

〔原 著〕

スギ花粉抗原に対する IgG 抗体産生の免疫遺伝学的解析

産業医科大学耳鼻咽喉科

本多一至 牧嶋和見

九州大学生医研遺伝

笹月健彦

スギ花粉から抽出した粗抗原からスギ花粉症の主アレルゲンと考えられる精製スギ花粉抗原までの各段階の抗原を使用して、抗原特異的 IgG 抗体価をラジオイムノアッセイによって測定した。抗原を精製するにつれて IgG 抗体価の分布が 2 峰性になることが確認された。HLA との相関を検定したところ、IgG 低応答性と HLA-DQw3 との正の相関が認められた。in vitro IgG 抗体産生実験の結果 IgG 低応答者においても CD8⁺T 細胞分画を除くと IgG 高応答者レベルの抗体産生を認めることから、IgG クラスの免疫応答にもサブプレッサー T 細胞の関与が示唆された。

Key words: *Cryptomeria japonica* pollen antigen — IgG — HLA — suppressor T cell

緒 言

春先ほぼ全国的に観察されるスギ花粉症は、日本スギの花粉に対する I 型アレルギー反応として説明できる。著者らはこれまで臨床症状の有無及び血漿中特異的 IgE 抗体価の両面から、スギ花粉抗原に対する IgE クラスの免疫応答はスギ花粉抗原特異的サブプレッサー T 細胞を介しての免疫抑制遺伝子によって調節されていると報告してきた¹⁾⁻³⁾。今回著者らは学生パネル 72 名の HLA タイピング、血漿中スギ花粉抗原特異的 IgG 抗体価の測定、及び in vitro IgG 抗体産生能の評価分析を行い、IgG クラスの調節機構の解析を行ったので報告する。

対象と方法

1. 対象

健康な医大学生 72 名を対象とした。スギ花粉症患者はそのうち 6 名であった。

2. スギ花粉抗原の精製

スギ花粉抗原の抽出精製は、Matsushita, Yasueda らの方法に準じて行った²⁾⁻⁴⁾。日本スギの花粉は 1985

年のスギ花粉飛散期の小枝から回収したものを使用した。スギ花粉をジエチルエーテルで脱脂後、0.125M 重炭酸アンモニウムにて 4℃48 時間抽出し(分画 A)、次に 100% 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、沈澱物を遠心で集めた。これを 0.5M Tris-HCl pH 7.8 に懸濁し、同溶液で透析を行った(分画 B)。分画 B を DEAE セルロースカラムに注ぎ、同溶液で溶出した(分画 C)。さらに分画 C を、0.01M acetate buffer pH 5.0 に透析し、CM セルロースカラムに注ぎ、最初に同溶液で溶出したのち、つづけて 0.1M phosphate buffer pH 7.0 で溶出した。2 番目の溶出液(分画 D)を濃縮し、PBS に透析したものをスギ花粉抗原とした。スギ花粉抗原は最終濃度 0.5mg/ml とし、0.22μm のミリポアフィルターを通過させた後、-80℃に保存した。

3. スギ花粉抗原特異的 IgG 抗体価の定量

血漿中のスギ花粉抗原特異的 IgG 抗体価は抗原特異的アイソタイプ特異的固相法ラジオイムノアッセイを用いて各々トリプリケイトで定量した²⁾³⁾。96穴ポリビニールプレートにスギ花粉抗原分画 D 50μg/ml 0.1 ml を 4℃48 時間静置して付着させ、非特異的な結合を防ぐため 10%FCS・PBS でブロッキングをかけた後、血漿標本を加え 37℃ 4 時間培養した。次に第二抗体として¹²⁵I で標識した抗ヒト IgG 抗体を加え室温で 3 時間培養した。PBS にて洗浄後、各ウエルごとに乾燥させ、切断し、ガンマカウンターにてカウントを行った。5 名の IgG 高応答者のプール血漿を標準血漿とし、10%FCS・PBS にて 1000 倍希釈したものを 1 local unit

Received: January 18, 1991

Accepted: February 13, 1991

Abbreviations: CPAg *Cryptomeria japonica* pollen antigen; lu local unit

(lu) として定量に用いた。1 lu は約170pg/ml のスギ花粉抗原特異的 IgG 抗体を含有していると算定された。in vitro の培養上清も同様の手技を用いて定量が行われた。

4. HLA タイピング

HLA-A, B, C タイピングは末梢リンパ球を用いて NIH 標準法により, HLA-DR, DQ タイピングは末梢リンパ球よりトロンビンナイロンウール変法で精製した B 細胞を用いて行った⁵⁾。タイピングは第 3 回アジア・オセアニア HLA ワークショップで配布された HLA-A, B, C および HLA-DR, DQ 抗血清を用いた。

5. 細胞の調整及び in vitro IgG 抗体産生

健康正常人のヘパリン加末梢血より Ficoll Conray 比重遠沈法にて末梢リンパ球を分離した。これを10% ヒト血清加 RPMI-1640 培地10ml に浮遊し、プラスチックディッシュ上で45分間静置 (37°C) 後、非付着細胞を回収し T 細胞分画とした。培地にて 2 回洗浄後ラバーポリスマンにて付着細胞を回収し、これを非 T 細胞分画とした。T 細胞分画から anti-HLA-DR MID4 (抗 CD8) 抗体とウサギ補体を用いた killing 法により、B 細胞・CD8⁺T 細胞を除いて CD4⁺T 細胞分画を得た。この CD4⁺T 細胞分画は、anti-Leu3A (抗 CD4), anti-Leu2B (抗 CD8) を用いた FACS 解析により90%以上の純度を持つことを確認した。すべての細胞は2mM/l の L-グルタミンを添加した10%FCS・RPMI-1640 培養液1ml に浮遊させ、pokeweed mitogen(PWM)およびスギ花粉抗原とともに、 1.5×10^6 の細胞で 5 %CO₂, 37°C 飽和水蒸気圧の条件下に培養した。60時間の共培養後、培養液で 3 回洗浄してス

ギ花粉抗原および PWM を除去して新たに培養液を加えて 6 日間培養した。培養上清を回収して-80°C に保存して定量した。in vitro IgG 抗体産生系はスギ花粉抗原+PWM によって誘導された IgG 値から PWM のみによって誘導された IgG 値を差引いたデルタ (Δ) IgG 値を求め解析対象とした。

結 果

Fig. 1 はスギ花粉抗原の各精製段階においてそれぞれ SDS-PAGE を行い、銀染色したものである。スギ花粉抗原分画 D はウエスタンブロット分析及び RAST inhibition test などの解析結果からスギ花粉抗原の主アレルゲンと考えられる41K と46K ダルトンの蛋白にほぼ精製されている²⁾⁴⁾。学生パネル72名の血漿中特異的 IgG 抗体価はスギ花粉抗原を精製するにつれて反応性が 2 峰性となることが確認された (Fig. 2)。スギ花粉抗原の CM 分画 (分画 D) は180lu 付近を cut off point として IgG 高応答者群と IgG 低応答者群の 2 群に分けられた (Fig. 2)。HLA との相関を検定したところ IgG 低応答性と HLA-DQw3 との相関が認められた (Table 1)。in vitro IgG 抗体産生実験を行ったところ、IgG 低応答者では末梢リンパ球は免疫応答を示さなかった。しかしながら CD8⁻ の T 細胞分画は著明な免疫応答を示し、これは IgG 高応答者レベルに匹敵するものであった (Table 2)。

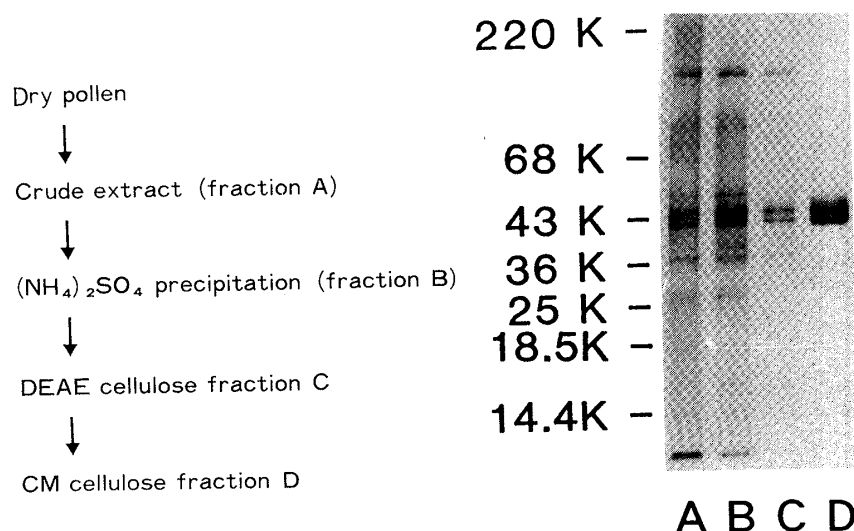


Fig. 1. Purification and SDS-PAGE profile of *Cryptomeria japonica* pollen antigen.

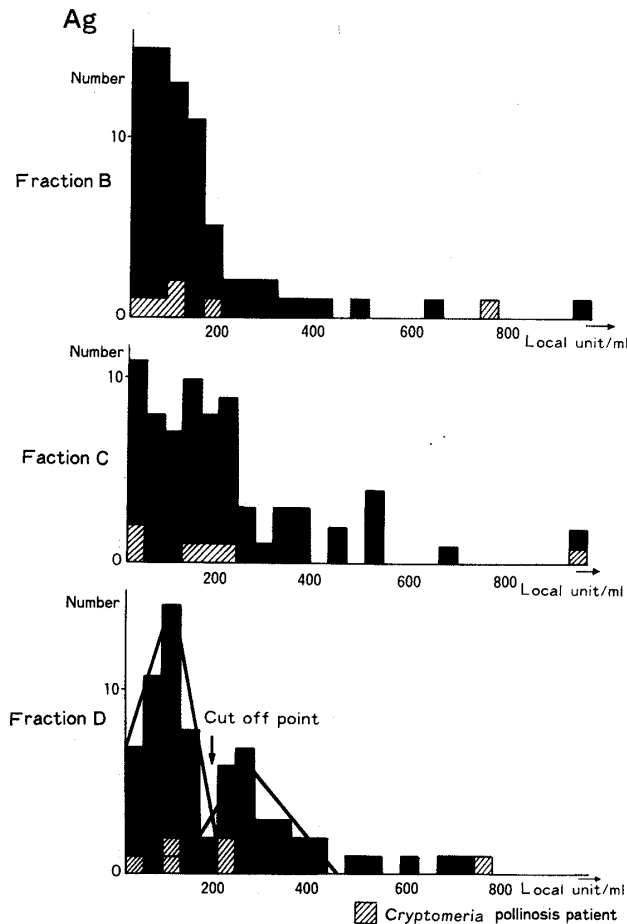


Fig. 2. Distribution of specific IgG Ab titer.

考 察

スギ花粉症は北海道・沖縄を除く、日本全土において2月から4月にかけて観察される。スギ花粉症には家系内集積性が認められ、また同時期にほぼ等しく花粉を吸入しているにもかかわらず症状がでない人が認められることなどから、遺伝要因の関与を示唆されてきた。著者らは、スギ花粉抗原に対するIgE免疫応答の観点からHLA-DR分子が免疫応答遺伝子産物として、またHLA-DQ分子が免疫抑制遺伝子産物として働いていると提唱してきた¹⁾²⁾。加えて、免疫抑制遺伝子が免疫応答遺伝子よりも上位に働き⁷⁾、特異的サプレッサーT細胞を介してIgE抗体産生を抑制して症状発現を抑えていると報告した²⁾。

スギ花粉症の治療は抗原の回避、抗アレルギー剤、非特異的減感作療法など行われているが、スギ花粉抗原を用いた特異的減感作療法もその1つである。しかし、その作用機序はいまだ明らかでなく、IgG抗体による遮断抗体説やサプレッサー細胞誘導説など種々報告

Table 1 Association between IgG Ab low responsiveness and HLA

		Ag	Relative risk
HLA	A	N.S.	
	B		
	C		
	DR		
	DQ	DQw3*	4.80

*: $p < 0.05$ Table 2 Specific IgG response to *Cryptomeria japonica* pollen antigen

	Specific IgG Ab(pg/ml)	
	L ^a	H ^b
B·Mφ ^c +CD4 ⁺ ·T+CD8 ⁺ ·T+CPAg ^d	40	260
B·Mφ+CD4 ⁺ ·T +CPAg	250	290

a IgG low responder.

b IgG high responder.

c B·Mφ: B cell and macrophage.

d CPAg: *Cryptomeria japonica* pollen antigen.

Results represent mean value of triplicate determinations. The SD of the triplicate assay was less than 15%.

されている。特異的減感作療法の作用機序を明らかにするためには、IgE抗体産生調節機構ばかりでなくIgGにおける制御機構を解明することが必須であると思われる。

Marshらはブタクサ花粉抗原を用いてRyel抗原及びRa3抗原にそれぞれ応答する免疫応答遺伝子の存在を指摘した⁸⁾⁹⁾。彼らはさらに精製を進めたRa5抗原を用いてIgEとIgG両クラスにおいてより強いHLA-Dw2との相関を報告した^{10)~12)}。またブタクサ花粉の別の分画抗原(Ra6)を用いてIgE、IgG両高応答性とHLA-DR5との強い相関を指摘している¹³⁾。

今回、著者らの解析結果は興味あることにIgEクラスとIgGクラスの反応性に解離が認められた。つまり、IgE免疫応答においてはスギ花粉症患者(IgE高応答者)とHLA-DQw3との間に正の相関が認められるのに対し、IgG免疫応答においてはIgG低応答者とHLA-DQw3との間に正の相関を認めた。Marshらと著者らとではAssay系に違いがあり、簡単に比較はできないが、ブタクサ花粉抗原の応答機構は免疫応答遺伝子で説明できるのに対し、スギ花粉抗原の反応系に

は免疫応答遺伝子の作用機序より上位の免疫抑制遺伝子の機構が存在しているため、結果が相反したとも考えられる。IgE 免疫応答と同様の手法を用いて、IgG 免疫応答についても、IgG 低応答者の末梢血リンパ球から CD8⁺T 細胞分画を取り除くことによって免疫応答の回復を認めた。即ち、IgG 低応答性にはサプレッサー T 細胞による免疫抑制の介入が示唆される。

今後、HLA-DR, DQ 分子の関与及び IgG サブクラスによる反応系の差異の有無を解析して、IgG 反応系の全貌を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Sasazuki, T., Nishimura, Y., Muto, M. and Saito, Y.: MHC-linked immune suppression genes and their role in immunological disorders. In "Immunogenetics Its Application to Clinical Medicine". (Ed. by T. Sasazuki and T. Tada), Academic Press, Tokyo, pp.21-37, 1984.
- 2) Matsushita, S., Muto, M., Suemura, M., Saito, Y. and Sasazuki, T.: HLA-linked nonresponsiveness to *Cryptomeria japonica* pollen antigen. I. Nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T cell. *J. Immunol.* 138, 109-115, 1987.
- 3) 本多一至: スギ花粉症の免疫遺伝学的解析. HLA と連鎖したスギ花粉抗原に対する免疫抑制遺伝子の証明と解析. 福岡医誌 80, 28-37, 1989.
- 4) Yasueda, H., Yui, U., Shimizu, T. and Shida, T.: Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.
- 5) Danilovs, J.A., Ayoub, G. and Terasaki, P.I.: B lymphocyte isolation by nylon-wool. In "Histocompatibility Testing 1980" (Ed. by P.I. Terasaki), University of California, Los Angeles, pp. 287-288, 1980.
- 6) Hirayama, K., Matsushita, S., Kikuchi, I., Iuchi, M., Ohta, N. and Sasazuki, T.: HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response in humans. *Nature* 327, 426-430, 1987.
- 7) Marsh, D.G., Chase, G.A., Goodfriend, L. and Bias, W.B.: HLA and Allergy. 'Mapping' of postulated Ir genes within HLA by studies in allergic population. In "Monographs in Allergy". 11th ed. (Ed by A.L. Weck and M.N. Blumenthal), Karger, Basel, pp.106-115, 1977.
- 8) Marsh, D.G., Meyers, D.A. and Bias, W.B.: The epidemiology and genetics of atopic allergy. *N. Engl. J. Med.* 305, 1551-1559, 1981.
- 9) Goodfriend, L., Choudhury, A.M., Klapper, D.G., Coulter, K.M., Dorval, G., DelCarpio, J. and Osterland, C.K.: Ra5G a homologue of Ra5 in giant ragweed pollen: Isolation HLA-DR associated activity and amino acid sequence. *Mol. Immunol.* 22, 899-906, 1985.
- 10) Marsh, D.G., Hsu, S.H., Roebber, M., Kautzky, E.E., Freidhoff, L.R., et al.: HLA-Dw2: A genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigenic exposure. *J. Exp. Med.* 155, 1439-1451, 1982.
- 11) Marsh, D.G., Meyers, D.A., Freidhoff, L.R., Kautzky, E.E., Roebber, M., et al.: HLA-Dw2: A genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. II. Response after ragweed therapy. *J. Exp. Med.* 155, 1452-1463, 1982.
- 12) Marsh, D.G., Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Bias, W.B. and Roebber, M.: Immune responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) pollen allergen Amb a IV (Ra6) is associated with HLA-DR5 in allergic humans. *Immunogenetics* 26, 230-236, 1987.

ANALYSIS OF THE REGULATION OF IgG PRODUCTION TO *CRYPTOMERIA JAPONICA* POLLEN ANTIGEN

Kazuyuki Honda and Kazumi Makishima

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

Takehiko Sasazuki

Department of Genetics, Medical Institute of Bioregulation Kyusyu University

Genetic control of the immune response to *Cryptomeria japonica* pollen antigen (CPAg) in humans was analyzed using 72 unrelated healthy adults. The 72 were classified into a low responder group and a high responder group by using purified CPAg. Significant associations were found between IgG low responsiveness to purified CPAg and possession of HLA-DQw3. Relative risks for the two groups were 4.80. Peripheral blood lymphocytes from low responders revealed a specific IgG response to CPAg when the CD8⁺ T cell fraction was depleted. Thereby, low response due to the presence of CPAg-specific CD8⁺ suppressor T cells was suggested.
