有意差を認めなかった。

考 案

蜂アレルギーは反応が即時型であること、アナフィラキシーの徴候を示す場合があることなどから IgE と関連していると推察され、また皮膚テストやヒスタミン遊離テストなどからも IgE 伝達性であることが明らかにされている⁷⁾。ただし有症者において特異的 IgE 抗体が低値を示す例⁸⁾があり、これはすでに血中から IgE 抗体が消失したためであると説明されている。また蜂に刺された後に血清病、神経症状、腎臓病、アレルギー型反応、遅延型反応などを示す例の報告⁹⁾があり、IgG 抗体や細胞性免疫の関与も否定できないとされている。今回の養蜂関係者には臨床的に即時型反応以外に他の特殊な反応を呈する症例はなく、免疫複合体が高値を示す症例があったものの、IgG 抗体と免疫複合体との間には相関関係は認められず、特に蜂ア

レルギーと遅発型アレルギーの関連を示唆する結果は得られなかった。ただ採血の時期から判断して蜂毒アレルギーが血中に存在せず、したがって免疫複合体が低値を示した可能性は否定できない。

ヒトの IgG は、IgG₁、G₂、G₃、G₄ の 4 つの component より成り、それぞれ、65%、25%、6%、4% を占める。そして IgE 抗体の産生を引き起こす抗原として良く知られている grass pollen, house dust mite, PLA などの刺激により IgG₄ 抗体の上昇をきたし、50% 以上になることがある。しかし、そのためには頻回な抗原刺激が必要であって、一過性の刺激のみでは IgG₄ 抗体の上昇は起こらず、他の component が上昇するという¹⁰⁾。本研究においても、蜂アレルギー症状の有無にかかわらず養蜂関係者では PLA に対する IgG 抗体¹¹⁾¹²⁾、IgG₄ 抗体が産生され、また頻回する蜂刺を受けた者ほどその傾向が強いことが証明された。そして通常この IgG 抗体はアレルギーの発症に働くわけではなく、蜂に刺された時に生ずるアレルギー反応を抑制する¹³⁾¹⁴⁾。また、最近では IgG₄ 抗体が種々のアレルギー性疾患においても阻止抗体として働くことが明らかにされてきており、花粉症においても¹⁵⁾、気管支喘息においても⁵⁾、蜂アレルギーにおいても¹⁶⁾、減感作療法例、特に減感作療法成功例で IgG₄ 抗体の上昇が報告されている。今回、PLA 特異的 IgG 抗体価と IgG₄ 抗体価の間に有意の正の相関を認め、また前年度蜂刺回数と IgG₄ 抗体価間に同じく正の相関が認められたが、前年度蜂刺経験を一種の経皮的減感作行為とみるならば同様の結論、すなわち減感作療法により IgG₄ 抗体の上昇が起こるという結論を引き出すことができよう。

ただ、現に蜂アレルギーを有する人では蜂刺による症状発現を避けようとするためか、前年度蜂刺回数が少なく、症状消失群との比較が不可能であり、IgG、IgG₄ 抗体が有益に作用しているかどうかは不明であった。また、図 5 に示すごとく IgG₄ 抗体価の高値例においても有症例があり、Heiner ら¹⁷⁾が報告した IgG₄ 抗体が anaphylactic に働く可能性と考えあわせ、即時型アレルギー反応における IgG₄ 抗体の明確な意義付けには更なる検討が必要であると考えられる。

最後に IgG サブクラスに対する抗血清について補促すると、IgG₁、IgG₂ に対する抗血清に比して、IgG₂、IgG₄ に対する抗血清の作製は特異性の面から非常に難しい。最近では簡単に抗 IgG₄ が入手できるが、IgG₄ に対する特異性についての検討が必須であろうと思われる。

稿を終るにあたり、調査にご援助いただいた静岡県養蜂協会会長竹下富雄氏、および同協会役員鈴木勲氏、深田貞男氏、材料をご提供いただいたスイス・ベルン大学腫瘍研究所 F. Skvaril 教授、ご協力下さった東大医学部物療内科酒井ゆうこ嬢、東京薬科大学戸板美奈子嬢に感謝いたします。

文 献

- 1) 宮地純樹, 秋山一男, 宮本昭正: 養蜂家の臨床アレルギー学的検討. アレルギー 30, 138-142, 1981.
- 2) 宮本昭正, 真野健次, 伊藤幸治, 富谷百合子, 堀内淑彦: paper disc を用いての radioallergosorbent test (RAST) に関する研究. アレルギー 22, 584-593, 1973.
- 3) Sakamoto, Y., Nakagawa, T., Ito, K. and Miyamoto, T.: Solid-phase radioimmunoassay for measurement of IgG antibodies specific for the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Ann. Allergy* 51, 1983. (in press)
- 4) Nakagawa, T., Yoshinoya S., Sakamoto, Y., Ito, K. and Miyamoto, T.: Circulating immune complexes in patients with house dust mite-sensitive bronchial asthma. *Clin. Allergy* 13, 1983. (in press)
- 5) Nakagawa, T., Takaishi, T., Sakamoto, Y., Ito, K., Miyamoto, T. and Skvaril, F.: IgG₄ antibodies in patients with house-dust-mite sensitive bronchial asthma: Relationship with antigen-specific immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71, 122-125, 1983.
- 6) Yoshinoya, S., Cox, R.A. and Pope, R.M.: Circulating immune complexes in *Coccidioidomycosis*; detection and characterization. *J. Clin. Invest.* 66, 655-663, 1981.
- 7) Sobotka, A.K.: Diagnosis of insect hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60, 213-214, 1977.
- 8) Reisman, R.E., Wypych, J.I. and Arbesman, C. E.: Stinging insect allergy; Detection and clinical significance of venom IgE antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 56, 443-449, 1975.
- 9) Light, W.C., Reisman, R.E., Shimizu, M. and Arbesmann, C.E.: Unusual reactions following insect stings: Clinical features and immunologic analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59, 391-397, 1977.
- 10) Aalberse, R.C., Van der Gaag, R. and van Leeuwen, J.: Serologic aspects of IgG₄ antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG₄-restricted response. *J. Immunol.* 130, 722-726, 1983.
- 11) Kemeny, D.M., Lessof, M.H. and Trull, A.K.: Measurement of IgE and IgG antibodies to bee venom as measured by a modification of the RAST method. *Clin. Allergy* 10, 413-421, 1980.
- 12) Bousquet, J., Coulomb, Y., Robinet-Levy, M. and Michel, F.B.: Clinical and immunological surveys in bee keepers. *Clin. Allergy* 12, 331-342, 1982.
- 13) Hunt, K.J., Valentine, M.D., Sobotka, A.K., Benton, A.W., Amodio, F.J. and Lichtenstein, L. M.: A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N. Engl. J. Med.* 299, 157-161, 1978.
- 14) Golden, D.B., Meyers, D.A., Sobotka, A.K., Valentine, M.D. and Lichtenstein, L.M.: Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 69, 489-493, 1982.
- 15) Devey, M.E., Wilson, D.V. and Wheeler, A.W.: The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. *Clin. Allergy* 6, 227-236, 1976.
- 16) Urbanek, R., Forster, J., Karitzky, D. and Ziupa, J.: The prognostic significance of specific IgG antibodies in insect sting allergy. *Eur. J. Pediatr.* 136, 31-34, 1981.
- 17) Heiner, D.C., de Weck, A.L., Skvaril, F., Müller, U. and Underdown, B.: IgG₄ antibody responses to five bee venom antigens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 201-201 (Abstract), 1980.

IgG₄ ANTIBODY RESPONSE TO PHOSPHOLIPASE A
IN BEE KEEPERSToshiaki Takaishi, Takemasa Nakagawa, Sadayoshi Yoshinoya,
Koji Ito and Terumasa Miyamoto*Department of Medicine and Physical Therapy, School of Medicine, University of Tokyo*

Sumiki Miyachi

Department of Medicine, Kanto Chuo Hospital

We have measured the levels of IgE, IgG, and IgG₄ antibody directed against phospholipase A (PLA), a major allergen in bee venom by IgE-, IgG-, IgG₄-RAST, and the levels of immune complex by C1q-solid phase radioimmunoassay and monoclonal rheumatoid factor-solid phase radioimmunoassay, in sera from 76 beekeepers and 15 non-allergic individuals.

It was found that the levels of PLA-specific IgG and IgG₄ antibody, but not those of immune complex, are significantly higher in bee keepers than those in non-allergic people ($p < 0.01$, $p < 0.001$). 49% of the bee keepers were positive in IgE-RAST, but they were not necessarily symptomatic. There was a significant correlation between the levels of PLA-specific IgG and IgG₄ antibody ($r = 0.75$), whereas no difference was observed between the levels of IgE and IgG₄ antibody. IgG₄ antibody levels tended to increase as the frequency of bee stings per year went up.

Recently, it has been learned that effectiveness of immunotherapy is associated with a significant increase in specific IgG₄ antibodies. Our data collectively suggest that specific IgG₄ antibodies become prominent upon repeated stimulation with PLA. However, it is not clear whether specific IgG₄ antibodies are blocking antibodies which might play a protective role in bee sting allergy. A large scale population study, including bee venom-sensitive individuals with specific immunotherapy, remains to be done in order to evaluate the precise role of IgG₄ antibodies in bee sting allergy.
