

学位論文題名

Differences in titres of IgE, IgG4 and other IgG subclass anti-*Der p*II antibodies in allergic and non allergic patients measured with recombinant allergen.

(ヤケヒョウヒダニ・グループII抗原に対する、ダニアレルギー患者及び非ダニアレルギー患者血清中IgE およびIgG サブクラス抗体の測定と解析)

学位論文内容の要旨

ヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*以下*Der p*と略)はコナヒョウヒダニと共に気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎発症の主要抗原である。これらのヒョウヒダニ抗原には現在少なくともI,II,IIIの3つの主要抗原が同定されており、ヤケヒョウヒダニ・グループII抗原(以下*Der p* IIと略)は129アミノ酸より構成される分子量14 kDaの蛋白である。この*Der p* IIに対する特異的IgE抗体はダニアレルギーの患者の約80%に検出される。

アレルギー患者の抗原特異的IgGサブクラス抗体の作用及び意義に関しては、IgG4抗体の遮断抗体としての作用が一部に報告されている以外は明らかではない。今回、リコンビナント*Der p* II(以下r-*Der p* IIと略)抗原を作製、精製し、これを用いてELISA法にてダニアレルギー患者の特異的IgEおよびIgGサブクラス抗体を解析した。

(対象) 気管支喘息・アトピー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎の診断を受けた、1歳5月から17歳の240名の市販ダニ特異IgE抗体陽性の患者より血清を採取した。コントロールはアレルギー疾患の既往、症状を認めない小児25名とした。

(r-*Der p* II抗原の作製と精製) PCR法にて増幅した*Der p* II cDNAを蛋白融合ベクターであるpMALc2に挿入し、大腸菌TB1に形質導入した。融合蛋白は42 kDaのmaltose-binding proteinと14 kDaのr-*Der p* IIが融合した、56 kDaの融合蛋白として産生された。LB培地で培養後、超音波破碎し融解されたr-*Der p* II融合蛋白をアフィニティー・クロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーの順で精製した。SDS-PAGEで56 kDaのr-*Der p* II融合蛋白を単一のバンドとして得ることができた。

(ELISA) プラスチック・マイクロプレートにr-*Der p* II融合蛋白をコーティングし、ブロッキング後使用時まで保存した。希釈した0.1mlの血清をプレートに添加し、2時間室温で反応させた。血清の希釈は、IgE 400倍、IgG_{total} 500倍、IgG1・IgG2・IgG4 200倍、IgG3 25倍とした。IgE抗体測定の場合のみ、洗浄後ビオチン標識のヤギ抗ヒトIgE抗体を2000倍希釈で反応させ、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンを用い発色させた。IgG_{total}抗体測定にはペルオキシターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を反応させ発色

させた。IgG1, IgG2, IgG3, IgG4の各抗体測定には1000倍希釈のマウス抗ヒトIgGサブクラス抗体をそれぞれ反応させ、ペルオキシターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を用い発色させた。吸光度は492nmで測定した後、標準血清（16歳、アトピー性皮膚炎、血清IgE16000IU、Der p 粗抗原に対するCAP RAST 100<）を基準としU（ユニット）として表した。各々のELISA系に関して日差試験、同時試験を行ったが、何れの系も満足できる結果を得ることができた。又、アレルギー患者グループと非アレルギー患者グループとの各々の抗体価に関してはt検定にて統計処理した。

（結果）r-Der p II融合蛋白に対する特異IgE, IgGtotal, IgGサブクラス抗体の各々の測定系で、標準血清を用いた回帰曲線も直線として得る事ができた。アレルギー患者グループと非アレルギー患者グループとの各々の抗体価について比較検討したところ、特異IgE抗体と特異IgG4抗体で明らかな相違が認められた。特異IgE抗体はアレルギー患者グループで366.4U、非アレルギー患者グループで103.7Uと前者で有意な高値を示した

（ $p=0.0008$ ）。又、特異IgG4抗体でもアレルギー患者グループ879.1U、非アレルギー患者グループ420.1Uと前者が有意な高値を示した（ $p=0.0033$ ）。次にアレルギー患者グループにおけるr-Der p II融合蛋白に対する特異IgE, IgGtotal, IgGサブクラス抗体の、各々の抗体価の相関について検討した。血清IgE値と特異IgE抗体価の両者の間には高い正の相関が認められた（ $r_2=0.445$ ）。しかし特異IgGtotalと特異IgGサブクラス抗体価の相関では、IgGtotalとIgG1（ $r_2=0.466$ ）、IgGtotalとIgG2（ $r_2=0.217$ ）、IgGtotalとIgG3（ $r_2=0.356$ ）の間で正の相関が認められたが、IgGtotalとIgG4の間には相関が認められなかった（ $r_2=0.057$ ）。さらにアレルギー患者グループで高値を示した特異IgE抗体価と特異IgG4抗体価の相関を検討したが、両者には相関関係は認められなかった（ $r_2=0.035$ ）。

（考按）アレルギー疾患の代表的抗原である、Der p II抗原を融合蛋白の形で作製、精製する事ができた。代表的抗原を簡便に、しかも安定した形態で供給できる事は意義深いと考える。これまでのところ精製されたダニ主要抗原を用いたIgGサブクラス抗体価の解析は報告されていない。今回のリコンビナントダニ主要抗原Der p IIを用いた解析の結果、抗原特異的IgE抗体とIgG4抗体が、アレルギー疾患患者で高値であることを見いだした。これはFlorineらが報告したネコの主要抗原であるFel d Iに対するIgGサブクラス抗体の解析、及びHenrikkiらが報告したモスキートの唾液に対する特異IgGサブクラス抗体の変化と同様のものではあった。また特異IgE抗体と特異IgG4抗体の相関関係は認められなかった。小林らのDer p II抗原に対するIgE抗体とIgG4抗体のエピトープに相違が認められるとの報告を考え合わせると、ダニ主要抗原Der p IIに対する特異IgE, IgG4抗体の産生は同一のクラススイッチメカニズムでは説明できないことを示唆するものと考えられた。今後特異IgG4抗体のアレルギー患者における臨床的意義を解明するには、経時的に抗体価の推移を測定し、臨床症状・治療法・重症度などとの関係を明らかにする必要があると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Differences in titres of IgE, IgG4 and other IgG subclass anti-*Der p*II antibodies in allergic and non allergic patients measured with recombinant allergen.

(ヤケヒョウヒダニ・グループII抗原に対する、ダニアレルギー患者及び非ダニアレルギー患者血清中IgE およびIgG サブクラス抗体の測定と解析)

ヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*以下Der pと略)はコナヒョウヒダニと共に気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎発症の主要抗原である。これらのヒョウヒダニ抗原には現在少なくともI, II, IIIの3つの主要抗原が同定されており、ヤケヒョウヒダニ・グループII抗原(以下Der p IIと略)は129アミノ酸より構成される分子量14kDaの蛋白である。このDer p IIに対する特異的IgE抗体はダニアレルギーの患者の約80%に検出される。アレルギー患者の抗原特異的IgGサブクラス抗体の作用及び意義に関しては、IgG4抗体の遮断抗体としての作用が一部に報告されている以外は明らかではない。今回、リコンビナントDer p II(以下r-Der p IIと略)抗原を作製、精製し、これを用いてELISA法にてダニアレルギー患者の特異的IgEおよびIgGサブクラス抗体を解析した。【対象】気管支喘息・アトピー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎の診断を受けた1歳5か月から17歳の240名の市販ダニ特異IgE抗体陽性の患者より血清を採取した。コントロールはアレルギー疾患の既往、症状を認めない小児25名とした。【r-Der p II抗原の作製と精製】PCR法にて増幅したDer p II cDNAを蛋白融合ベクターであるpMALc2に挿入し、大腸菌TB1に形質導入した。融合蛋白は42kDaの maltose-binding proteinと14kDaのr-Der p IIが融合した、56kDaの融合蛋白として産生された。LB培地で培養後、超音波破碎し融解されたr-Der p II融合蛋白をアフィニティー・クロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーの順で精製した。SDS-PAGEで56kDaのr-Der p II融合蛋白を単一のバンドとして得ることができた。【ELISA法】マイクロプレートにr-Der p II融合蛋白を被覆し、ブロッキング後使用時まで保存した。希釈した0.1mlの血清をプレートに添加し、2時間室温で反応させた。血清の希釈は、IgE 400倍、IgGtotal

500倍、IgG1・IgG2・IgG4 200倍、IgG3 25倍とした。IgE抗体測定の場合のみ、ビオチン標識のヤギ抗ヒトIgE抗体を2,000倍希釈で反応させ、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンを用いた。IgGtotal抗体測定にはペルオキシターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を反応させ発色させた。IgG1, IgG2, IgG3, IgG4の各抗体測定には1,000倍希釈のマウス抗ヒトIgGサブクラス抗体をそれぞれ反応させ、ペルオキシターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を用いた。吸光度は492nmで測定した後、標準血清（16歳、アトピー性皮膚炎、血清IgE16,000 IU、Der p 粗抗原に対するCAP RAST 100<）を基準としU（ユニット）として表した。統計処理はt検定を用いた。【結果】r-Der p II融合蛋白に対する特異IgE, IgGtotal, IgGサブクラス抗体の各々の測定系で、標準血清を用いた回帰曲線は直線を示した。アレルギー患者グループと非アレルギー患者グループとの各々の抗体価について検討したところ、特異IgE抗体はアレルギー患者グループで366.4U、非アレルギー患者グループで103.7Uと前者で有意な高値を示した（ $p=0.0008$ ）。特異IgG4抗体はアレルギー患者グループで879.1U、非アレルギー患者グループで420.1Uと前者が有意な高値を示した（ $p=0.0033$ ）。アレルギー患者グループにおけるr-Der p II融合蛋白に対する特異IgE, IgGtotal, IgGサブクラス抗体における各々の抗体価の相関をみると、IgGtotalとIgG1（ $r^2=0.466$ ）、IgGtotalとIgG2（ $r^2=0.217$ ）、IgGtotalとIgG3（ $r^2=0.356$ ）の間で正の相関を認めたが、IgGtotalとIgG4の間には相関はなかった（ $r^2=0.057$ ）。さらに特異IgE抗体価と特異IgG4抗体価の間にも相関を認めなかった（ $r^2=0.035$ ）。【考按】アレルギー疾患の代表的抗原であるDer p II抗原を融合蛋白の形で発現させ、精製した。これまで精製されたダニ主要抗原を用いたIgGサブクラス抗体価の解析は報告されていない。今回のリコンビナントダニ主要抗原Der p IIを用いた解析の結果、抗原特異的IgE抗体とIgG4抗体が、アレルギー疾患患者で共に高値であることを見いだした。これはFlorineらが報告したネコの主要抗原であるFel d Iに対するIgGサブクラス抗体の解析、及びHenrikkiらが報告したモスキートの唾液に対する特異IgGサブクラス抗体の変化とほぼ一致する結果であった。一方、特異IgE抗体価と特異IgG4抗体価間の相関関係は認められなかった。小林らのDer p II抗原に対するIgE抗体とIgG4抗体のエピトープに相違が認められるとの報告を考え合わせると、ダニ主要抗原Der p IIに対する特異IgE, IgG4抗体の産生は単なるクラススイッチメカニズムでは説明できないことを示唆する。特異IgG4抗体のアレルギー患者における臨床的意義は未だ不明である。今後、経時的にIgG4抗体価の推移を測定し、臨床症状・治療法・重症度などとの関係を明らかにする必要があると考える。

本研究はダニアレルギーの主要抗原であるDer p IIを融合蛋白として大腸菌に発現させ、分離精製し、それを用いてIgE, IgGサブクラス特異抗体測定系を確立した。この測定系でアレルギー患者と健康小児血清を検索し、特異IgE抗体と特異IgG4抗体は共にアレルギー患者で高値を示したが、両特異抗体間では相関がないことを見出し、IgEとIgG4抗体の調節は異なる機序であることを明らかにした。審査員一同はこれを高く評価し、博士（医学）の学位に値するものと判定した。