喘息の科学

ホヤ・ダニアレルゲンの構造と減感作治療

ダニアレルギー、スギ花粉症などに代表されるⅠ型アレルギー疾患は年々増加傾向にあり、大きな社会問題の一つとなっている。広島県特産「生カキ」の剥身作業員に高頻度に発生したⅠ型アレルギー疾患であるホヤ喘息症の減感作治療を通じて、抗原機能分化とエピトープ構造に関する有用な知見が得られ、さらに、世界的な社会問題の一つであるダニアレルギーについても研究が進展している。

Research and Development of Immunotherapeutic Agents for Sea Squirt and Mite Allergies

* Kazuhisa ONO, 広島大学工学部

アレルギー(allergy)は、ギリシャ語の allos(=other)と ergon (=action) に由来しているといわれ、生体にとって不利益な方向に働く免疫反応、すなわち組織傷害をもたらす反応を意味する言葉である。現在、アレルギーはその発症機序の違いから4つに分類(またはV型を含むⅠ～Ⅴ型で分類)されている。

ある調査では、将来、わが国の3人に1人は何らかのアレルギー疾患で治療を受けるであろうと推定されている。事実、Ⅰ型アレルギーの3大疾患である気管支喘息、アレルギー性鼻炎およびアトピー性皮膚炎は、居住環境や食生活の変化、環境汚染・ストレスの増加などの要因から、年々増加傾向にある。

気管支喘息やアレルギー性鼻炎に対する根治的療法として最も効果が期待でき、対症療法の進歩した現今においても依然として広く行なわれているのが、抗原の投与によりアレルギー反応を抑えようとする減感作療法である。現在、わが国で診断・治療用として市販されている抗原液は、粉碎した材料を一定の溶媒に添加し、その溶媒で抽出されたものの中から、脱脂、透析を経て残る成分を濃縮したものであり、抗原量も極微量で力価が弱く不均一で、抗原と無関係の成分まで混在することを免れない。このため、これらの抗原液による検査では、時として偽陽性、偽陰性が多く、減感作療法で思わぬ副作用に悩まされることも少なからず報告されている⁽¹⁾。そこで、減感作療法で十分な治療成績を挙げるためには、これらの抗原に対する抗血清、患者血清、患者白血球などの反応性を指標にして抗原を生化学的に分画し、免疫学的に均一で純度の高い画分を得ることが必要である。

本稿では、減感作治療に成功した例としてホヤ喘息を、また成功しつつある例としてダニアレルギーをとり上げ、それぞれの研究成果と現状を紹介したい。

ホヤ喘息発見の経緯

ホヤ喘息は、広島特産カキの養殖法が「ひび建て式」から生産性の高い「いかだ式」に改良された結果、1950年以降に「生カキ」の剥身作業員の30%にも及ぶ高頻度で発生した疾患である。最初の報告(第13回日本アレルギー学会総会(1963))に続く一連の臨床的研究によって、カキ殻に付着するホヤ(図1)の体液飛沫を繰り返し吸入することで感作発症する、典型的なⅠ型アレルギー症であることが明らかになった。当時、この職業性喘息症は地場水産業界で深刻な問題となり、その対策の確立が強く要望されていた。本疾患の発見の経緯とその臨床的特徴は、光井⁽²⁾ および城⁽³⁾ の総説に詳述されているので

図 1 ■ 各種のホヤ

左：カキ殻に付着するホヤ，右：その種類(左よりシロボヤ，エボヤ，ユウレイボヤおよびマホヤ)。これらホヤから得られた抗原は交差反応性を示す。

参照されたい。

このような背景のもと，岡と共同研究者は，城らの広島喘息研究医師グループの臨床的研究との密接な連携のもとに，まず減感作治療法を確立するため，次に発症と治療の機作を解明するために，ホヤ抗原の分離・精製とその生化学的ならびに免疫化学的な諸特性の解明が必要と考え，研究に着手した^(4,5)。

ホヤ抗原の分離精製と交差反応性

ホヤ喘息患者の皮内反応試験(特定の抗原を皮内に注射して，その抗原と特異 IgE 抗体による即時型過敏反応の有無を調べる試験)をガイドに，シロボヤ *Styela plicata* 抽出液を A～H 画分に分画したものから，活性の高い分子量約 10 万の画分 G-2 と約 2 万の画分 E-2 を得た。減感作治療にはいずれの画分もきわめて有効で，90%以上という高い治療有効率が認められた。また，著効例中の血清には，両抗原のいずれをも中和できる遮断抗体(特異 IgE 抗体と競合的に生体内に侵入した抗原と結合し，即時型アレルギーを遮断する特異 IgG 抗体)が，顕著に誘導されていることを認めた。したがって，この両抗原にはこの遮断抗体を誘導し，またこれと反応する共通のエピトープの存在が示唆された。さらに，これら両抗原を再分画し，喘息誘発などの副作用がまったくない Gi-2 と Ei-2 を得た。しかし，定性的な皮内反応活性のモニターだけで精製した，これら両抗原の生化学的ならびに免疫化学的な均一性は必ずしも充分とはいえなかった。

次に，ラジオイムノアッセイ (RIA) によるモニターのもとで両画分を精製し，抗原 Gi-rep と Ei-M を得た。

表 1 ■ ホヤアレルゲンの免疫および分子特性

特性	Gi-rep	Ei-M	DIIIa	重合 DIIIa
分子量 (kDa)	106	22.8	9.98	30, 100
アミノ酸 (μmol/g)	990	720	700	
中性糖 (μmol/g)	505	370	140	
硫酸 (μmol/g)	156	187	4	
リン酸 (μmol/g)	240	90	20	
ウロン酸 (μmol/g)	41	18	199	
糖含量 (%)	36	24	18	
皮内反応	+++	+++	+++	+++
結膜反応	—	—	+++	—
喘息誘発	—	—	+++	—
抗原決定基	α	α, β	α, β, γ	α, β, γ

それぞれの抗原の分子特性上，ゲル電気泳動による均一性は検定できなかったが，超遠心分析ではいずれも高い均一性を示した。沈降平衡法による Gi-rep と Ei-M の重量平均分子量は，それぞれ 106 kDa と 22.8 kDa と測定された。また，組成分析の結果，両精製抗原は，多量のアミノ糖と硫酸およびリン酸を含む酸性糖タンパク質であると認められた(表 1)。

皮内反応および RIA による抗原活性のモニターでは，喘息誘発抗原は分離できなかった。そこでさらに，喘息誘発能との相関が高いとされる結膜反応(特定の抗原を眼の内側に滴下し，粘膜を透過したその抗原と特異 IgE 抗体との即時型過敏反応)活性を主なガイドに用いて，ホヤ体液中から結膜反応活性をもつ抗原を分離し，吸入誘発試験によってこれが喘息誘発抗原であることを確認した。この抗原 DIIIa も多量のアミノ糖を含み，ウロン酸含量が高く，硫酸およびリン酸含量が両治療用抗原よりも著しく低いために弱酸性を示す糖タンパク質であることがわかった。また，重量平均分子量は 9.98 kDa と測定された。

RIA, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による治療用抗原と喘息誘発抗原に対するウサギ、マウス、モルモット抗血清との交差反応性の解析から、それぞれの抗原のエピトープ構成は、いずれの抗原にも共通に存在する α 型、Ei-M および DIIIa に存在する β 型、さらに DIIIa にのみ存在する γ 型エピトープから成り立っていることが明らかになった。

減感作治療成績と皮内および粘膜におけるアレルギー活性

これら3つの精製抗原を用いて、ホヤ喘息患者に対して減感作治療を行なった結果(表2)、Gi-rep と Ei-M 両抗原では早期に顕著な治療効果が得られ、効果の発現に並行して、抗原特異的な IgG 抗体が患者血清中に迅速かつ顕著に誘導されることを再確認した。しかし、RAST (放射性アレルギー吸着試験) 値で示される抗原特異的な IgE 抗体価は、ホヤ喘息患者では健常者よりも有意に高く若干の季節変動を伴うものの、有意な変動ではなかった。一方、喘息誘発性の DIIIa の場合は、長期間の治療でも治療効果は有意に低く、非減感作ホヤ喘息患者群と同様に観察の全期間を通じて両特異抗体価に有意な変動を検出できなかった。したがって、本疾患の減感作治療では、特異 IgG 抗体が選択的に誘導されるだけで、特異 IgE の抗体レベルには治療の影響がないということが大きな特徴と考えられる。

非減感作ホヤ喘息患者の血液に *in vitro* で抗原を添加すると、いずれの3つの抗原でもヒスタミンが顕著に遊離された。しかし、減感作例の血液では、非減感作患者血液と同様に抗原刺激してもヒスタミン遊離量が治療

効果に並行して急速に減少することを、さらに非減感作患者血液に減感作著効例の血清を添加すると、添加量に比例して顕著にヒスタミン遊離が抑制されることを認めた。このヒスタミン遊離の抑制は、誘導された特異 IgG 抗体の遮断抗体としての機能によるもので、これが減感作治療の成立に寄与している可能性が考えられた。

DIIIa だけが特有の粘膜内アレルギー反応活性をもつが、遮断抗体誘導能が低く、減感作治療の効果も低い。これは、DIIIa が比較的低分子量であること、酸性度が低いことなどの原因により免疫原性が著しく低いことに加えて、粘膜透過性に優れていることによるものと考えられた。そこで、グルタルアルデヒド法で DIIIa を重合(重合度 2~10)したところ、皮内反応活性は保存されたが粘膜反応活性は完全に消失した。しかも、免疫原性が有意に増加し、減感作治療にも有効であることが認められた。したがって、ホヤ抗原の減感作治療剤としての効率は、ホヤ喘息特異的なエピトープの存在と、遮断抗体誘導に必要な免疫原性に依存するものであり、結膜反応や喘息誘発性のような粘膜反応活性は不可欠ではないと考えられた。

ホヤ喘息に特異的なホヤ抗原エピトープ

分子特性および抗原機能を異にする3つのホヤ抗原に存在する喘息特異的なエピトープの実態と RIA で検出される α 型エピトープとはどのような関係にあり、またこれらの活性は糖タンパク質のどの構造部分に由来するのであろうか? この点を明らかにする目的で、 α 型エピトープのみを含む Gi-rep と発症抗原 DIIIa に対して物理化学的および酵素処理の *in vitro* (RIA) および *in vivo* (皮内反応) 活性に及ぼす影響を検討した。

Gi-rep の *in vivo* 活性は、酸、アルカリおよび熱処理に対してかなり安定であった。一方、*in vitro* 活性は、酸と熱処理には安定であるが、アルカリ処理には著しく不安定であった。過ヨウ素酸酸化すると、アミノ糖、フコースなどが顕著に減少し、それに伴って両活性の顕著な低下がみられ、反応終了時にはほとんど消失した。同様な結果が DIIIa でも得られた。さらに、プロナーゼ処理により、*in vitro* 活性の低下が認められるものの、活性の約 30% はなお保存されていた。一方、*in vivo* 活性は処理後もそのほとんどが保存されていた。したがって、皮内反応に寄与するホヤ喘息特異的なエピトープは、RIA で検出される α 型エピトープと挙動をともにし、その大部分が糖鎖上に存在する特定の構造にあることが示唆された。

表 2 ■ ホヤ喘息における減感作療法の効果

使用抗原	IgG 誘導	抗原濃度	著効	有効	無効	有効率 (%)
粗抗原						
Dextrose-Phenol 法		10,000×→10×	335	192	168	75.8
Hollister-Stier 法		10,000×→10×	44	42	36	70.5
精製抗原						
Gi-rep	++	10→100 μg/ml	118	46	57	74.2
		1,000 μg/ml	28	9	0	100
Ei-M	+++	10→μg/ml	191	90	26	91.5
		100 μg/ml	41	5	0	100
DIIIa	±	10→μg/ml	4	7	27	28.9
重合 DIIIa						
30 kDa	+		0	8	0	100
100 kDa	++		9	8	0	100

抗原濃度の欄の→は患者の症状をみながら順次ふやしていくことを意味する。

エピトープ構造の解析

Gi-rep から切り出した *O*-グリコシド糖鎖および *N*-グリコシド糖ペプチドの皮内反応活性は、過ヨウ素酸化により消失した。これら糖鎖の構成糖分析、FAB-MS (fast atom bombardment mass spectrometry) および NMR 解析により、皮内反応活性発現に必須な最少構造単位として五糖アルコールの構造を、GalNAc α 1 $\rightarrow$ 2Fuc α 1 $\rightarrow$ 3 (GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4) GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc-ol と決定した。これを *N*-アセチルヘキソサミニダーゼ処理して非還元末端に存在する 2 分子の GalNAc を切断すると、皮内反応が消失した。同様な結果が、Gi-rep よりも高分子量で、 α 型エピトープのみを含む H 抗原から切り出した糖鎖でも得られ、これら糖タンパク質性抗原の糖鎖上の GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ および GalNAc α 1 $\rightarrow$ 2Fuc α 1 $\rightarrow$ の非還元末端ではじまるオリゴ糖構造が、ホヤ喘息特異的なエピトープとして機能していることが明らかになった。これは、天然物アレルギーにおける皮内反応特異的アレルゲンのエピトープ構造の解明としては、初めての例である。

ホヤ喘息研究からダニアレルギー研究への展開

原因抗原と発症および治療との間の因果関係が明確にされた特異な例であるホヤ喘息症は、その発生に関連する環境条件がきわめて限定されていたこと、他種抗原による重複感作を受けている可能性がきわめて低かったことなど、その背景となる諸条件が天然物アレルギーとしては単純化されていた。したがって、本研究で得られた知見は、複雑な条件で多発する天然物アレルギー症解明のための好適なモデル系として、きわめて有用な指針を与えるものと期待された。

そこで、このホヤでの知見を、中等症以上の重症 I 型アレルギー患者、推定 3,100 万人 (1990 年 5 月現在) の 6 割以上の患者が特異 IgE 抗体を保持していることから、実際のダニアレルギー患者あるいはその予備軍と考えられるダニアレルギー疾患研究に拡張的に応用することを試みた。安全・確実に奏効する治療用抗原を開発し、ダニアレルギーに対する減感作治療法を確立することの社会に対する貢献度は、きわめて大きい。

ダニアレルゲン研究の概要^(6~9)

1. 主要アレルゲンの検索と分離・精製

I 型アレルギー症の原因となる生活環境に存在する吸

入性アレルゲンのうち、最も感作頻度が高く、重要なアレルゲンとされているものに室内塵とダニがある。Voorhost ら (1964, 1967 年) および Miyamoto ら (1968 年) は、アレルギーを誘発する室内塵中の主要なアレルゲン源がダニ由来成分であることを報告した。室内塵中には 30~40 種類のダニが生息しているといわれているが、その中で 70~80% を占め、アレルギーにおいて重要な役割を演じているのがヒョウヒダニ属のコナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* とヤケヒョウヒダニ *D. pteronyssinus* である。これらのダニ虫体および排泄物に由来する物質で、ダニアレルギー患者に特異的に皮内反応やヒスタミンなどのケミカルメディエーター遊離を与える抗原が、ダニアレルゲンである。1970 年代には主にダニ虫体抽出物について、アレルゲン活性成分が分子量 10~69 kDa のタンパク質であると報告されたが、それらの分離・同定には至らなかった。1978 年、Chapman らは、分子量 15~25 kDa の範囲に RIA でダニ陽性患者の IgG と IgE に低濃度で結合する主要なアレルゲン画分 (F₄P₁) が存在することを報告した。

その後、精製の出発材料となるダニとその抽出物の性状はもとより、アレルゲンの検出方法や条件およびその評価法などに統一がなされないまま、そのほとんどがダニ虫体あるいは飼育物中に極微量にしか存在しないために、比較的多量に存在する成分群が集中的な分析対象となった。その端緒となる研究を、1980 年にヤケヒョウヒダニからの F₄P₁ 中の主要アレルゲンの分離に関して Chapman ら (抗原 P₁: 分子量約 24 kDa) と Stewart ら (Dpt 12: 分子量約 24 kDa) がそれぞれ独立に報告した (表 3)。コナヒョウヒダニにおいても同様に、1981~2 年に Mao らが、P₁ と Dpt 12 に相当する分子量約 25 kDa の Ag 11 を報告した。1985 年には、分子量 24~25 kDa とは異なる主要アレルゲンとして、Haida らはコナヒョウヒダニから分子量約 17 kDa の Me 1 を、一方、Lind はヤケヒョウヒダニから分子量約 18~20 kDa の DpX を分離した。これら 2 種類の主要アレルゲンに関する同様な報告が、Yasueda, Holck, Lind の研究グループによってそれぞれ独立になされた。

このように、研究者により分子量および等電点に違いがあるものの、それに対する十分な説明がなされないままに、国際免疫学会連合 (International Union of Immunological Societies) のアレルゲン命名分科委員会 (Sub-Committee for Allergen Nomenclature) で国際命名規約に基づき、分子量約 25 kDa のアレルゲン活性成分をグループ I (後に 1) または Der I (後に 1)、分子量約 15 kDa のアレルゲン活性成分をグループ II (後

表 3 ■精製ダニアレルゲンの生化学的特性

国際命名法	慣用名	起源	MW (kDa)	pI	特徴	報告年	報告者
ヤケヒョウヒダニ							
<i>Der p</i> 1	P ₁	WMC	24* ¹	4.7~5.4, 6.6~7.1	F ₄ P ₁ 中の主要抗原。等電点的に 2 つのピークで非常によく似たアミノ酸組成。抗 P ₁ -IgE 抗体は血清 IgE 中の平均 12%。	1980	M.D. Chapman ら
	Dpt 12	WMC	24* ² 27* ¹	4.5~6.6 5.86~6.95	主要成分 pI 6~7, マイナー成分 pI 4~5, P ₁ 相当。	1980	G.A. Stewart ら
	Dp 42	WMC	17~18* ² 25~30* ¹	4.5~6.3 4.6, 5.6, 6.6	P ₁ 相当。	1982	G.A. Stewart ら
	DP 1	WMC	25* ¹	4.6~7.2	SDS-PAGE, IEF, アミノ酸組成の点で DF1 と類似。	1985	P. Lind
<i>Der p</i> 2	DpX	WMC	18~20* ^{1,2}	5.0, 6.4		1989	H. Yasueda ら
	DP 2	WMC	15* ²	7.6~8.5	SDS-PAGE, IEF, アミノ酸組成の点で DF1 と類似。	1989	H. Yasueda ら
<i>Der p</i> 3		WMC	31* ²	3.7~7.4, >8	トリプシン様セリンプロテアーゼ。9 つのアイソフォーム。31 kDa (主要), 34 kDa (マイナー)。力価 粗抗原> <i>Der p</i> 1>トリプシン	1992	G.A. Stewart ら
<i>Der p</i> 4		WMC	56* ¹	5~7	α -アミラーゼ。56~59 kDa (非還元), 60~63 kDa (還元) と変動。	1991	R. Lake ら
<i>Der p</i> 6	DP 5	WMC	25* ¹ , 27* ²	4~5	キモトリプシン様セリンプロテアーゼ。	1993	H. Yasueda ら
コナヒョウヒダニ							
<i>Der f</i> 1	Ag 11	WMC	25* ² 28* ^{1,2}		主要アレルゲン。糖タンパク質。P ₁ 相当。	1981	J. Le Mao ら
	Df 6	MB	17* ² , 28* ¹	4.9~6.9		~2	P. Lind
	DF 1	MB	25* ¹	4.6~7.2	熱感受性の酸性糖タンパク質。	1986	H. Yasueda ら
	Me 2	WMC	27* ¹		P ₁ , DF1, Dpt 12, Dp 42 に類似。	1989	N. Yamashita ら
<i>Der f</i> 2	Me 1	WMC	17* ^{1,2}	8.0	DF2, DP2, Dpx に類似。	1985	M. Haida ら
	Ag 19/20 IIa	MB	8.5* ² , 14.5* ¹	8.0	ガラクトサミンを含有。	1986	A. Holck ら
	DF 2	WMC	15* ¹	7.8~8.3	熱安定な塩基性タンパク質。	1986	H. Yasueda ら
<i>Der f</i> 3		WMC	29* ¹	4.1~4.7	<i>Der f</i> 1 および <i>Der f</i> 2 より低反応性。	1989	P.W. Heymann ら
	Df- プロテアーゼ	WMC	30* ^{1,2}		セリンプロテアーゼ。酵素活性に基づいて精製。	1990	K. Takahashi ら
		WMC	31* ²	4.2~4.4	トリプシン様セリンプロテアーゼ。2 つのアイソフォーム。	1992	G.A. Stewart ら
		WMC	34* ^{1,2}			1993	T. Ando ら
<i>Der f</i> 6	DF 5	WMC	25* ¹ , 27* ²	4~5	キモトリプシン様セリンプロテアーゼ。	1993	H. Yasueda ら
	PK.1-3	MB	20, 30, 60* ²		20 kDa, 30 kDa: システインプロテアーゼ。60 kDa: トリプシン様プロテアーゼ。	1989	Y. Ino ら
	LM-1 s	WMC	8* ¹ , 13* ²	4~5	3 つの成分で類似した特性をもつ糖タンパク質。	1994	T. Yamaguchi ら
	LM 2	WMC	4* ² , 6~8* ¹	3~5	結膜反応活性をもつアレルゲン。	1994	T. Yamaguchi ら
	HM-1-2-s	WMC	150~155* ²		6 つの画分からなるそれぞれ糖タンパク質。	1995	S. Shigeta ら

WMC: ダニ飼育物抽出物, MB: ダニ虫体抽出物, *¹: SDS-PAGE, *²: ゲル濾過, IEF: 等電点電気泳動法

に 2) または *Der* II (後に 2) アレルゲンと分類するように統一された⁽¹⁰⁾。

この 2 つのグループが主要なアレルゲンであると考えられたが、1988 年、van der Zee らはグループ 1 と 2 のアレルゲんに特異的なモノクローナル抗体カラムによって、両抽出物からこれらを除去しても、残りの成分のアレルゲン活性にほとんど変化がみられないことから、グループ 1 と 2 のアレルゲン活性は全アレルゲン活性のほ

んの一部にしかすぎないという注目すべき報告を行なった。

2. 電気泳動によるアレルゲン活性成分の同定

アレルゲンを精製してその特性を解明しようとする一方、電気泳動後の血清 IgE 反応性を指標に、アレルゲン活性成分の探索も行なわれた。1984 年に、Krilis らは交差放射免疫電気泳動により、ヤケヒョウヒダニ虫体抽出

表 4 ■ ダニアレルゲン遺伝子のクローニングと特性

名称	アミノ酸 残基数	MW	特徴	報告年	報告者
<i>Der p 1</i>	222	25,371	システインプロテアーゼと 20~30%の相同性	1988	K.Y. Chua ら
<i>Der p 2</i>	129	14,131	<i>Der f 2</i> と 88%の相同性	1990	K.Y. Chua ら
<i>Der p 3</i>	232	24,985	pI 8.5, トリプシン様プロテアーゼと 50%の相同性. SDS-PAGE 上で 28 と 30 kDa のダブルレットのバンド	1994	W.A. Smith ら
<i>Der p 5</i>	148	17,460		1989	E.R. Tovey ら
<i>Der p 7</i>	198	22,177	抗血清は 24, 27, 29 kDa のバンドと反応	1993	H.D. Shen ら
<i>Dp 15</i>	219	25,589	pI 6.3, グルタチオン S-トランスフェラーゼと 50%の相同性	1994	G.M. O'Neil ら
<i>Der f 1</i>	222	25,191	<i>Der p 1</i> と 81%の相同性	1991	R.J. Dilworth ら
<i>Der f 2</i>	129	14,043	DNA 多型を観察	1990	T. Yuuki ら
<i>Der f 2</i>	129	14,021	<i>Der p 2</i> と 88%の相同性	1991	M. Trudinger ら
<i>mag 1</i>	341	39,000?	ORF が未同定. 抗血清が SDS-PAGE 上で 39 kDa および高分子領域にも反応	1994	T. Aki ら
<i>mag 3</i>	349	177,000	ORF が未同定. 抗血清が SDS-PAGE 上で 177 kDa のバンドと反応	1995	A. Fujikawa ら
<i>mag 29</i>	145	67,000	ORF が未同定. hsp 70 と 15~65%の相同性	1994	T. Aki ら
<i>mag 44</i>	284	32,954	トロポミオシンと 58~76%の相同性	1995	T. Aki ら

物から 51 種の抗原を検出し,そのうちの抗原性の異なる 11 種が患者血清 IgE と結合したことを報告した. 一方, Lind らおよび Dale らは, 同じ手法を用いてヤケヒョウヒダニとコナヒョウヒダニ飼育物から, それぞれ 9 および 11 種のアレルゲン活性成分を検出した. 1986 年に, de la Hoz らは等電点電気泳動法により, pI 4.4~7.0 に 3 群のアレルゲン活性成分を見いだした. また 1987 年, Arlian らはコナヒョウヒダニ虫体と飼育物から交差免疫電気泳動によりそれぞれ 35 種と 20 種の抗原を検出した. さらに交差放射免疫電気泳動では 14 種と 7 種の抗原が患者血清 IgE と反応し, しかも, その多くは沈降線が異なることを報告した.

Tovey らも, ヤケヒョウヒダニ虫体と飼育物からそれぞれ 26 と 19 成分が RAST 法により患者血清 IgE と反応することを報告した. 続いて, 免疫ブロッティングにより, とともに 5 つのバンドが患者血清 IgE と高頻度に反応すること, および患者によって反応する成分の異なることを明らかにした. さらに, 高解像度の免疫ブロッティングを行ない, ヤケヒョウヒダニ中に分子量 6~110 kDa に及ぶ 32 種のアレルゲン活性成分を見だし, ダニアレルゲンの総括的な解析が必要であることを主張した. Nakanishi ら (1990 年) および Wahl ら (1991 年) は, それぞれコナヒョウヒダニ中に 29 (分子量 13~140 kDa), ヤケヒョウヒダニ中に 12 (分子量 1.35~670 kDa) の成分をアレルゲンとして同定し, 特に両者とも高分子成分が重要であると強調した. このように, 患者血清 IgE の結合活性を指標とした免疫電気泳動や免疫ブロッティングによる解析の結果を総合的にみると, 両者のダニ虫体や排泄物もしくは飼育物由来の抽出物中にそれぞれ 29 および 32 種類にも及ぶアレルゲン成分が検出されたこ

とになる.

3. ダニアレルゲン遺伝子のクローニング

これまでの研究から免疫生化学的手法による単一抗原の取得は困難であると考えられたので, アレルゲン遺伝子クローニングの研究が進んだ. その結果を表 4 に示す. これからもわかるように, 遺伝子レベルでも *Der 1* および *Der 2* の主要抗原とほぼ同じ分子量をもつ異なるアレルゲン分子種の存在が明らかになった.

4. 新規アレルゲンの発見

Der p 1 遺伝子がプロテアーゼをコードしていることがわかったので, 未同定の重要なアレルゲンの中にも消化酵素があるだろうという予測のもと, 酵素活性に基づいて精製し, 容易に生化学的な特徴付けも行なわれるようになった. 1989 年に Heymann らは, コナヒョウヒダニ飼育物から患者血清 IgE に高反応性の分子量 29 kDa の *Der f 3* の分離を報告し, 次にこれがセリンプロテアーゼで, 主要なアレルゲンであることを Stewart らが明らかにした. 1991 年に, Lake らも高い血清 IgE 結合活性をもつ, アミラーゼ活性を有する分子量 56 kDa の *Der p 4* を分離した. 一方, Yasueda らは, コナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニ飼育物から, 比較的高い血清 IgE 反応性を示し, グループ 1 とは異なるキモトリプシン活性を有する分子量約 25 kDa の *Der 6* の分離を報告した (1993 年).

ダニ抗原の分離・精製とその免疫化学的的特性の解析⁽¹¹⁾

ダニアレルギーの研究は, 1986 年晩秋に鳥居薬品(株)

からダニ虫体抽出物を 10 mg 提供していただいたことに始まる。その一部を患者血清 IgE を用いてイムノブロットし、主要抗原以外の高分子領域により強く反応していることに、また主要抗原でも用いる患者血清によって微妙に染色バンドが異なっていることに驚いた。それ以降、今までのダニアレルギー研究の最大の障害は、化学分析に耐えるだけの大量のダニの収集がきわめて困難な点であった。ダニを飼育したことも、もちろん見たこともない筆者らが、如何にして多量のダニを取得するかという問題に直面し、この研究もしばらく停滞してしまった。幸いなことに、1987 年、地元の殺虫剤メーカーのフマキラー(株)開発本部がダニの飼育を始め、本研究に対する全面的な支援が得られ、大きな前進をみた。

本格的な大量飼育と飼育物からのアレルギーの分画は 1988 年以降となるが、その間に得られた飼育物は、主要アレルギーについての疑問点の解明にあてられた。次に、アレルギーの検出方法として、皮内反応試験、免疫電気泳動法、免疫ブロッティングなどを主体とした手法に加えて、*in vivo* のアレルギー反応により近い形で *in vitro* で再現できるヒスタミン遊離測定法を採用した。これによって今までの方法では検出できなかった新規なアレルギーを見いだす可能性が期待できた。さらに、従来の測定法の欠点を補って、できるだけ少量の患者血液を用いてルーチンワークに測定できる HPLC によるヒスタミン測定システムを島津製作所分析センターの協力の下に開発できた。これを用いて、研究の出発材料として kg 単位のダニ飼育物から微量で複雑な組成の抗原成分の、特に高分子量抗原とこれと交差反応性の低分子量抗原を中心に分画を行なった。また同時に、ダニアレルギー患者とその血清も、従来の研究とは異なり、皮内反応陽性者を任意に選択してデータが偏る可能性を排除した。

その結果、

① 患者血清に特異的に強い反応性を示す高分子量アレルギー成分をダニ排泄物抽出物に見だし、それを各種クロマトグラフィーを組み合わせで精製し 6 画分を得た。この 6 画分の分子量はいずれもゲル濾過で 150~155 kDa と見積もられた。そのうち 1 画分は、抗原特異的な T 細胞活性化能を有していた。これら 6 画分は、皮内反応陽性率、患者感受性、患者血清 IgE との反応頻度などから、ダニアレルギー患者の多数例が特異 IgE 抗体をもつ、新しいアレルギーであると考えられた。

② これまでの研究では、主要アレルギーを含めて、喘息の誘発性に関与する抗原は見つかっていない。そこでヒスタミン遊離測定法を用いて、結膜反応活性を指標に粘膜透過性の優れた、即時型喘息誘発に関与すると考え

られる低分子量のアレルゲンの探索を行なった。2 つの低分子量アレルギー活性画分のうち、より低分子量の画分(ゲル濾過で 4 kDa, SDS-PAGE で 6~8 kDa)が、ダニと室内塵に皮内反応陽性の患者に特異的に結膜反応を与えた。この画分は、複数の高分子アレルギーの分解物を含む多様性に富んだ抗原で、特に減感作著効画分と高い交差反応性を示すことより、エピトープの構造解析に利用できる抗原でもある。この抗原は通常の検出法である ELISA 法や交差免疫電気泳動法では検出しにくいという特徴をもっている。このため、従来の研究では見落とされてきたものと考えられる。

③ 2 つの低分子量アレルギー活性画分のうち、より高分子量の画分から、各種クロマトグラフィーを組み合わせで 3 種の精製アレルギーを得た。これらの精製アレルギーのいずれもが、ゲル濾過では 13 kDa, SDS-PAGE では 8 kDa として挙動した。抗血清との交差反応性の解析より、*Der f* 2 と共通の抗原決定基を含むアレルギーであることが示唆された。

減感作治療用抗原画分の分画と臨床への応用⁽¹²⁾

好塩基球からのヒスタミン遊離を誘発する抗原成分が患者により大きく異なること、患者が複数の違った組み合わせの抗原成分によって感作されていること、さらに予想をはるかに超える多種類のアレルギー分子種の存在することが、ダニアレルギー患者ヒスタミン遊離測定法により見いだされた。これらの事実は、治療用抗原として単一の抗原ではなく、複数の交差反応性の高い抗原を組み合わせることが重要であることを示している。

そこで、減感作治療の第一歩として、皮内反応、患者血清および動物血清との反応性、ならびに収量をもとに、ダニ排泄物抗原を分画した。そのうちの高反応性画分は主要抗原 *Der f* 1 および *Der f* 2 を含まず、症例数は未だ充分とはいえないが、減感作治療に著効な画分であった。この画分で減感作治療中の患者の抗体価の上昇、および抗体サブクラスの変動、ならびに好塩基球のアレルギー感受性の変化と治療効果との相関性を継続解析中である。

新規ダニアレルギー遺伝子のクローニング⁽¹³⁾

ロットの異なるダニ飼育物から、研究室規模で調製される安全・確実に奏効する高性能治療用抗原を、成分組成が一定で、かつ永続的に力価も安定し、しかも多量に調製することは、生化学的手法のみでは困難である。そ

こで、ペプチドワクチンの開発を目指して1988年秋にダニアレゲン遺伝子のクローニングを開始した。得られたcDNAクローンのクロス-ハイブリダイゼーションによって、アレゲンを9グループに分画した。

このうちの発現産物で免疫化学的特性の明らかになったものとして、Chuaらの報告を手にする少し前に、研究室で初めてクローニングされた*mag 1*がある。 β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現され、特異IgE抗体との反応頻度は、皮内反応陽性患者43例中13例、ヒスタミン遊離試験陽性15例中5例であった。そのときの*Der f 1*および*Der f 2*に対する反応頻度は、それぞれ22/43と2/15および24/43と2/15であった。この融合タンパク質のヒスタミン遊離試験とELISA阻害試験の結果から、ダニ虫体中の*mag 1*に対応するアレゲン含量は、0.25%(w/w)かそれ以下であると見積もられた。しかし、ダニ虫体粗抗原で観察されるヒスタミン遊離量の約30%を与える高活性なアレゲンであった。次に、*mag 1*遺伝子を3'および5'末端から欠損させ、IgEエпитープが配列の異なる2領域にコードされていることを見いだした。より強く反応した領域の合成ペプチドはELISA反応を阻害したが、それ自身では皮内反応もヒスタミン遊離反応も示さなかった。このエпитープを構成する12アミノ酸の各残基をGlyで置換して、IgE抗体結合活性に関与する必須アミノ酸残基を調べたところ、①患者毎に著しい差異があること、②すべてのアミノ酸残基が抗体結合に関与していること、③親水性のアミノ酸残基が比較的重要であること、④特にArgがすべてのケースで必須であることが明らかになった。

*mag 3*はあるタンパク質の一部をコードしているが、この発現産物は抗原特異的にT細胞を活性化した。次に、抗リコンビナントMag3カラムを用いて、ダニ虫体抽出物から唯一Mag3と交差反応する177 kDaのタンパク質を単離し、これを*mag 3*に対応するタンパク質とした。このタンパク質のIgE結合頻度は主要抗原*Der f 2*に匹敵した。*mag 44*は、ホモロジー検索で、動物由来トロポミオシンと高い相同性を示した。虫体から抽出・精製したトロポミオシンは、主要抗原*Der f 1*と*Der f 2*に匹敵するIgE結合頻度をもっていた。このトロポミオシンは、エビアレルギーの原因となるエビトロポミオシンと交差反応性を示す。一方、*mag 29*はhsp 70の一部をコードしている遺伝子で、全領域をコードする遺伝子は取得されていない。そのためか、発現産物のIgE反

応頻度は低いが、hsp 70がアレゲンであることを示した最初の例である。

*

ホヤ喘息の研究は、岡 智教授(現広島大学工学部名誉教授)と城 智彦院長(現県立広島病院名誉院長)を中心としたグループの20数年に及ぶ研究で得られた成果である。興味のある方は、両先生の書かれた総説を参照されたい⁽³⁻⁵⁾。一方、ダニアレルギー研究は発展途上であり、特にアレゲンの構造と機能などについては誌面に書き尽くせないところが多々ある。これらについては別の機会にまとめたいと考えている。現在、減感作治療に著効な画分の再分画による有効成分の濃縮とその成分の遺伝子クローニングを行っており、さらに今までの研究で得られた高IgE反応性画分をこの著効画分に添加することにより、より多くの患者に安全・確実に奏効する減感作治療薬の開発へと歩みを進めている。

筆者らの研究室で得られた成果は、岡 智、城 智彦両先生とその共同研究者(重田征子、勝谷 隆、大塚 正、坪井信治、麻奥良子各先生)、細胞レベルの研究については広島大学医学部山下優毅教授、および遺伝子のクローニングについては広島大学工学部室岡義勝教授(現阪大教授)と山下光雄先生(現阪大)の御指導のもと、また多くの大学院生および学部生の協力で得られたものであり、ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) 城 智彦: “現代病理学大系 6 免疫”, 中山書店, 1994, p. 355.
- 2) 光井庄太郎: “アレルギー学の歩み”, 医学の門社, 1980, p. 116.
- 3) T. Jyo *et al.*: “Occupational Asthma”, Van Nostrand Reinhold, New York, 1980, p. 209.
- 4) 岡 智ら: 感染・炎症・免疫, **16**, 225 (1986).
- 5) 城 智彦ら: 医学の歩み, **159**, 565 (1991).
- 6) T.A.E. Platts-Mills *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **80**, 755 (1987); *Bull. WHO*, **66**, 769 (1988); *J. Allergy Clin. Immunol.*, **83**, 416 (1989); *J. Allergy Clin. Immunol.*, **89**, 1046 (1992).
- 7) F. Carswell: *Immunology*, **65**, 497 (1988).
- 8) M.D. Chapman: *Curr. Opin. Immunol.*, **2**, 525 (1990).
- 9) L.G. Arlian: *Exp. Appl. Acarol.*, **10**, 167 (1991).
- 10) D.G. Marsh *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **80**, 639 (1987); T.P. King *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 5 (1995).
- 11) T. Yamaguchi *et al.*: *Jpn J. Allergol.*, **42**, 1754 (1993); **43**, 815 (1994).
- 12) 麻奥良子ら: アレルギー, **44**, 692 (1995).
- 13) T. Aki *et al.*: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **103**, 349 (1994); *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 74 (1995).