

〔綜 説〕

スギ花粉アレルゲンエキスの標準化：
主要アレルゲンの分析の意義

国立感染症研究所免疫部

阪口雅弘

Key words: allergen — pollen — standardization

はじめに

述べていきたい。

アレルゲンエキ스는アレルギーの診断や治療に重要な働きをしている。特に減感作治療においては不可欠のものである。しかしながら、アレルゲンエキ스는生物製剤のため、その品質は様々な要因に影響を受け、一定の品質を保つことが困難である。治感作治療の治療の有効性および信頼性を高めるためには、標準化されたアレルゲンエキスを治療に用いることが必要である。

アレルゲン標準化にはアレルゲンエキス中の力価を測定することが必要である。多くのアレルゲン力価測定法がある¹⁾²⁾。最近、種々のアレルゲンで主要アレルゲンの解析が進み、その主要アレルゲンに対するモノクローナル抗体が作成されている。この抗体を用いて、アレルゲンエキス中の主要アレルゲンを免疫化学的に定量するという方法が標準化に用いられ始めた。この方法はアレルゲンとしての本来の生物学的活性を検出するわけではないが、この方法で得られたアレルゲンエキスの力価が皮膚テストや RAST inhibition 法で得られた値とよく一致することが、多くのアレルゲンで確認されている³⁾。

すなわち、主要アレルゲンが解析されることにより、その主要アレルゲンの定量法が確立し、より簡便にアレルゲンエキスの標準化を行うことが可能になった。この本稿ではスギ花粉主要アレルゲンの分析研究と、その成果を用いたスギ花粉アレルゲン標準化について

スギ主要アレルゲンの分離、同定

最初に述べたようにアレルゲンの標準化において、その主要アレルゲンの解析の研究は非常に重要である。日本において最も重要なアレルギー疾患の1つであるスギ花粉症の主要アレルゲンにおいて、その解析が進み、その測定法も確立している。

スギ花粉主要アレルゲンである Cry j 1 が安枝ら⁴⁾により、Cry j 2 が著者ら⁵⁾により発見、同定されている。これらのアレルゲンは分子量、等電点も似ているため、通常のイオンおよびゲルクロマトグラフィーによる分離が困難であった。しかし、Mono-S カラムクロマトグラフィーにより、Cry j 1 と Cry j 2 の各主要アレルゲンに分けることができた⁵⁾。図1においてそれぞれの各アレルゲンを SDS-PAGE ゲル電気泳動 (DTT の非

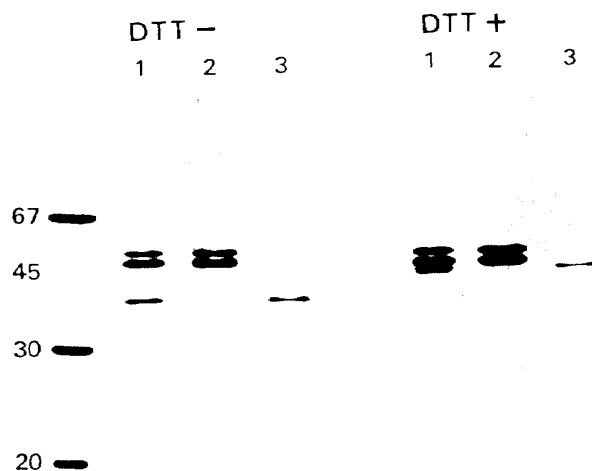


図1. スギ主要アレルゲン (Cry j 1 と Cry j 2) の SDS-PAGE. 1) Cry j 1 と Cry j 2, 2) Cry j 1, 3) Cry j 2.

JAPANESE CEDAR POLLEN ALLERGEN
STANDARDIZATION: ANALYSIS OF MAJOR
ALLERGENS

Masahiro Sakaguchi

Department of Immunology, National Institute of
Infectious Diseases

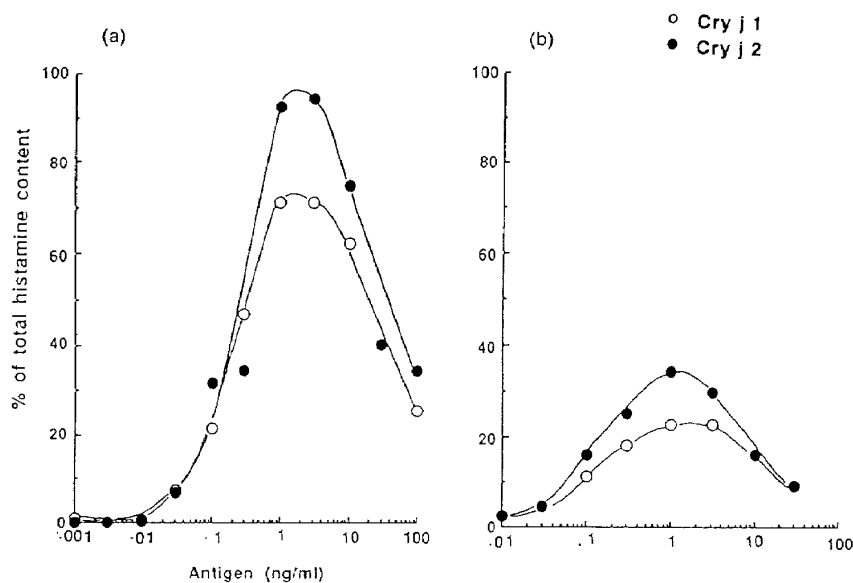


図2. スギ花粉症患者における末梢血中の好塩基球からのアレルギー特異的ヒスタミン遊離。a) 高いヒスタミン遊離の患者, b) 低いヒスタミン遊離の患者。

存在下の条件)による解析を行ったところ,それぞれのタンパク分子量は Cry j 1において45-50kDa, Cry j 2においては37kDaを示した。次にDTTの存在下ではCry j 1の移動度には変化がなかったが, Cry j 2は37kDaから42kDaに移動度の変化が認められた。現在のところ, 主要アレルギーはこの2つに限られている。

スギ花粉主要アレルギーに対する反応性

スギ花粉症の患者は主要アレルギー特異的IgEおよびIgG抗体を保有している⁵⁾⁶⁾。これらの患者における主要アレルギーとの反応性を調べる目的で, 血清中の各主要アレルギー特異IgE抗体産生を測定した⁷⁾。145名のすべてのスギ花粉症患者は, この2つの主要アレルギーのどちらかに反応した。さらに90%以上の患者は2つのアレルギーに対するIgE抗体を持っていた。この結果より, この2つのタンパクは重要なアレルギーであることが確認できた。

さらにスギ花粉症患者血中の好塩基球からのスギ花粉特異的ヒスタミン遊離を調べたところ, Cry j 1およびCry j 2特異的ヒスタミン遊離が見られた(図2)⁷⁾。これら精製アレルギーを1~3ng/mlの濃度で好塩基球とインキュベートした時, 最大のヒスタミン遊離が認められた。このように患者における各主要アレルギー特異的IgE抗体の陽性率やアレルギー特異ヒスタミン遊離能を比べた場合, 2つのアレルギーは同じ程

度のアレルギー性を持つものと思われる。

Cry j 1およびCry j 2特異的モノクローナル抗体

Cry j 1, Cry j 2に関してはそのアレルギー特異的なモノクローナル抗体が作成され, その抗体を用いたELISA法が確立している^{8)~11)}。また, そのモノクローナル抗体を用いたそのB細胞エピトープの解析が進んでいる¹²⁾¹³⁾。図3に示すようにCry j 1においてはこれまでに少なくとも異なる5つのエピトープ(EP-1からEP-5)の存在が明らかになっている¹³⁾。ヒトの花粉症患者においてEP-1, 3, 5が主要エピトープであり, 特にEP-1が全例に共通する主要なB細胞エピトープであることが確認されている¹²⁾¹³⁾。また, スギ花粉アレルギー特異モノクローナル抗体のヒノキアレルギーに対する反応性を調べたところ, EP-1からEP-3はスギ花粉アレルギー特異的エピトープでEP-4とEP-5はヒノキ花粉アレルギーと共通のエピトープであることが判った。今後, ヒノキ花粉アレルギーの解析が進み, スギとヒノキのアレルギーの交差性に関しても明らかになっていくものと思われる。

スギ花粉アレルギーエキスの標準化

わが国では標準化されたアレルギーエキ스는市販さ

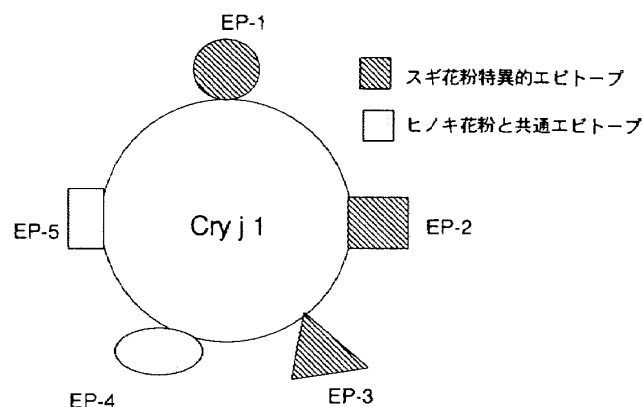


図3. IgE抗体が認識するスギ花粉アレルゲン (Cry j 1) 上のエпитープ。

れていない。そのため、1992年にアレルギー学会においてアレルゲン検討委員会が設置され、アレルゲンエキスの標準化が行われた¹⁴⁾。このとき、アレルゲンの標準化に主要アレルゲンの定量法が用いられた。最初アレルゲンの標準化に選ばれたのは、花粉アレルゲンとして最も代表的なスギ花粉アレルゲンエキスであった。今回のアレルゲンエキスの標準品は、主要アレルゲンが十分に抽出されるように、従来法を改良して行われた。

標準化の実施にあたって、まず皮膚テストにより、その標準品の力価を設定した。その力価の設定に関してはFDA方式を参考にして実施した。しかし、皮膚テストはアレルゲンとしての本来の生物学的な活性を力価に反映することができるが、患者に対して大きな負担をかけるため、市販エキスのロットごとに皮膚テストを行うことは、あまり現実的ではない。そのため、その後の市販エキスの力価の測定は皮膚テストではなく、それに代りうるELISA法によるスギ花粉主要アレルゲンの定量法を行った。スギ花粉アレルゲンエキス標準品はCry j 1: 12.7 μ g/ml, Cry j 2: 15.6 μ g/mlと2つの主要アレルゲンがほぼ同じ程度含むことが明らかになった¹⁴⁾。また、これらの結果は患者血清を用いたRASTおよびELISA inhibition法のアレルゲン活性の結果とよく相関していた。

おわりに

スギ花粉アレルゲンのように、その主要アレルゲンの分析研究がよく行われているものに関しては、その主要アレルゲンを定量することにより、市販エキスの

力価管理を簡便に行うことが可能となる。今後、治療用アレルゲンエキス標準化においては、その主要アレルゲンの分析および定量化の研究や情報が重要になると考えられる。

文 献

- 1) Platts-Mills, T.A.E. and Chapman, M.D.: Allergen standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87, 621-625, 1991.
- 2) 伊藤幸治: アレルゲンの標準化. *アレルギー* 41, 467-474, 1992.
- 3) 安枝 浩: スギ花粉アレルゲンエキスの標準. *アレルギー* 40, 862, 1991.
- 4) Yasueda, H., Yui, Y., Shimazu, T. and Shida, T.: Isolation and characterization of the major allergen from Japanese cedar pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.
- 5) Sakaguchi, M., Inouye, S., Taniai, M., Ando, S. and Usui, M., et al.: Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-312, 1990.
- 6) Miyazawa, H., Inouye, S., Sakaguchi, M. and Koizumi, K.: A reverse-sandwich ELISA for IgG antibody to a pollen allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 407-413, 1988.
- 7) Hashimoto, M., Nigi, H., Sakaguchi, M., Inoue, S., Imaoka, K., et al.: Sensitivity to two major allergens (Cry j 1 and Cry j 2) in patients with Japanese cedar pollinosis. *Clin. Exp. Allergy* 25, 848-852, 1995.
- 8) 安枝 浩, 秋山一男, 前田裕二, 早川哲夫, 金子富志: ELISAによるスギ花粉、ヒョウヒダニアレルゲンの定量とアレルゲンエキス標準化への応用. *アレルギー* 41, 1218-1225, 1991.
- 9) 渡辺雅尚, 田村正宏, 名古屋隆生, 高橋裕一, 片桐進, 他: スギ花粉抗原(Cry j 1)に対するモノクローナル抗体を用いたELISA. *アレルギー* 41, 1535-1539, 1992.
- 10) 澤谷真奈美, 小野昭子, 河野恵三, 河島トモ子, 谷口美文, 他: ELISAによるCry j 1, Cry j 2の定量法の開発. *アレルギー* 43, 467-473, 1994.
- 11) 本間玲子, 上里有史, 宮原 淳, 木村洋美, 判谷吉, 他: スギ花粉の主要アレルゲンCry j 2に対するモノクローナル抗体の作製—N末端ペプチド認識抗体との反応性を指標として精製したCry j 2を用いて—. *アレルギー* 44, 461-466, 1995.
- 12) Kawashima, T., Taniai, M., Taniguchi, Y., Usui, M., Ando, S., et al.: Antigenic analyses of sugi basic protein by monoclonal antibodies:

- I. Distribution and characterization of B-Cell-tropic epitopes of *Cry j 1* molecules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **98**, 110-117, 1992.
 - 13) Sakaguchi, M., Hashimoto, M., Nigi, N., Yasueda, H., Takahashi, Y., et al.: Comparison of specific IgE antibody to B cell epitopes of the major allergen (*Cry j 1*) of Japanese cedar pollen in humans and monkeys with pollinosis. *Immunology* **91**, 161-166, 1997.
 - 14) 安枝 浩, 奥田 稔, 吉田彦太郎, 伊藤幸治, 馬場実, 他: 我が国におけるアレルゲン標準化の基本方針とスギ花粉アレルゲンエキスの標準. アレルギー **45**, 416-421, 1996.
-