

アレルギー分析とその臨床応用

国立病院機構相模原病院臨床研究センター

安枝 浩

Key words: allergen — IgE antibody — recombinant allergen

はじめに

アレルギー疾患は特定のアレルゲンを吸入して、あるいは食物として摂取してそのアレルゲンに感作されることによって発症する抗原特異的な疾患である。アレルギー疾患の正確な診断法の確立、アレルゲンエキスの標準化の実施、新たな抗原特異的治療法の開発のためには、原因となるアレルゲンを同定してその活性や構造に関してさまざまな角度から分析することが不可欠である。

アレルゲンの同定と精製標品の調製

アレルゲンの分析は、花粉やダニなどの原因物質からアレルゲンとなる成分を同定してその精製標品を調製することから始まる。本格的なアレルゲンの同定とその精製標品の調製は、1964年のブタクサ花粉の当時の名前で AgE（現在の WHO の命名法¹⁾では Amb a 1）が最初である²⁾。その後、60年代から80年代にかけてイネ科ホソムギ花粉の Rye 1 (Lol p 1)³⁾、ヤケヒョウヒダニの Pi (Der p 1)⁴⁾、スギ花粉の SBP (Cry j 1)⁵⁾などの代表的なアレルゲンが、イオン交換やゲル濾過などの各種クロマトグラフィをはじめとする生化学的手法を用いて続々と精製された（表1）。当時から今現在に至るまで、アレルギー疾患における免疫学的メカニズムの解析、新たな診断法、治療法の開発の多くはこれらのアレルゲン精製標品を用いて成されたものである。また、ヤケヒョウヒダニの主要アレルゲンであ

る Der p 1⁶⁾がアレルゲンとしては初めてその遺伝子がクローニングされた1988年以降、分子生物学的、遺伝子工学的な手法を用いた分析がアレルゲンの分野においても取り入れられ、特にアレルゲン分子の構造解析は飛躍的に進展してきた¹⁾。現在では表1に示したような主要なアレルゲンはすべてその遺伝子がクローニングされて全分子配列が明らかにされ、多くのものは組換体（リコンビナントアレルゲン）が調製されている。

精製アレルゲンに対する IgE 抗体の測定

アレルギー疾患の診断は皮膚テストの実施、および体外診断薬による IgE 抗体の測定による原因アレルゲンの同定から始まる。今のところ、これらの診断に使用されているエキス、診断薬はいずれも原材料由来の粗抗原であるが、粗抗原のかわりに精製アレルゲンを用いると、I型アレルギーの診断に関してはるかに多くの情報が得られる。

Aspergillus fumigatus のいくつかの組換アレルゲンに対する IgE 抗体を測ることによって allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) の鑑別診断ができるということが報告されている⁷⁾。いくつかの臨床所見と血清学的所見から ABPA の診断基準⁸⁾が設けられているが、その診断基準に関しては未だにさまざまな議論がある。具体的なデータを表2に示した。ABPA 54例と、主に *Aspergillus* に感作された喘息患者である非 ABPA 35例について Asp f 1 から Asp f 6 までの4種類の組換アレルゲンに対する IgE 抗体を測定すると、Asp f 1 と Asp f 3 に対しては両群ともに陽性例がみられる。しかし、Asp f 4 と Asp f 6 に対し

CHARACTERIZATION OF ALLERGENS AND ITS CLINICAL APPLICATION

Hiroshi Yasueda

Clinical Research Center, National Hospital Organization
Sagamihara National Hospital

Abbreviation: ABPA allergic bronchopulmonary aspergillosis

安枝 浩：国立病院機構相模原病院臨床研究センター
〔〒228-8522 相模原市桜台 18-1〕

E-mail: h-yasueda@sagamihara-hosp.gr.jp

表1 アレルゲンの同定と精製標品の調製

報告年	由来	アレルゲン名	報告者
1964	ブタクサ花粉	Ag E (Amb a 1)	King et al.
1965	ホソムギ花粉	Rye 1 (Lol p 1)	Johnson and Marsh
1969	タラ (cod)	Allergen M (Gad c 1)	Aas and Elsayed
1976	ネコ	Cat 1 (Fel d 1)	Ohman et al.
1981	ヤケヒョウヒダニ	P ₁ (Der p 1)	Chapman and Platts-Mills
1983	スギ花粉	SBP (Cry j 1)	Yasueda et al.
1985	コナヒョウヒダニ	Me1 (Der f 2)	Haida et al.
1990	スギ花粉	Cry j II (Cry j 2)	Sakaguchi et al.

かっこ内のアレルゲン名は現在のアレルゲン命名法による名称。

表2 アスペルギルス組換えアレルゲンに対する IgE 抗体測定による ABPA の鑑別診断

Subjects	IgE antibody (ELISA units/ml)			
	rAsp f 1	rAsp f 3	rAsp f 4	rAsp f 6
Asthma with ABPA (n = 54)	173 ± 510 45/54 (83%)	412 ± 454 51/54 (94%)	47 ± 67 42/54 (78%)	54 ± 110 30/54 (56%)
Asthma without ABPA (n = 35)	29 ± 53 16/35 (46%)	110 ± 238 17/35 (46%)	< 5 0/35 (0%)	< 5 0/35 (0%)
Healthy Controls (n = 20)	< 5 0/20 (0%)	< 5 0/20 (0%)	< 5 0/20 (0%)	< 5 0/20 (0%)

上段は各アレルゲンに対する IgE 抗体価の平均値 ± 標準偏差。

下段は IgE 抗体陽性者数と陽性率。

文献 7) より引用。

ては非 ABPA 群は全例が陰性であるのに対して、ABPA 群は陽性率が Asp f 4 に対しては 78%、Asp f 6 に対しては 56% で、しかも大半が少なくともどちらか一方に陽性である。したがって、Asp f 4 と Asp f 6 に対する IgE 抗体を測定して、どちらか一方に陽性であれば ABPA と診断できるということになる。なぜ Asp f 4 と Asp f 6 に対する IgE 抗体は ABPA 患者だけが陽性になり喘息患者は陽性にならないのかということについての明確な答えは得られていないが、IgE 抗体の測定だけで ABPA を鑑別できればそれは画期的なことである。このアスペルギルスの組換えアレルゲンは CAP-RAST の研究用試薬としてすでに市販されているので、それを用いて相模原病院の症例を対象に検討を行い、スイスでの調査⁷⁾、米国で行われた調査⁹⁾、合計 3 地域での調査データを比較した (図 1)。Swiss での調査では非 ABPA は全例が IgE 抗体陰性で特異度は 100% であるが、わが国、米国での成績は必ずしも 100% ではない。その理由として ABPA の診断基準が完全に同じなのかという問題、また同じ組換

アレルゲンを使っている、IgE 抗体の測定法はそれぞれ異なっており、測定法の精度、感度の違いなどが考えられる。また、Asp f 6 と *Malassezia furfur* の MF 3 はいずれも同じ manganese superoxide dismutase で互いに交差反応するために、アトピー性皮膚炎を合併している喘息患者では Asp f 6 に対する IgE 抗体が高頻度で陽性になるという問題点も考慮する必要がある¹⁰⁾。しかし、血清中の IgE 抗体を測定するというきわめて簡単な検査で、感度、特異度ともに 70% を超えおり、ABPA の診断基準の 1 つとしての利用価値は高い。測定用試薬も既に実用化されているから、もっと利用されてよい診断法である。

組換えアレルゲンであれ天然のアレルゲンであれ、精製アレルゲンを用いる I 型アレルギーの診断、すなわち component-resolved diagnosis¹¹⁾ というコンセプトの一つの到達目標は、多種類の精製アレルゲンを搭載したアレルゲンチップ (アレルゲンマイクロアレイ) による診断である。このようなアレルゲンチップのプロトタイプといえるものは既にできあがっている¹²⁾。花

	Swiss		Japan		USA				
	ABPA		ABPA		ABPA				
	+	-	+	-	+	-			
IgE Ab to Asp f 4 and/or Asp f 6	+	49	0	+	14	4	+	23	4
	-	5	35	-	5	19	-	1	12
Sensitivity (%)	91		74		96				
Specificity (%)	100		83		75				

図1. rAsp f 4, rAsp f 6 に対する IgE 抗体測定による ABPA の鑑別診断.
3 国での調査におけるの感度と特異度の比較.

粉, 食物, ダニ, 動物, 真菌, ラテックス, 昆虫由来の合計 93 種類の主に組換体で, 一部天然のものも含む精製アレルゲンが搭載されたチップで, わずか 40μl の血清量でこれらの多くの精製アレルゲンに対する特異 IgE 抗体を一挙に検出することができる. このようなアレルゲンチップを臨床の現場で使うことができるようになるのはそう遠い将来ではない.

アレルゲン間での交差反応性の解析

アレルゲンはそれぞれが独立した抗原性を有しているのではなく, 類似のアレルゲンの間には, 多くの場合, 免疫学的交差反応性が認められる. 一般的には, この交差反応性の程度は分類学的な近縁関係の程度と一致しており, 近縁な関係にあるものほど強く交差反応する.

マツ目に属するスギ科, ヒノキ科の植物は, ブナ目のブナ科, カバノキ科の植物とともに花粉症の原因となる主要な木本植物である¹³⁾. わが国のスギ (*Japanese cedar, Cryptomeria japonica*) とヒノキ (*Japanese cypress, Chamaecyparis obtusa*) 以外にも, 北アメリカのビャクシン (*mountain cedar, Juniperus ashei*) や地中海沿岸のホソイトスギ (*Italian cypress, Cupressus sempervirens*) などが代表的な原因植物として知られている. これらの花粉中にはスギの Cry j 1, Cry j 2 に相当するスギ・ヒノキ科花粉のグループ 1, グループ 2 アレルゲンが共通して存在する. ヒノキの Cha o 1, Cha o 2, ビャクシンの Jun a 1, Jun a 2 などである. それぞれの種のグループ 1, グループ 2 アレルゲンの分子構造には分類学的な近縁度に対応した類似性がみられる. グループ 1 アレルゲン間でのアミノ酸配列の一致

率を見ると, スギ科の Cry j 1 とヒノキ科の Cha o 1, Jun a 1 との間的一致率はそれぞれ 80%, 79% であるが, 同じヒノキ科同士である Cha o 1 と Jun a 1 の間的一致率はそれよりもさらに高く 86% である. また, ブタクサ花粉の主要アレルゲンである Amb a 1 も Cry j 1 と同じファミリーのタンパク質, すなわち pectate lyase という酵素タンパク質で, 両者のアミノ酸配列の間には相同性がみられるが, 分類学的にはかなりかけ離れたキク科ブタクサ属の Amb a 1 と Cry j 1 の間的一致率はわずか 46% である. アミノ酸配列の一致率の高い Cry j 1 と Cha o 1 や Jun a 1 の間では強く交差反応して, Cry j 1 と Amb a 1 のように一致率の低いもの間では, 少なくとも臨床的に意味のある交差反応はみられない. もし, Cry j 1 と Amb a 1 がヒト IgE 抗体のレベルで交差反応するのであれば, スギ花粉症患者は春だけではなく秋にも症状が引き起こされるということになってしまう. 図 2 に 4 種類のスギ・ヒノキ科花粉のグループ 1 アレルゲンによるスギ花粉症患者末梢血白血球からの典型的なヒスタミン遊離パターンを示した. わが国ではほとんど飛散していないビャクシン花粉の Jun a 1 やホソイトスギ花粉の Cup s 1 によっても遊離がみられ, スギとヒノキ科花粉のアレルゲン間には強い交差反応性があることを明白に示している.

このような分類学上の近縁度に対応した交差反応ではなく, もっと広範な交差反応性を示す一連のアレルゲンがあり, パンアレルゲン (panallergen) と呼ばれている. パンアレルゲンは進化の過程で高度に保存されたタンパク質で, 分類学的な位置関係がかけはなれていても構造的な類似性が高く, 互いに強く交差反応する. パンアレルゲンによる典型的な疾患が, 花粉症

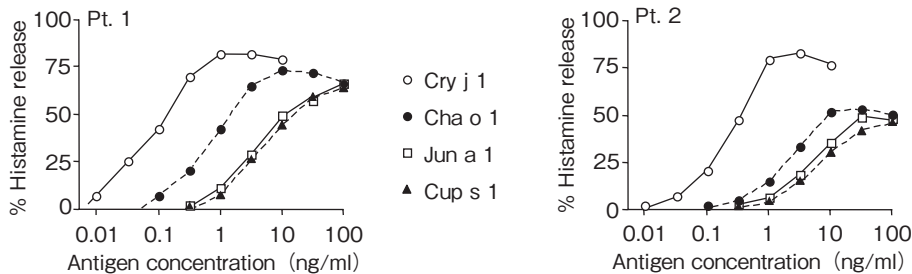


図2. スギ花粉症患者末梢血白血球からのスギ・ヒノキ科花粉グループ1 アレルゲンによるヒスタミン遊離.

やラテックスアレルギーに合併した口腔内アレルギー症候群 (oral allergy syndrome, OAS) であり, そこに関与しているのは pathogenesis-related proteins (PR タンパク質) といわれる植物の生体防御に関わる一連のタンパク質群である. PR タンパク質以外にも, すべての真核生物の細胞骨格に普遍的に存在するアクチン結合性タンパク質であるプロフィリン (profilin) や動物の筋肉を構成するタンパク質であるトロポミオシン (tropomyosin) などが代表的なパンアレルゲンとして知られている¹⁴⁾.

IgE 抗体の質の評価

アレルギー反応における反応の強さ, あるいはアレルゲンに対する生体側の感受性というものを決定する要因として第一に考えられるものは, 当該アレルゲンに対する特異的 IgE 抗体価, すなわち抗体の量である. しかし, 少なくとも *in vitro* でのヒスタミン遊離試験における各種パラメーターと血中の IgE 抗体価との間には明確な関係は認められていない¹⁵⁾¹⁶⁾. I 型アレルギーにおいては, 細胞表面のレセプター上の IgE 抗体にアレルゲンが結合することにより, その刺激が細胞内部に伝わりメディエーターが遊離されることによって反応が惹起される. したがって, このような一連の反応の強さを規定する一つの要因として, IgE 抗体とアレルゲンとの間の結合の強さというものが想定される. アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性, すなわち抗体の量ではなく抗体の質である. 血中の微量の IgE 抗体の親和性を求めるには, IgG をはじめとする他のクラスの抗体の影響を排除して, ポリクローナル抗体の解離定数を近似的に求める必要がある. 現状ではまだまだ煩雑な方法ではあるが, 患者血清中のアレ

ルゲン特異的 IgE 抗体の親和性を近似的に求める方法が既に確立されている¹⁷⁾¹⁸⁾. この方法で求めたダニ主要アレルゲン Der p 2 に対する患者血清中 IgE 抗体の親和性は, ヒスタミン遊離試験における Der p 2 に対する細胞の感受性 (一定の遊離率のヒスタミン遊離を惹起するのに必要な Der p 2 濃度) とよく相関する¹⁸⁾. これは IgE 抗体の親和性がアレルゲンに対する生体側の反応性を規定する大きな要因の1つである, ということを示している. さらに, アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性は減感化治療の経過にともなって低下するというを示唆するデータも得られている¹⁹⁾. 舌下免疫療法や新開発アレルゲンワクチンによる免疫療法の臨床試験を行うには, その有効性を客観的に評価できるマーカーが必須である. これまでマーカーとして用いられてきた IgE 抗体価, IgG/IgG4 抗体価の推移や T 細胞増殖能, Th1/Th2 サイトカイン産生量などに加えて, 抗体の量よりも質を評価する IgE 抗体の親和性というものが新たなマーカーとして検討する価値があると思われる.

おわりに

アレルゲン分析で得られた知見がアレルギーの臨床にどのように利用されているのかの一端を紹介した. アレルギー疾患において, 長期的寛解の期待できる唯一の治療法は抗原特異的免疫療法である. アレルギー疾患, なかでもスギ花粉症とダニアレルギー治療のための有効, かつ安全なワクチンの開発と, その一刻も早い実用化がこの分野における今後の最重要課題である.

文 献

- 1) Chapman MD, Pomes A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 414-20.
- 2) King TP, Norman PS, Connell JT. Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen. II. *Biochemistry* 1964; 3: 458-68.
- 3) Johnson P, Marsh DG. The isolation and characterization of allergens from the pollen of rye grass (*Lolium perenne*). *Eur Polymer J* 1965; 1: 63-77.
- 4) Chapman MD, Platts-Mills TA. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J Immunol* 1980; 125: 587-92.
- 5) Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, Shida T. Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 77-86.
- 6) Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988; 167: 175-82.
- 7) Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 99-114.
- 8) Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med* 1977; 86: 405-14.
- 9) Kurup VP, Banerjee B, Hemmann S, Greenberger PA, Blaser K, Cramer R. Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 988-93.
- 10) 安枝 浩, 竹内保雄. 真菌アレルギー—アレルゲンのクローニングと組換えアレルゲンの診断への応用. *真菌誌* 2004; 45: 71-6.
- 11) Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 896-904.
- 12) Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WA, Twardosz A, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16: 414-6.
- 13) Mothes N, Horak F, Valenta R. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135: 357-73.
- 14) Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59: 243-67.
- 15) Mita H, Yasueda H, Ishii T, Akiyama K. IgE-mediated basophil releasability is influenced by intrinsic factors and by IgE on the cell surface. *Allergy* 1995; 50: 952-8.
- 16) Marchand F, Mecheri S, Guilloux L, Iannascoli B, Weyer A, Blank U. Human serum IgE-mediated mast cell degranulation shows poor correlation to allergen-specific IgE content. *Allergy* 2003; 58: 1037-43.
- 17) Pierson L, Allauzen S, Blumenthal M, Rosenberg A. An automated method for determination of antibody affinity distribution functions with nanogram quantities. *J Immunol Methods* 1998; 211: 97-109.
- 18) Mita H, Yasueda H, Akiyama K. Affinity of IgE antibody to antigen influences allergen-induced histamine release. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1583-9.
- 19) 三田晴久. Cry j 1 に対する血清中 IgE 抗体の親和性測定に関する研究. 厚生労働科学研究研究費補助金免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業. スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に関する研究. 平成 15-17 年度総合研究報告書. 2006. p. 64-8.