

抗原多様性がアレルギー病態発症に与える影響

5年B組 阿久津優衣

指導教員 櫻井 昭

1 要約

先進国ではアレルギー患者の数が急速に増加している。私たちは過去と現在の環境変化に着目し、アレルギー病態の発症が抗原多様性或化学物質に関連していると仮説を立てた。そこで、抗原多様な環境と清潔な環境を模擬し、アレルギー反応において抗原と化学物質の影響を調査した。結果は、アレルギー反応は共抗原処理によって抑制され、共化学処理によって促進される可能性が示唆された。

キーワード：アレルギー、抗原多様性、IgE、IgG2a

2 背景

近年、主に日本国内でアレルギー患者が急増しており、日本人の2人に1人が何らかのアレルギーを発症している状況にある。またアレルギーは、日本だけではなく様々な国で社会問題となりつつある^{*1}。急増の原因について、衛生仮説や化学物質説、腸内環境説、家屋密閉説など様々な説が提唱されているが、詳細なメカニズムは未だ解明されていない。そこで、父が田舎に住んでいた頃はアレルギー体質ではなかったが、都会に移り住んでから数々のアレルギーを発症したという経験に基づき、抗原多様性説を提唱した。

3 アレルギー反応のメカニズム

アレルギーは免疫応答の違いによって5種類に分類される。I型アレルギーの代表疾患はアナフィラキシーや花粉症などがあげられ、IgEや肥満細胞を介して反応が起こる。II型アレルギーやIII型アレルギー、V型アレルギーは、溶結性貧血や皮膚血管炎など自己免疫が細胞や身体が破壊することにより発症する。一方IV型アレルギーは、他

の反応は体液性免疫が働くのに対し、細胞性免疫によって炎症が誘導される。本研究では主に、I型とIV型アレルギー反応に注目した。

I型アレルギーでは、まず樹状細胞がアレルゲンを捕食し、Th細胞に抗原提示を行う。Th細胞は抗原を提示された場合Th1に、アレルゲンを提示された場合はTh2に分化する。Th2に分化したTh細胞が増殖し、IL-4などのサイトカインを産出し、B細胞のIgE抗体産生を促進する。産生されたIgE抗体が肥満細胞に結合し、そのIgE抗体にアレルゲンが結合することで架橋する。最終的に肥満細胞からヒスタミン等が放出され、粘膜の炎症を引き起こされる(図2)。一方IV型アレルギーでは、まずマクロファージがアレルゲンを捕食し、Th細胞に抗原提示を行う。Th細胞は分化後、曝露患部に遊走し、リンフォカインを放出する。リンフォカインによってマクロファージや肥満細胞の働きが活性化される。活性化したマクロファージはケモカインを放出し、炎症の原因となる好酸球や好塩基球を患部に集める。(図3)。

4 仮説

父は和歌山県の田舎町で、薪の五右衛門風呂や井戸水を利用し、畑の草むしりを手伝い、水泳の授業は海で行うなど、虫や菌が身近に存在する抗原多様な環境で生活していた。その頃は家の前に杉の木が生えていたにも関わらず、花粉症などの症状は一切なかった。一方、大学から奈良県での生活を始めた頃、衛生環境が改善され、消毒や手洗いも一般的になったが、花粉症など各種アレルギーを発症した(図4)。また、一般的にアレルギー患者は1960年以降2020年代に至るまで増加の一途をたどっている。この経験をもとに、これまでに提唱されている各種仮説の妥当性を検証した。

まず、化学物質説^{*2}については、大気中の化学物質の量は奈良のほうが多いことから、一定の根拠があると考えたが、大気中の化学物質の濃度は近年減少傾向にあることから、アレルギー患者増加の唯一の根拠とは考えにくい。次に、現状有力とされる衛生仮説^{*4}は、家畜などで排出されるエンドトキシンの減少を原因とするが、父の育った田舎町は畜産業がなかったことから、この仮説にも疑問がある。さらに、腸内環境説や家屋密閉説は、いまだデータが不十分であることに加え、機序も不明確である。

これらの検討から、近年のアレルギー患者の増加には、これまでに提案されている仮説とは別の要因が存在し、その一つとして、抗原多様性が影響しているのではと考

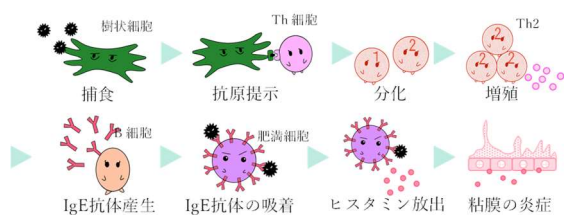


図1: I型アレルギー反応の機序

えるに至った。

そこで、抗原多様性がアレルギーの抑制に影響する可能性について検討した。まず、清潔な環境では、免疫がアレルゲンに集中して反応を起こし、アレルギー反応が起きやすくなる。一方で、抗原多様な環境では、免疫が様々な抗原に対して一様に働くため、アレルギーが起こりにくくなるという仮説を立てた。先行研究により、アレルギー反応は、Th細胞が特定のアレルゲンに対応するTh2細胞に分化することで、Th1/Th2バランスがTh2優位になることによって発症することが知られている。様々な抗原が存在することで、Th1/Th2のバランスが正常になり、アレルゲンが侵入してきた際も、Th2が優位になることなく、アレルギー反応が起こりにくくなる可能性がある。また、マスト細胞の周囲にIgE抗体が結合し、IgEとアレルゲン間で架橋が起こることにより、ヒスタミン等のサイトカインが放出され、アレルギー反応が発現することも知られている。IgE抗体は抗原特異的に産生されるため、抗原多様な環境下では複数種類の抗体が生成される。マスト細胞に隣接して結合するIgE抗体の種類が異なると、架橋が起こりにくくなり、アレルギー反応が抑制される可能性がある。今回行った実験の目的は、これらの仮説の妥当性を検証することにある。

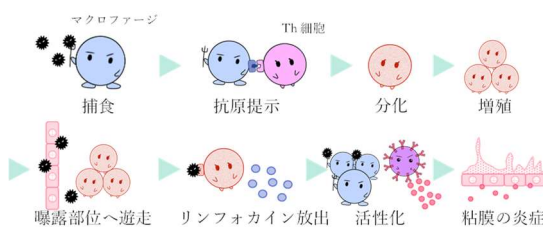


図1: IV型アレルギー反応の機序

5 実験方法

マウス

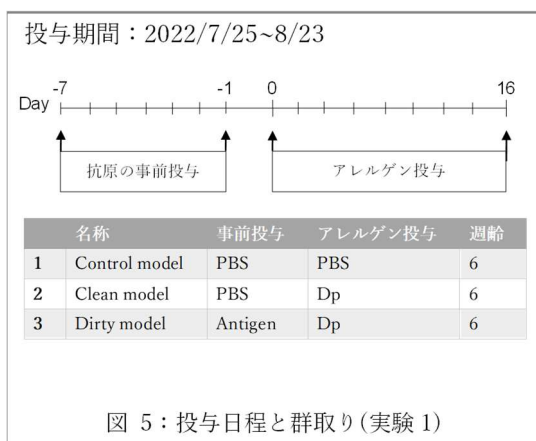
生後 3 週齢および 6 週齢の雌 NC/Nga マウスを日本エスエルシーより購入した。通常のマウスでアレルギーを発症させるためには、投与期間を長くする必要があり困難だった。そのため、先行研究を参考にし、ダニにアレルギー反応を示しやすいノックアウトマウスを用いて実験を行った。また免疫形成前後の、アレルギー反応や抗原多様性の影響の違いを確認するため、2種類の週齢で実験を行った。動物の倫理的取り扱いを確保するため実験は大阪大学の施設ガイドラインに従って行った。

試薬

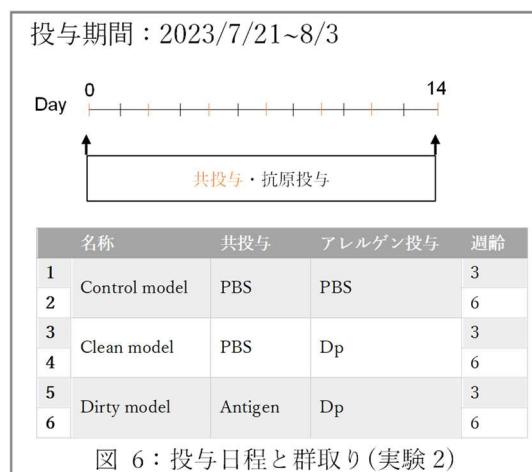
抗原試薬は、150 μl の 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ アルテルナリアおよび 1000 μl の 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ クロゴキブリを使用して調製した。さらに、ヤケヒョウヒダニ(Dp)を 0.375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に 3 週間分のアレルギー試薬を調製した。また、6 週間のアレルギー試薬には 0.625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の Dp を使用した。試薬濃度は体重の平均値に従って投与量を決定した。また試薬は関東化学株式会社から購入した。

投与

実験 1 では、抗原多様な環境で生育した後のアレルギー反応の影響を検証した(図



5)。まず首の皮下に 1ml テルモシリンジ(針 25G) を用いて、抗原試薬を投与した。その後、先行研究に従い耳の皮内にマイジェクターを用いて、Dp (アレルギー) を投与した。抗原投与による炎症と、アレルギー投与によるアレルギー反応を区別するため、抗原投与を耳ではなく首の皮下に投与した。実験 2 では、抗原多様な環境におけるアレルギー反応の影響を検証した(図 6)。投与は抗原を毎日、アレルギーを 2 日に 1 回行った。



実験 1 では、田舎から都会に移りすみ、抗原多様性を失った状況でのアレルギー反応を再現した。一方、実験 2 は、成人と赤ちゃんが田舎に住み続けている状況でのアレルギー反応を再現した。

以後、PBS のみを投与した群を control model、PBS と Dp を投与して清潔な環境を模擬した群を clean model、抗原と Dp を投与して抗原多様を模擬した群を dirty model と表す。

測定

アレルギーの重症度を確認するために、耳の厚さをノギスで測定した。ノギスで測定する際、測定位置を耳の真ん中で固定するなど、ばらつきが出ないように工夫した。ま

た、抗原多様性説の機序を解明するため、脾臓およびリンパ節における Th 細胞の割合をフローサイトメトリー法で測定した。さらに、血漿中の抗体 (IgG1、IgG2a、IgE) および耳組織中のサイトカイン (IL-4、IL-17、IFN- γ) を ELISA 法で測定した。

血液サンプル

最後の投与から 24 時間後にマウスをイソフルラン麻酔下で解剖した。心採血により血液を採取した。次いで、血液を 3000 g 4 °C で 15 分間遠心分離することによって血漿を収集した。血漿はアッセイまで 80 °C で保存した。

ELISA

血漿中の IgE 抗体は、LBIS ELISA アッセイキット (富士フイルム和光純薬株式会社)、IgG1 および IgG2a は、ELISA キット (LS Bio) を使用して測定した。耳のサイトカインを、耳を解剖はさみで細かく切り、RIPA と Halt protease の混合液と共にホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後 15 分静置し、18000 g で 30 分遠心操作を行った。さらに上清を採取し、BCA キットでタンパク質量を測定した後、ELISA キット (CUSABIO) を用いて測定した。

フローサイトメトリー

リンパ節または脾臓を摘出し、RPMI-1640, 1xMEM 非必須アミノ酸溶液, 50 μ M 2-ME, 1% Ab, 10 % 非働化 FCS を含む培地中にて保存した。解剖終了後、70 μ m セルストレーナー上で潰し、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を 4 °C 300 g で 10 分間遠心した。そして得られた細胞ペレットを NH₄Cl, KHCO₃, EDTA \cdot 2Na \cdot 2H₂O を含む ACK 3 mL で 5 分間静置した。その後、5 mL の培地を加え、4 °C 300 g で 10 min 遠心し

た。さらに、非活性化培地で再懸濁した後、細胞数を 1×10^6 cells に調製し、4 °C 300g 5 分間遠心した。そして、活性化培地 1 mL で再懸濁し、5 時間インキュベーションを行った。その後、脾臓およびリンパ節の免疫細胞を BD Pharmingen™ マウス細胞内サイトカイン染色スターターキット (BD Biosciences) で染色し、MACSQuant® X フローサイトメーター (Miltenyi Biotec) を使用して分析した。

RT-PCR

脾臓の IL-21 と Foxp3 の遺伝子量を先行研究⁵を参考に測定した。脾臓約 20~30mg に 2-ME と RL の混合液を添加し、ホモジナイザーでホモジナイズした。次に FastGene™ RNA Basic kit を用いて RNA 抽出を行った。次に Nano Drop を用いて総 RNA 量を測定した。測定結果に基づき、サンプルを 1 μ g/ μ l に調整し PCR を行った。統計処理は $\Delta\Delta$ Ct 法を用いた。

6 結果

実験 1

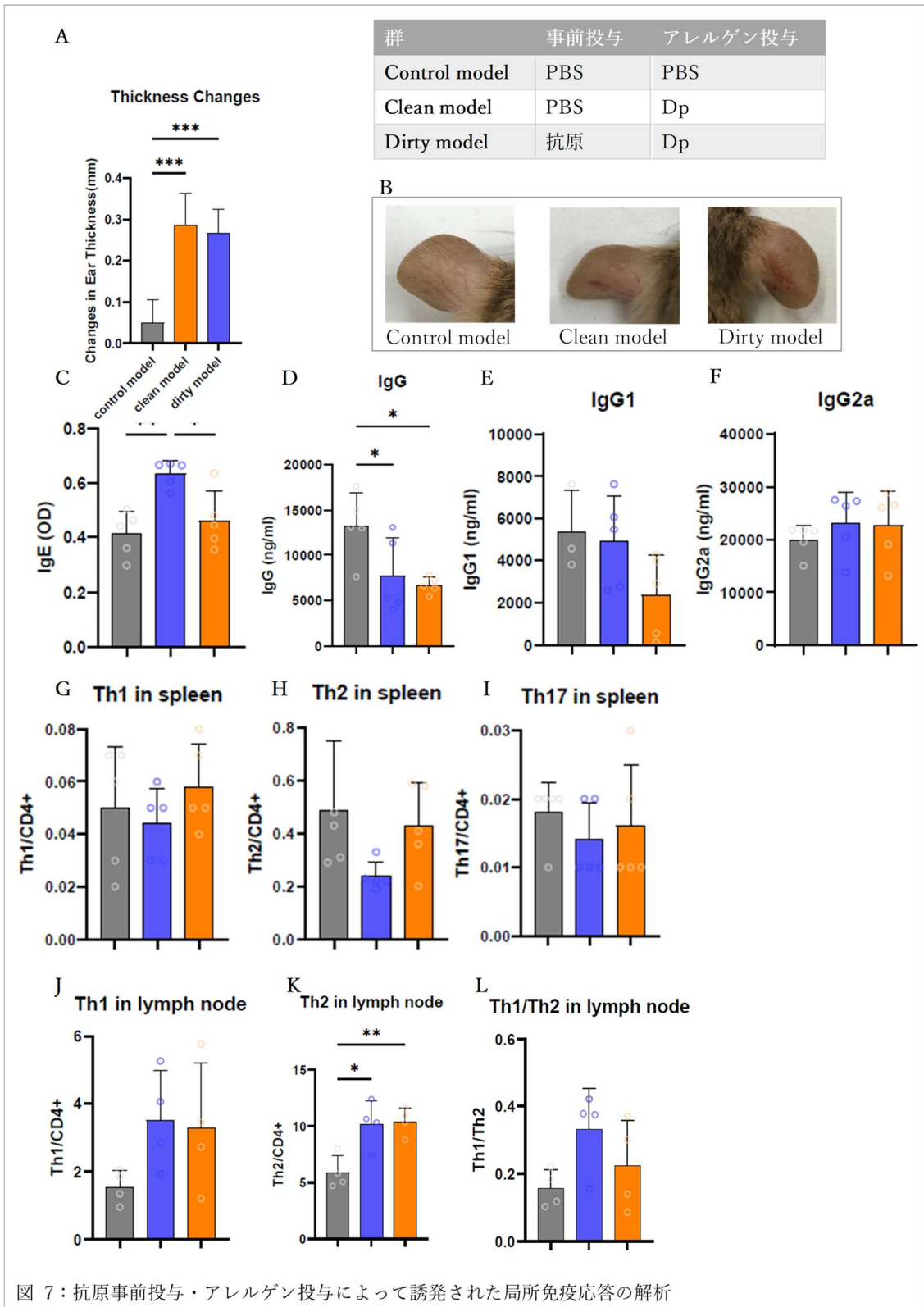
炎症の重症度を、耳の厚さ、IgE 抗体、ヘモグロビンから判断した。耳の厚さは、アレルギーを投与したすべてのマウスで増加した (図 7A)。このことから、アレルギー反応を起こすのに十分な量の Dp であったことが確認された。一方、dirty model では clean model に比べてわずかに耳の厚みが抑制されていたが、有意差は認められなかった (図 7A,B)。また IgE 抗体価は、clean model は control model よりも大幅に高かった (図 7C)。対照的に、dirty model の抗体価はアレルギーを投与していない control model とほぼ同程度にまで抑制さ

れていた。また、耳にマイジェクターで投与を行う際、**clean model** は明らかに皮膚が固く穿刺が難しかった。よって **dirty model** は、抗原事前投与により炎症が抑制された可能性が高い。なお、ヘモグロビンは過度の希釈をしたことにより閾値に達しなかったため、測定できなかった。さらに、多様性説のメカニズムを明らかにするために、IgG 抗体および Th 細胞を測定した。しかし、各群間で IgG(図 7D), IgG1(図 7E), IgG2a (図 7F) において有意差は検出されなかった。また、脾臓で測定した脾細胞中の Th1/CD4+(図 7G), Th2/CD4+(図 7H)、Th17/CD4+(図 7I) の割合にも有意差は認められなかった。リンパ節における Th1/CD4+(図 7J)および Th1/Th2(図 7K)は、アレルゲン投与によってそれぞれ増加したが、**clean model** と **dirty model** との間に差はなかった。また Th1/Th2 バランス(図 7L)はどの群間にも有意差は認められなかった。

実験 2

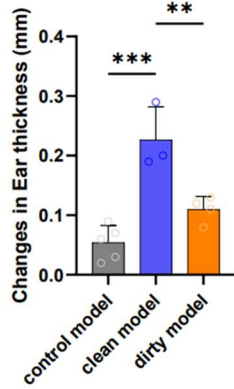
炎症の重症度を耳の厚さ、IgE 抗体から判断した。まず、耳の厚さはアレルゲンを投与すべてのマウスで増加しており、アレルゲン投与によるアレルギー反応が確認された (図 8,9A)。一方、3 週齢のマウスにおいて **dirty model** は **clean model** に比べて耳の厚さが大幅に抑制されていた (図 8A)。6 週齢のマウスにおいても、**dirty model** の耳の厚さがわずかに抑制されていた (図 9A)。よって、抗原共投与により炎症が抑制された可能性が高いと考えられる。しかし、IgE 抗体価はどちらの週齢においても **dirty model** において他の群より増加傾向にあった (図 8,9C)。これらの結果より、Th2、IgE などによって引き起こされる I 型ではなく、

マクロファージによって引き起こされる IV 型アレルギーを発症しているのではないかと考えた。さらに、IgG1 (図 8,9D) , IL-4 (図 8,9F) , Foxp3 (図 8,9I) どの群間においても有意差は認められなかった。また IL-17 (図 9G) は 6 週齢のみアレルゲン投与によって増加した一方で、IgG2a (図 8E) と IL-21 (図 8H) は 3 週齢のみ抗原投与によって増加した。



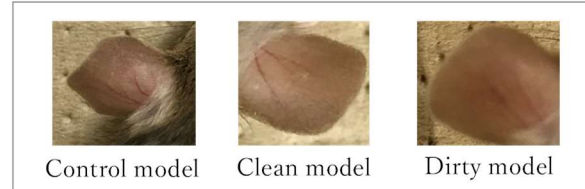
A

Thickness changes 3weeks



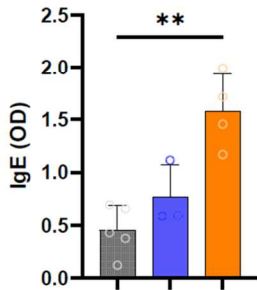
群	共投与	アレルギー投与
Control model	PBS	PBS
Clean model	PBS	Dp
Dirty model	抗原	Dp

B



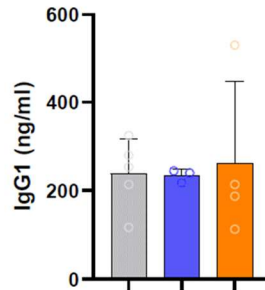
C

IgE 3weeks



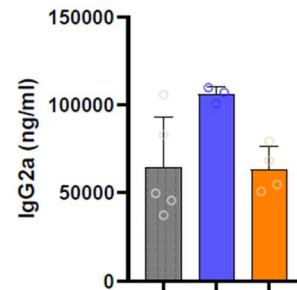
D

IgG1 3weeks



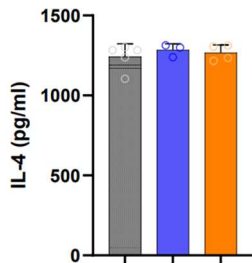
E

IgG2a 3weeks



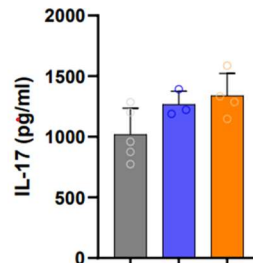
F

IL-4 3weeks



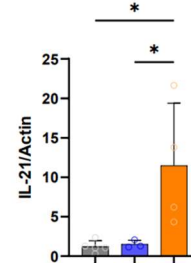
G

IL-17 3weeks



H

IL-21/Actin 3weeks



I

Foxp3/Actin 3weeks

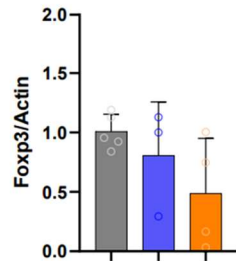
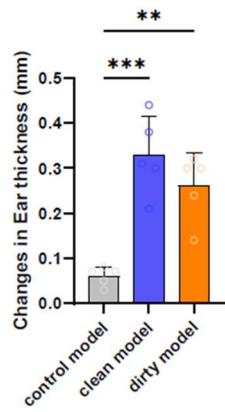


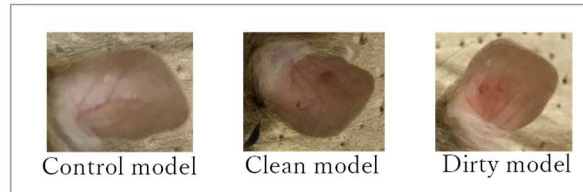
図 8：共投与・抗原投与によって誘発された局所免疫応答の解析(3 週齢)

A Thickness changes 6weeks

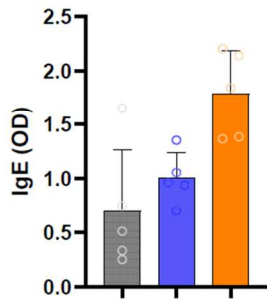


群	共投与	アレルギー投与
Control model	PBS	PBS
Clean model	PBS	Dp
Dirty model	抗原	Dp

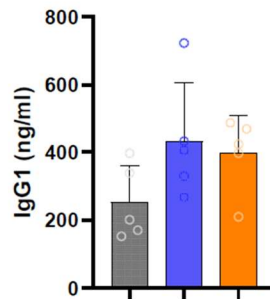
B



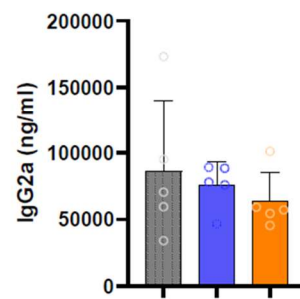
C IgE 6weeks



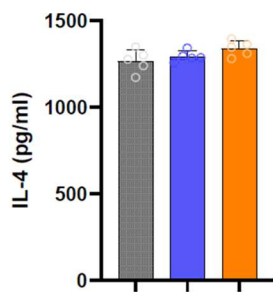
D IgG1 6weeks



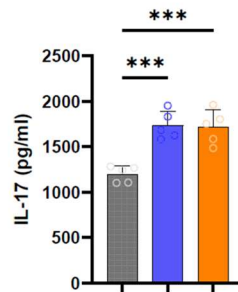
E IgG2a 6weeks



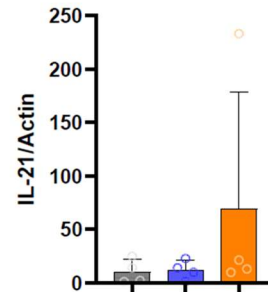
F IL-4 6weeks



G IL-17 6weeks



H IL-21/Actin 6weeks



I Foxp3/Actin 6weeks

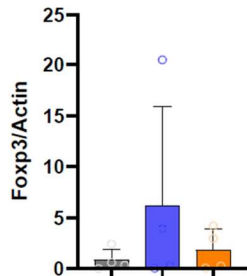


図 9 : 共投与・抗原投与によって誘発された局所免疫応答の解析(6週齢)

7 考察

抗原事前投与の実験1では、アレルギーの患部である耳の腫れについて、**dirty model**と**clean model**とで有意差は認められなかったのに対して(図7A)、抗原共投与の実験2では、特に3週齢において有意な改善が認められた(図8A)。すなわち、抗原多様な環境に置くことは耳の腫れに一定の抑制効果を与える一方、メモリー効果は期待できないことを示唆している。このことは、田舎で居住している間はアレルギーを発症しなかったが、田舎から都会に移り住んだ場合にアレルギーを発症した経験とも符合する。

また、IgE抗体価は、実験1では、**clean model**に比べて**dirty model**が低く、**control**と同程度に抑制されているのに対し(図7C)、実験2では、**dirty model**が他の群に比して有意に高い結果となった(図8,9C)。今回は試薬入手の関係上、IgE抗体の総量を計測したのみで、抗原特異的IgEの多様性について測定できなかったが、実験2では、耳の腫れが抑制されているにもかかわらずIgE抗体価が増加していることから、抗体の多様性によって例えばマスト細胞に結合した際の架橋の程度が抑制されるなど、何らかの現象が生じている可能性がある。

一方、IgG2a抗体価は、実験2の6週齢では有意差が認められなかった(図9E)が、実験2の3週齢では、**clean model**に対して**dirty model**が抑制される傾向にあった(図8E)。この結果は、抗原多様な環境下で、6週齢は耳の腫れの抑制効果について有意差までは確認できなかったのに対して、3週齢では有意差が認められた点と共通の傾向にある。

さらに、Th1,Th2細胞が、脾臓中では**control model**に対する有意差は認められなかった(図7G,H)のに対し、所属リンパ中では、**control model**に対して**clean model**と**dirty model**がいずれも有意に増加した(図7J,K)。このことは、アレルギー反応が進行している間は、Th細胞からTh1,Th2への分化が、脾臓ではなく所属リンパ中で起こるという機序を正確にトレースできている。その結果、実験1における**dirty model**は、**clean model**と比較してTh2への分化割合が増加傾向にあることから、抗原事前投与によりTh2への分化を抑制するという仮説は成立しない可能性が高まった。

以上を踏まえ、考えうる抗原多様性によるアレルギー反応の抑制効果の機序を次に考察する。

8 考えうる多様性説の機序

B細胞はどのような抗原やウイルスに対してもIgM抗体を産生する。その後、継続的にアレルゲン投与を行うことで、一般的にIgMからIgG2aへのクラススイッチが起こることが知られている。そして、IgG2aはアレルゲンに付着すると、オプソニン化によりマクロファージによる捕食を促進する作用がある。捕食を行い活性化したマクロファージはケモカインを生成し、炎症反応を起こす好酸球や好塩基球をはじめとする様々な免疫細胞を患部に呼び集める。これらの免疫応答によって、IV型アレルギー反応が引き起こされる。今回の実験では、3週齢の**dirty model**において、耳の厚さとIgG2a抗体が抑制傾向にあった。よって、抗原投与によってクラススイッチの頻

度が減少し、マクロファージの捕食活動が抑制されることで、炎症が抑制されているのではないかと考えられる（図 10）。

9 まとめ

本研究では、炎症の基準である耳の厚さが抗原事前投与ではわずかしこ抑制されなかったが、共投与を行うと大幅に抑制された。また、成人期より幼少期のマウスに抗原投与を行う方が、炎症を抑制することができることが明らかとなった。よって幼少期に抗原多様な田舎で過ごしている際はアレルギーを発症しなかった経験と一致する結果となった。

10 今後の展望

抗原多様な環境が 6 週齢より 3 週齢のマウスにおいて、炎症抑制の効果が認められ

たメカニズムについて解明する。また、耳の腫れと重症度、IgE 抗体の関係が明確ではないことが明らかにするため、病理解析や抗原特異的な IgE 抗体の測定を行う必要がある。本研究は、アレルギー体質の予防法や治療法の開発につながることを期待される。

11 謝辞

堤康央先生には有益な議論をしていただきありがとうございます。東阪和馬准教授、芳賀優弥助教、そして櫻井先生に感謝いたします。大阪大学大学院薬学研究科毒理学分野の皆様のご尽力に感謝いたします。本研究は SEEDs にご支援いただいております。

