

スギ花粉症マウスモデルの作製とその評価

内山 文昭・朱 根勝・大野 阿由美・千原 智美

中村学園大学・薬膳科学研究所・分子栄養学部門

Characterization of Cry j I-sensitized mice as a model of Japanese cedar pollenosis

Fumiaki UCHIYAMA,* Zhu Gensheng, Ohno AYUMI, Tomomi CHIHARA

*Department of Molecular Biosciences, Institute of Preventive and Medicinal Dietetics,
Nakamura-Gakuen University, 5-7-1 Befu, Jounan-Ku, Fukuoka, 814-0198, Japan*

*Corresponding author. E-mail: uchiya-f@nakamura-u.ac.jp

Phone: +81-(0)92-851-2598 fax: +81-(0)92-841-7762

[Key words: pollenosis; murine model; Cry j I; Astragali Radix; immunoglobulin E]

Abstract

Japanese cedar pollenosis is a type I allergic disease mediated by immunoglobulin E (IgE) antibodies. Here, we describe that a murine model of Japanese cedar pollenosis displays Th2 dominance in the pattern of immunoglobulin class. Intraperitoneal immunization of BALB/c mice with alum adjuvant Cry j I induced variable levels of Cry j I-specific IgE antibodies as well as increased total IgE antibodies. The production of Cry j I-specific IgE antibodies was increasing with repeat immunization. The balance of Th1/Th2 responses is investigated in Cry j I-sensitized mice. The production of Cry j I-specific IgE antibodies did not synchronized to produce IgG2a antibodies but IgG1 antibodies against Cry j I. These results show that Cry j I-sensitized BALB/c mice may be promoted to a shift in the Th1/Th2 balance toward Th2 dominance similar to human pollenosis. Gender influence on specific IgE levels is tested in the murine model. Serum total IgE levels before immunization were higher in female (24.0 ng/ml) than in male (12.6 ng/ml) of BALB/c mice at the age of 8 weeks ($p < 0.0005$). Serum total IgE levels in male (60.4 ng/ml) and female (76.4 ng/ml) Cry j I-immunized mice increased with direct proportion to the basal IgE levels with gender difference ($p < 0.05$). Cry j I-specific IgE levels in serum were higher in female than in male ($p < 0.05$). There is no significant difference in serum IgG1 levels between male and female mice with or without immunization. These results show that female BALB/c mice may be more sensitive to induce IgE antibodies than male. Oral intake of water soluble fraction of Astragali Radix at dose of 170 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ was tend to attenuate the production of Cry j I-specific IgE antibodies in the murine model although not decreased the production of both total IgE and IgG antibodies. The present study indicates that Cry j I-sensitized BALB/c mice may be useful for analysis of Japanese cedar pollenosis in characteristics such as production of specific IgE antibodies and TH2 dominance.

緒 論

国内のスギ花粉症は2001年に実施した1万人を対象とした疫学調査では、日本人の15%から20%がスギ花粉症に罹患している^{1, 2}。スギ花粉蛋白質の主成分はCry j Iであり、スギ花粉の主要抗原として単離され³、その

cDNAのクローニングにより構造が明らかにされた⁴。その後、スギ花粉の抗原Cry j IIが同定されており⁵、スギ花粉症患者はこれらの抗原に対する特異的IgE抗体を保有していた^{6, 7}。ヒト花粉症は、鼻腔内からの花粉抗原の侵入により抗原特異的なIgE抗体が産生され、鼻粘膜内への好酸球浸潤を誘導している。花粉症のマウスモデルは1996年にSWR/Jマウスでブタクサ花粉の局

所感作でマウス血清中の特異的 IgE 抗体を検出しているが⁸、マウスのスギ花粉症モデルに関しては、スギ花粉を鼻腔内投与することにより感作を成立させている報告はなく、最近、全身感作でのマウスモデルが報告されている⁹。これらマウス花粉症モデルでの評価方法は全 IgE 測定や好酸球の浸潤に関わる測定が主であり、抗原特異的な IgE 産生は報告されていない。このことは花粉症のアレルギー反応における抗原提示細胞 (APC) から T 細胞, B 細胞の活性化における抗原蛋白質の解析や特異的な IgE 産生阻害の評価への対応が不十分であると考えられる。本研究では、マウスでのスギ花粉蛋白質 Cry j I の感作による特異的 IgE 産生とマウス性差, 全 IgE 産生, IgG 産生との相関を検討した。さらに生葉の黄著投与時の Cry j I で感作での免疫グロブリンの変動について検討した。

実験方法

マウス感作と血清採取

実験動物は 8 週齢・メスの BALB/c 系統のマウスを、日本 SLC 社 (静岡) から購入した。スギ花粉は大分県林業試験場の試験用植林のスギ枝を 2005 年 3 月 8 日に採取し、その後スギ枝を水栽培し、自然落下した花粉粒子を交配袋で集め、使用まで -80 度で保存した。スギ花粉粒子での BALB/c マウスの感作はマウス鼻腔内に、1 回 800 μ g のスギ花粉を投与し、合計 5 回を 5 日間連続して投与した。アラム・アジュバントは Imject Alum (PIERCE 社) を用いて抗原蛋白質とよく混合し 30 分以上経過した後、マウスに投与した。スギ花粉総蛋白質は Cedar Pollen Extract (コスモ・バイオ社) を用いた。鼻腔内感作は、スギ花粉総蛋白質を PBS に溶かし (30 μ g/20 μ l) 投与した。腹腔内感作は、スギ花粉総蛋白質 100 μ g をアラム・アジュバント 50 μ g で免疫した。足蹠には、スギ花粉総蛋白質 50 μ g をアラム・アジュバント 2 mg で免疫した。精製スギ花粉抗原 Cry j I の腹腔内感作は精製スギ花粉抗原 Cry j I (生化学工業) 5 μ g をアラム・アジュバント 2 mg で初回免疫し、その 3 週間後と 5 週間後に Cry j I 1 μ g をアラム・アジュバント 2 mg で追加免疫した。コントロール群にはアラム・アジュバントのみを投与した。全採血は、ジエチルエーテルで吸入麻酔させた後、後大静脈採血法で行った。眼窩採血は、ジエチルエーテルで軽く吸入麻酔させた後、常法に従って行った。得られた血液は、4 $^{\circ}$ C, 700g で 15 分間遠心分離して血清を回収し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

IgE-capture ELISA による特異的 IgE 抗体の検出

マウス血清中の Cry j I 特異的 IgE 抗体の測定は坂口

らが開発した IgE-capture ELISA 方法を用いた^{10, 11, 12-15}。96-well IMMUNO PLATE (高結合能タイプ; Nunc 社) に、0.05M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) で希釈した抗マウス IgE (LO-ME-3; 5 μ g/ml, 生化学工業) を 100 μ l 加え、室温で 1 時間反応させた。その後、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBST) で洗浄し、5% BSA を含む PBS を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、1% BSA と 0.01% Tween-20 を含む PBS (BSA-PBST) で 20 倍希釈したマウス血清を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。PBST で洗浄後、1% BSA を含む PBS (BSA-PBS) で 40 倍希釈したビオチン標識 Cry j I (生化学工業) を室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、BSA-PBS で希釈した Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated (0.1 μ g/ml, Pierce 社) を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。PBST による洗浄後に PBS で再度洗浄し、Peroxidase Substrate Kit (Bio-Rad 社) を 150 μ l 添加し発色させ、405nm で吸光度を測定した。

Indirect ELISA によるスギ花粉総蛋白質に対する特異的 IgG 抗体の検出

96-well IMMUNO PLATE (高結合能タイプ; Nunc 社) に、0.1% Na₂S₂O₃ を含む PBS で希釈した Cedar Pollen Extract を 100 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後、PBST で洗浄し、5% BSA を含む PBS を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、1% BSA と 0.01% Tween-20 を含む PBS (BSA-PBST) で 1500 倍希釈したマウス血清を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、BSA-PBS で HRP-Goat Anti-Mouse IgG (Southern Biotech 社) を 1000 倍希釈し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。PBST による洗浄後に PBS で再度洗浄し、Peroxidase Substrate Kit (Bio-Rad 社) を 150 μ l 添加し発色させ、2% シュウ酸 100 μ l で反応を停止し 405nm で吸光度を測定した。

EIA Sandwich 法による総 IgE 抗体量の測定

マウス IgE 測定キット (森永生科学研究所) を用い、キットに添付されている測定方法に従った。

Indirect ELISA による特異的 IgG, IgG1, IgG2a 抗体の検出

96-well IMMUNO PLATE (高結合能タイプ; Nunc 社) に、0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) で希釈した Cry j I (3 μ g/ml, 生化学工業) を 100 μ l 加え、室温で 1 時間反応させた。その後、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBST) で洗浄し、5% BSA を含む PBS を 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキングした。PBST で

洗浄後、1% BSAと0.01% Tween-20を含むPBS (BSA-PBST) で1000倍希釈したマウス血清を100 μ l 加え、37°Cで1時間反応させた。PBSTで洗浄後、BSA-PBSでHRP-Goat Anti-Mouse IgG (Southern Biotech社) を1000倍希釈し、あるいは、HRP-Rat Anti-Mouse IgG1, IgG2a (Zymed Laboratories) を500倍希釈し、37°Cで2時間反応させた。PBSTによる洗浄後にPBSで再度洗浄し、Peroxidase Substrate Kit (Bio-Rad社) を150 μ l 添加し発色させ、405nmで吸光度を測定した。

黄耆の投与

初回免疫直後から投与を開始した。黄耆 (Astragali Radix) 200g を水で1~2回洗い、適量の精製水で約30分間浸水した。その後強火にかけ、沸騰後は弱火で約30分間煎じた。得られた抽出液の濃度を算出し (120mg/ml)、抽出液をマウス飲用水に溶かし1.56mg/ml濃度とした。マウスの水摂取量を数日間に渡って測定し平均した結果3.6ml/匹/日であったことから、最終的な黄耆摂取量は約5.6mg/匹/日 (170 μ g/kg/日) と算出した。

実験結果

Cry j I 感作マウスでの抗体産生

マウスへのスギ花粉、スギ花粉総蛋白質、Cry j I を用いて種々の経路で感作方法を検討した。ヒトに最も近い感作方法としてマウス鼻腔内にスギ花粉、スギ花粉総蛋白質で免疫したが、Cry j I 特異的 IgE 抗体は検出さ

れなかった。しかし、スギ花粉総蛋白質の鼻腔内投与で、血中のスギ花粉総蛋白質特異的 IgG 抗体の産生では図1に示すように抗スギ花粉総蛋白質 IgG の抗体産生は有意に上昇していた。マウスの通常の免疫方法である腹腔内¹⁶ や足蹠¹⁷ に投与する方法ではスギ花粉総蛋白質を抗原として免疫したが、Cry j I に対する特異的 IgE 抗体は検出されなかった。これらの結果はスギ花粉総蛋白質で感作した場合、Cry j I に対する特異的 IgE 抗体を検出することは難しいことを示している。次にCry j I を抗原として感作実験を検討した。8週齢マウスの腹腔内にCry j I で初回免疫した後、その3週間後と5週間後にCry j I で追加免疫した。その結果、図2のようにCry j I 特異的 IgE 抗体産生が認められた。追加免疫に関しては、1回の追加免疫でもCry j I 特異的 IgE 抗体を検出でき、2回の追加免疫ですべてのマウスがCry j I 特異的 IgE 抗体を産生した。

BALB/c の8週齢マウスは免疫前の総 IgE 抗体量で明らかな個体差が見られた [図3 (d)]。ヒトでのスギ花粉症の発症率は年齢、性別により異なり¹、IgE 抗体量の個体差が大きい。そこでマウスでのCry j I 感作におけるCry j I 特異的 IgE 抗体産生量とマウスの性差および個体差を検討した。BALB/c マウスの雄と雌に、8週齢マウスにCry j I で初回免疫をし、その後の3, 5, 7週目に追加免疫をした。初回免疫前と追加免疫の1週間後の血清から、抗体産生量を測定した結果、Cry j I 特異的 IgG1 抗体産生量は、マウスの雄雌間で有意差は認められなかったが [図3 (c)], 図3に示すようにCry j I

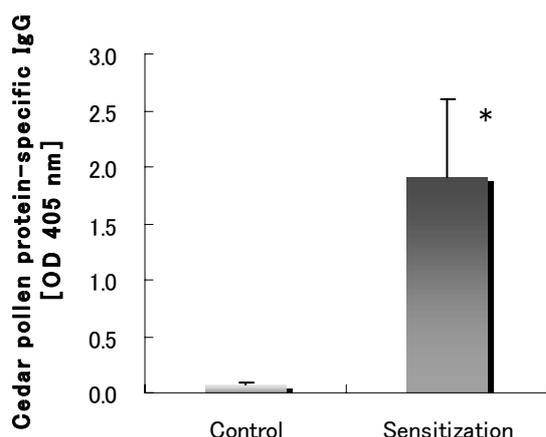


図1. スギ花粉総蛋白質感作による特異的 IgG 抗体レベルの上昇。特異的 IgG 抗体レベルは、スギ花粉総蛋白質30 μ g を3日間鼻腔内に投与した翌日に採取した血清で測定した。OD値は、コントロール群と感作群で各々平均値 \pm SDで示している。特異的 IgG 抗体値の測定は、Indirect ELISA法を用いた。2群の平均の差は、Student's t-testにより検定した。* $p < 0.05$ 。

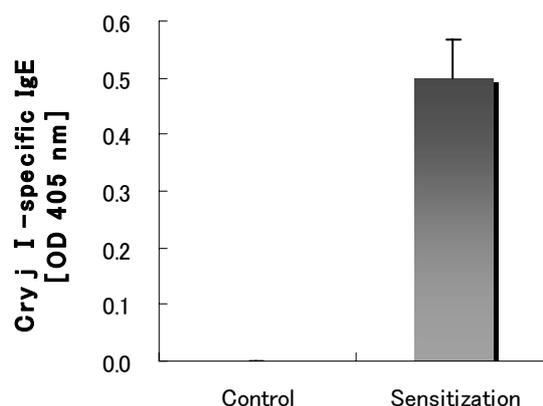


図2. Cry j I 感作による特異的 IgE 抗体レベルの上昇。Cry j I 特異的 IgE 抗体レベルは、2回目追加免疫の一週間後に採取した血清で測定した。OD値は、コントロール群と感作群の各々で平均値 \pm SDで示している。特異的 IgE 抗体レベルは、IgE-capture ELISAで測定し、OD値をy軸とした。2群の平均の差は、Student's t-testにより検定した。 $p < 0.0005$ 。

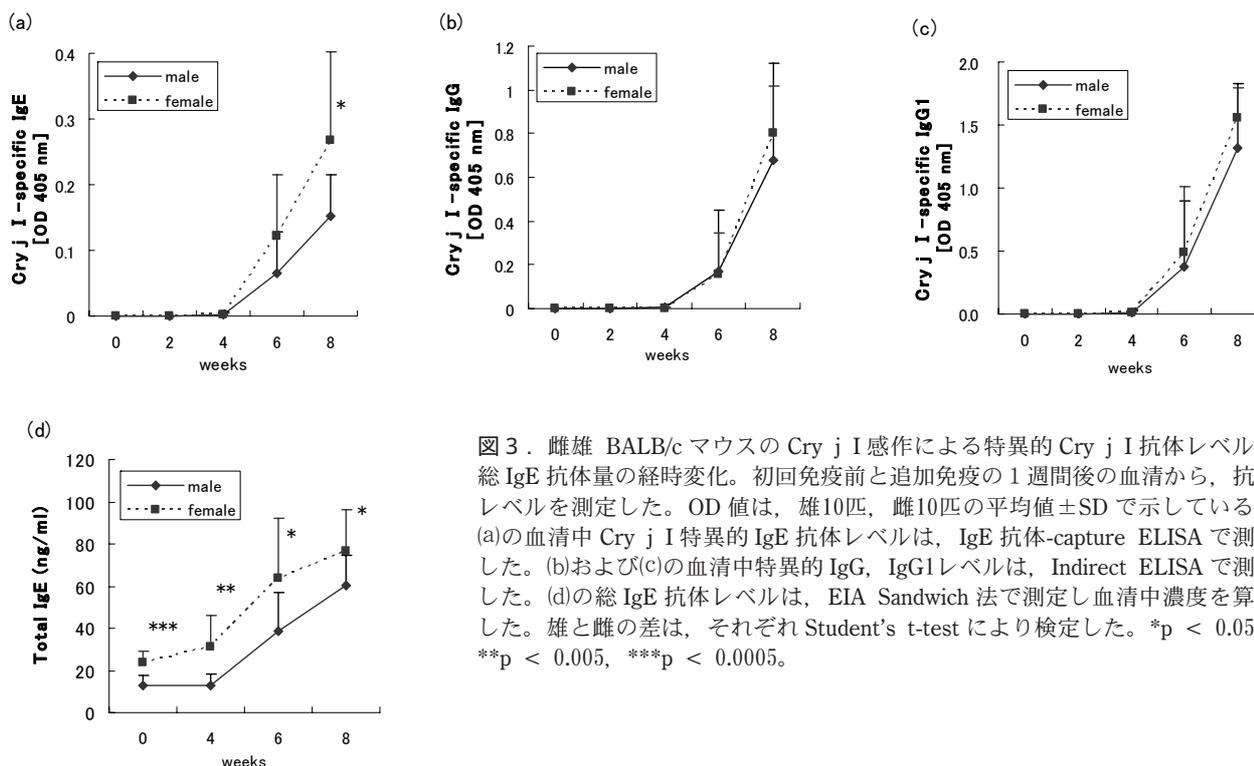


図3. 雌雄 BALB/c マウスの Cry j I 感作による特異的 Cry j I 抗体レベル, 総 IgE 抗体量の経時変化。初回免疫前と追加免疫の1週間後の血清から, 抗体レベルを測定した。OD 値は, 雄10匹, 雌10匹の平均値±SD で示している。(a)の血清中 Cry j I 特異的 IgE 抗体レベルは, IgE 抗体-capture ELISA で測定した。(b)および(c)の血清中特異的 IgG, IgG1レベルは, Indirect ELISA で測定した。(d)の総 IgE 抗体レベルは, EIA Sandwich 法で測定し血清中濃度を算出した。雄と雌の差は, それぞれ Student's t-test により検定した。*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005。

特異的 IgE 抗体産生量および総 IgE 抗体産生量は雌の方が有意に増加していた。また, Cry j I 特異的 IgE 抗体産生量においては雌雄にかかわらず比較的大きな個体差が現われた。

Cry j I 感作マウスでの Th2 応答

ヒト花粉症は I 型アレルギーに分類され, その病態成立には抗原特異的 IgE 抗体産生のため免疫グロブリンのクラススイッチが必要である。そのクラススイッチには, 抗原特異的 Th2 細胞の出現と IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカイン産生が必須と考えられている。それ故, アレルギー反応は Th2 応答に傾くことが原因と考えられている。Th2 細胞は, マウスの場合 IgM から IgG1 と IgE へのクラススイッチを誘導する¹⁸。このことから, IgG1 抗体価と IgE 抗体価の上昇が Th2 応答に傾いていることを意味し, Cry j I 特異的 IgE 抗体, 総 IgE 抗体, Cry j I 特異的 IgG サブクラスの抗体の産生量を測定することは, モデルマウスのアレルギー反応を評価する上で重要である。スギ花粉抗原 Cry j I による感作で特異的 IgE 抗体が産生されているときの総 IgE 抗体と Cry j I 特異的 IgG サブクラスの抗体産生について検討した。実験項に示すスギ花粉抗原 Cry j I による感作から37週齢目に4回目の追加免疫を行い, その1週間後に

採血した。得られた血清サンプルで, 総 IgE 抗体及び特異的 IgG, IgG1, IgG2a 抗体の産生量を測定した。その結果を図4に示す。図4 (a)に示すように, 総 IgE 抗体はコントロール群よりも有意に高い産生を示すことから, この有意差はスギ花粉抗原 Cry j I 投与による上昇であるが, Cry j I 特異的 IgE 抗体産生の寄与率は不明である。また, 特異的 IgG 抗体産生〔図4 (b)〕及び IgG1 抗体産生〔図4 (c)〕においても著しい上昇が見られた。これらの結果より Cry j I 感作により IgE 抗体, IgG1 抗体へのクラススイッチが促進されていることが明らかになり, Cry j I 感作マウスは免疫学的に Th2 応答に傾いていることを意味している。一方, 特異的 IgG2a 抗体に関してはほとんど検出されなかった。IgG2a 抗体へのクラススイッチは Th1 応答に傾いた場合に促進されることから¹⁹, スギ花粉抗原 Cry j I による感作では Th2 優位により Th1 応答のクラススイッチが抑制されたと考えられる。さらに Th2 優位の状態での雄マウスでの Cry j I 特異的 IgE 抗体量と Cry j I 特異的 IgG1 抗体量の相関を検討した。その結果, 雄マウスでの Cry j I 特異的 IgE 抗体量と Cry j I 特異的 IgG1 抗体量の相関係数は $r_s=0.672$ (Spearman's correlation coefficient by rank test), 雌マウスの相関係数は $r=0.615$ (Pearson's correlation coefficient test) であり, いずれも正の相関性が

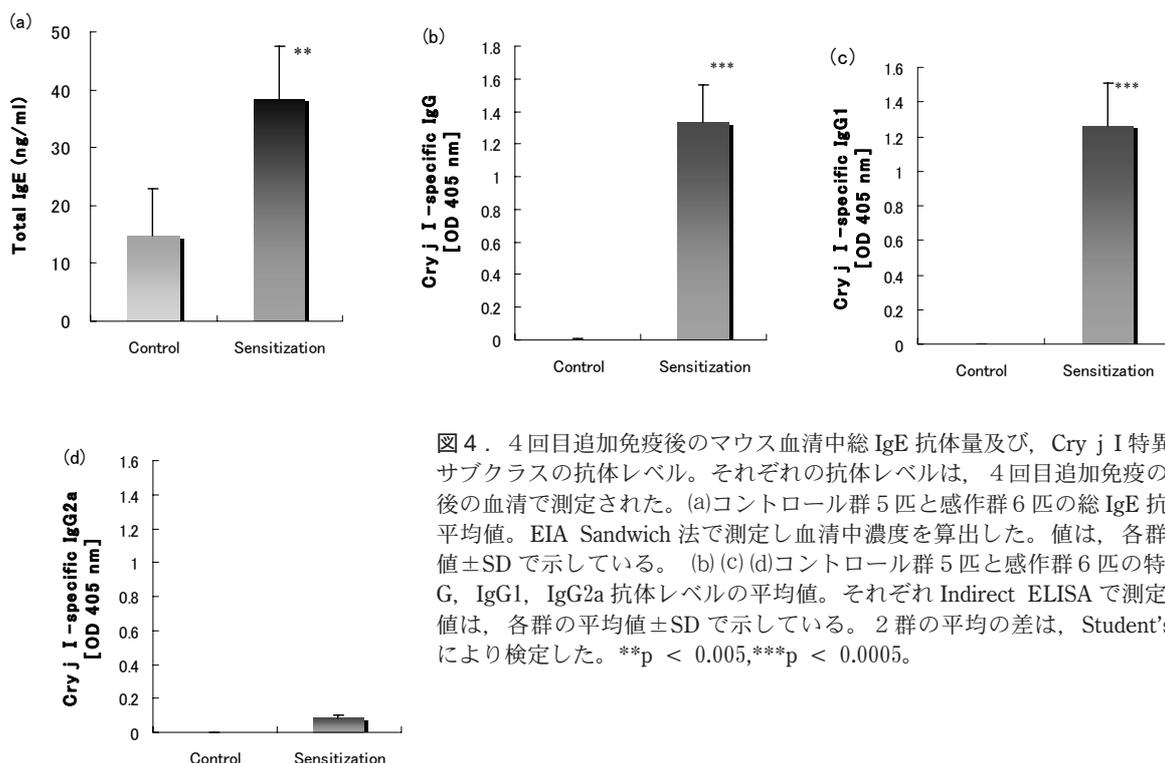


図4. 4回目追加免疫後のマウス血清中総IgE抗体量及び、Cry j I特異的IgGサブクラスの抗体レベル。それぞれの抗体レベルは、4回目追加免疫の1週間後の血清で測定された。(a)コントロール群5匹と感作群6匹の総IgE抗体量の平均値。EIA Sandwich法で測定し血清中濃度を算出した。値は、各群の平均値±SDで示している。(b)(c)(d)コントロール群5匹と感作群6匹の特異的IgG, IgG1, IgG2a抗体レベルの平均値。それぞれIndirect ELISAで測定した。値は、各群の平均値±SDで示している。2群の平均の差は、Student's t-testにより検定した。** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ 。

あった。以上の結果、本マウス花粉症モデルではTh2応答のクラススイッチがすべてのマウスで促進されており、ヒトのスギ花粉症と同様にTh2優位なアレルギー反応を惹起していた。

花粉症のアレルギーモデルでは特異的IgE抗体産生量の代わりに総IgE抗体量でアレルギー反応の強度を測定することがある。そこで本実験モデルで特異的IgE抗体産生量と総IgE抗体量との相関を検討した。その結果、図5に示すように雄マウスでの相関係数は $r = 0.850$ (Pearson's correlation coefficient test), 雌マウスでの相関係数は $r_s = 0.835$ (Spearman's correlation coefficient by rank test)であった。雄・雌共に、特異的IgE抗体と総IgE抗体間で強い正の相関が見られた。また、感作回数に従って総IgE抗体量は上昇した〔図3(d)〕。これらの結果はスギ花粉抗原Cry j Iによる感作に関する限り、特異的IgE抗体産生量の代わりに総IgE抗体量で感作の強度を測定することができることを示している。

Cry j I 感作マウスでのCry j I 特異的IgE抗体産生の経時変化

適切な免疫方法や免疫回数、抗体産生の測定時期は、実験に用いる抗原によって大きく異なっている。DNP-KLH (Dinitrophenol-Hemocyanin Conjugate, Keyhole Limpet) のハプテンでマウスを免疫した場合、1回の免疫で特異的IgE抗体価は上昇し、約1ヶ月は抗体価が維持されていた²⁰。卵白アルブミン(OVA)感作による喘息マウスモデルの場合、数回腹腔内に免疫した後、数日連続してエアロゾル化したOVAを吸入チャレンジしている²¹⁻²³。しかし、スギ花粉症動物モデルでの免疫スケジュール²⁴⁻²⁶にコンセンサスがなく、スギ花粉抗原で免疫した場合のCry j I特異的IgE抗体価の経時変化は報告されてない。そこで、Cry j I感作による特異的IgE抗体産生量の経時変化を検討した。Cry j Iを抗原として免疫マウスの特異的IgE抗体量の経時変化を検討した結果を図6に示す。初回免疫(8週齢)のみでは特異的IgE抗体量は上昇せず、その後の3, 5週目に追加免疫し、追加免疫1週間後(初回免疫から4, 6週目)で各々特異的IgE抗体量の上昇が見られた。血清採取の適切な時期を得る目的で、5週目の追加免疫後、その10週間後に再度追加免疫を行い、その1時間後と1週間後の血清からCry j I特異的IgE抗体量を測定した。その

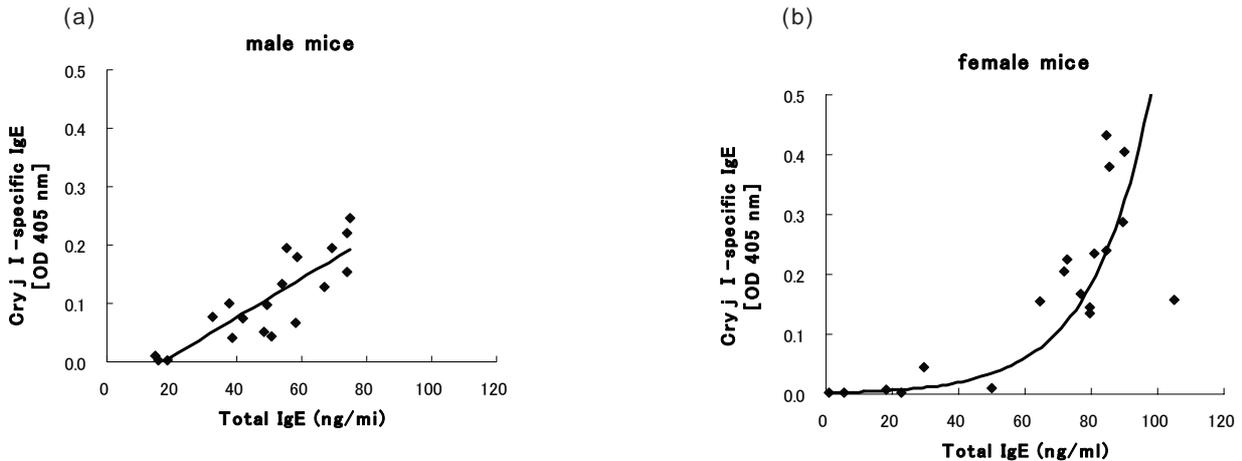


図5. 2・3回目の追加免疫後のマウス血清中特異的IgE抗体価と総IgE抗体価の相関。X軸を総IgE抗体量, y軸を特異的IgE抗体レベルとし、特異的IgE抗体レベルのOD値とTotal IgE抗体の濃度 (ng/ml) をプロットした。直線は近似直線を示している。(a)は雄のデータであり、その相関係数は $r=0.850$ (Pearson's correlation coefficient test) であった。(b)は雌のデータであり、その相関係数は $r_s=0.835$ (Spearman's correlation coefficient by rank test) であった。

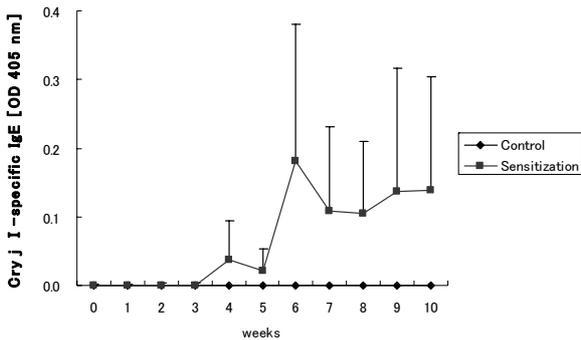


図6. 免疫後のマウス血清中Cry j I特異的IgE抗体レベルの時間変化。BALB/cマウスに、0週目にCry j Iで初回免疫をし3週目・5週目に追加免疫をした。10週目まで毎週採血し、血清中の特異的IgE抗体レベルをIgE-capture ELISAで測定した。値はコントロール群5匹、感作群8匹のそれぞれの平均値 \pm SDで示している。

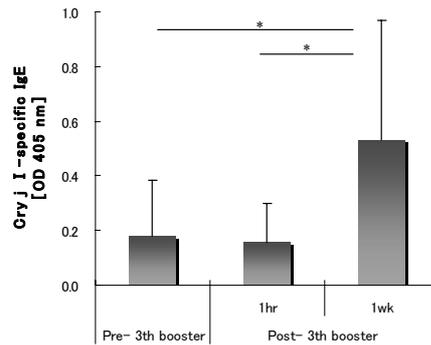


図7. Cry j I感作の1時間後と1週間後の、マウス血清中特異的IgE抗体価。図5の免疫スケジュールの続きとして、15週目に3回目の追加免疫を行った。その1時間後と1週間後に採血し特異的IgE抗体レベルをIgE-capture ELISAで測定した。3回目の追加免疫前のデータは10週目のものである。値は、感作群8匹の平均値 \pm SDで示している。平均の差は、Student's t-testにより検定した。 $*p < 0.05$ 。

結果を図7に示す。追加免疫1時間後ではCry j I特異的IgE抗体産生は上昇せず、1週間後でCry j I特異的IgE抗体産生は有意に促進されていた。この結果は、ヒトのI型(即時型)アレルギー反応のスクラッチテストの場合、抗原接触後15~20分後に紅斑などの症状が現れることと大きく異なっていた。また、卵白アルブミン(OVA)でBALB/cマウスを免疫したOVAを吸入チャレンジした1時間後と24時間後のマウス血中総IgE抗体量を測定した結果、1時間後の方が有意に高い喘息モデ

ル²⁷と異なっていた。これらの結果は、免疫の間隔に関わらず免疫回数を重ねるごとに特異的IgE抗体量は上昇するが、特異的IgE抗体量の時間経過はモデル動物で異なることを示している。本マウス花粉症モデルでは追加免疫後、1週間後の採血でCry j I特異的IgE抗体産生の促進を測定することができた。

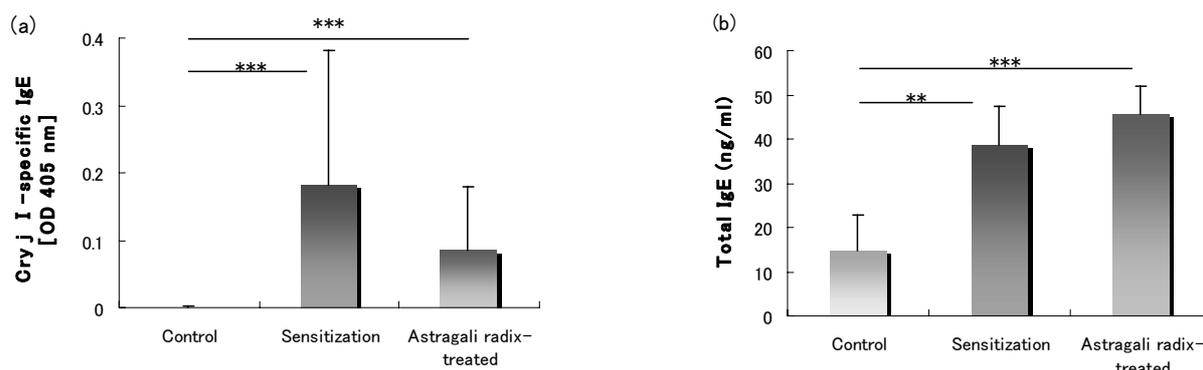


図8. 黄耆摂取によるCry j I感作マウスの特異的IgE抗体と総IgE抗体産生量への影響。(a) 2回目追加免疫の1週間後の血清で測定された。値は、コントロール群5匹、感作群8匹、黄耆投与群7匹のそれぞれの平均値±SDで示している。特異的IgE抗体価は、IgE-capture ELISAで測定した。(b) 4回目追加免疫の1週間後の血清で測定された。値は、コントロール群5匹、感作群6匹、黄耆投与群7匹のそれぞれの平均値±SDで示している。総IgE抗体量はEIA Sandwich法で測定し、血清中濃度を算出した。コントロール群との平均の差は、Student's t-testにより検定した。 $**p < 0.005$, $***p < 0.0005$ 。

スギ花粉症マウスモデルでの黄耆によるCry j I特異的IgE抗体産生の影響

補中益気湯はマウスの喘息モデル²⁸やアトピー性皮膚炎モデル²⁹、およびヒトのアトピー性皮膚炎患者³⁰において特異的IgE抗体を抑制している。補中益気湯は、黄耆 (4.0g)、人參 (4.0g)、ビャクジュツの根 (4.0g)、当歸 (3.0g)、棗 (2.0g)、陳皮 (2.0g)、柴胡 (2.0g)、甘草 (1.5g)、ショウマ (1.0g)、生姜 (0.5g) の計10種類の薬用植物で構成されている。補中益気湯の成分ある黄耆は花粉症の症状を緩和する生薬として、中国では臨床に用いられている。そこで、スギ花粉抗原感作マウスで薬物作用によるCry j I特異的IgE抗体産生の影響を検討する目的でCry j I感作マウスに黄耆を投与し、Cry j I特異的IgE抗体産生量を測定した。黄耆の投与はCry j I初回免疫直後から開始し、薬物非摂取感作(コントロール)群と比較した。黄耆投与群はコントロール群に比べて有意差が認められるレベルではないが、黄耆投与群では特異的IgE抗体産生が抑制される傾向を示した〔図8(a)〕。興味あることに、黄耆投与群での総IgE抗体量〔図8(b)〕およびCry j I特異的IgG1(図9)はコントロール群と比べて変化していなかった。

考 察

本研究ではスギ花粉症の発症メカニズムの解明および花粉症の症状を緩和する食物のスクリーニング系構築を目的として、BALB/cマウスを用いてスギ花粉の主要抗原Cry j I蛋白質をアラム・アジュバンドで感作して

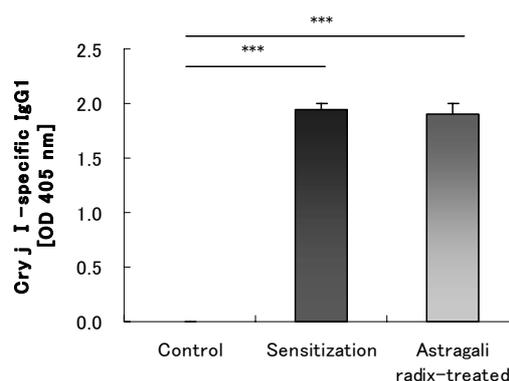


図9. 黄耆摂取によるCry j I感作マウスのCry j I特異的IgG1抗体産生への影響。2回目追加免疫の1週間後の血清で測定された。値は、コントロール群5匹、感作群8匹、黄耆投与群7匹のそれぞれの平均値±SDで示している。Cry j I特異的IgG1抗体価は、Indirect ELISAで測定した。コントロール群との平均の差は、Student's t-testにより検定した。 $p < 0.005$, $***p < 0.0005$ 。

Cry j I特異的IgE産生を測定できるスギ花粉症マウスモデルを作製し、そのマウスの免疫学的性状を検討した。本マウスモデルではCry j Iの感作によりCry j I特異的IgE抗体産生のみならず総IgE抗体量の上昇、およびCry j I特異的IgG1抗体産生が促進していた。また、本マウスモデルではCry j I特異的IgG2a抗体がほとんど検出されなかったことから、本スギ花粉症マウスモデルではTh2応答に傾いていると考えられる。Th2優位な応答において本スギ花粉症マウスモデルはヒト花粉症

と酷似している。

スギ花粉症の発症において、スギ花粉蛋白質にアレルギーを惹起する特異的な性質の有無は興味ある課題である。本研究で BALB/c マウスに種々の感作方法を実施したところスギ花粉総蛋白質の鼻腔内投与でスギ花粉総蛋白質および Cry j I 蛋白質に対する特異的な IgE 抗体は産生されず、また Cry j I 蛋白質に対する特異的な IgG 抗体も産生されず、スギ花粉総蛋白質に対する特異的な IgG 抗体が産生された。IgG 抗体が産生されたことは、少なくとも鼻腔内投与されたスギ花粉総蛋白質が樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞 (APC) に貪食され、APC 内で抗原はプロセッシングを受けて抗原ペプチド (T 細胞エピトープ) となり、MHC クラス II 分子と結合し、APC 表面に抗原提示されていることになる。このとき、Cry j I 蛋白質ではなくスギ花粉総蛋白質の特異的な IgG 抗体が産生されるので少なくとも Cry j I 蛋白質自身が特に抗原性が高いためにスギ花粉症の抗原蛋白質になっていると考えにくい。この点においては、ハウスダストのダニの Der p1 抗原が Der p1 のプロテアーゼ活性による Th2 優位^{31, 32}のバランスになるアレルギー発症仮説とは異なっていると考えられる。

IgE 産生における個体差はヒト^{33, 34}で観察され、本スギ花粉症マウスモデルでも大きく現われた。本研究では感作を重ねるごとに Cry j I 特異的 IgE 抗体レベルの個体差が大きくなる傾向が見られた。この個体差の影響を性差で検討すると性差では明らかに雌での Cry j I 特異的 IgE 抗体産生が亢進していた。この結果は喘息モデルで抗原として用いられる卵白アルブミン (OVA) で BALB/c マウスを免疫する場合は、OVA 特異的 IgE 抗体・IgG1 抗体、総 IgE 抗体の抗体量は BALB/c マウスの雄に比べて雌の方が有意に高い³⁵ことと一致している。Cry j I 特異的 IgE 抗体量は個体差が大きいという問題点は、雄雌どちらでも同様に現われ、この点に関してはスクリーニング系としては大きな問題であるが、ヒトにおける花粉抗原蛋白質に対する IgE 抗体価³³と同様に個体差が現われる点では類似している。

黄耆のアレルギーに関する報告は少ない。正常マウスにおける黄耆の作用を黄耆 1.25 g/kg/日投与後の脾臓由来の細胞培養では 15% 程度の IL-4 の上昇が見られている³⁶。この結果は、本スギ花粉症マウスモデルでの総 IgE 抗体産生が少し促進することと一致している。黄耆を主成分とする補中益気湯を卵白アルブミンで免疫した BALB/c マウスに投与すると、OVA による感作期間中の経口投与では血清中の OVA 特異的 IgE 抗体と OVA 特異的 IgG1 抗体が有意に抑制され、OVA 特異的 IgG2a 抗体が上昇しており、感作成立後の投与では、OVA 特異的 IgE・IgG1 抗体が有意に上昇し、OVA 特異的 IgG2a

が抑制されるという全く逆の結果が得られている²³。この報告から、生薬投与のタイミングによって効果が変わってくる事が考えられる。OVA による感作中の補中益気湯の投与では OVA 特異的 IgE 抗体産生は抑制された²⁸。これらの事実は、本スギ花粉症マウスモデルを用いて黄耆を投与したとき、Cry j I 特異的 IgE 抗体産生を抑制傾向にあることとよく一致している。また、黄耆は薬物投与によるインターフェロンの抑制を阻害し、Th2 バランスの維持に働いている³⁷。このように in vivo において生薬を作用した場合、特異的 IgE 抗体と総 IgE 抗体の産生の違い、あるいは感作後薬物投与した細胞レベルと個体レベルでの反応性の違いが見られている。このことは食物や薬物の抗アレルギー活性を指標とするスクリーニングにおいて総 IgE 抗体産生あるいは細胞レベルのサイトカイン産生だけで検体を評価することは不十分であると共に、スギ花粉症の発症メカニズムにおいて特異的 IgE 抗体産生と IgE 抗体の総量を制御する機構は独立して働いている可能性が示唆される。今回の研究では黄耆の投与量は 170 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であり、ヒトの臨床で用いられている投与量を行った。黄耆の品質管理の問題はあるが、多くのマウス投与実験では約 10 倍量を投与することが多い。黄耆の作用機構を明らかにするには投与量の問題に言及して詳細な検討が必要である。

本研究では Cry j I 特異的 IgE 産生を測定するスギ花粉症マウスモデルを作製した。このモデルを活性の弱い食材の効果をスクリーニングするためには、特異的 IgE 産生におけるマウスの個体間差を抑えることで本スギ花粉症マウスモデルの適用が更に広がると考えられる。

謝 辞

スギ枝の採取およびスギ花粉の採取方法、取り扱い方法を教授頂きました大分県林業試験場育林部・副部長の佐々木義則先生、IgE-capture ELISA 法を教授頂きました千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科 教授 阪口雅弘博士に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Kaneko, Y., Motohashi, Y., Nakamura, H., Endo, T. & Eboshida, A. Increasing prevalence of Japanese cedar pollinosis: a meta-regression analysis. *Int Arch Allergy Immunol* 136, 365-71 (2005).
2. Okuda, M. Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol* 91, 288-96 (2003).
3. 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* 71, 77-86 (1983).
4. Sone, T. et al. Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 619-25 (1994).
 5. Sakaguchi, M. et al. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45, 309-12 (1990).
 6. Hashimoto, M. et al. Sensitivity to two major allergens (Cry j I and Cry j II) in patients with Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis. *Clin Exp Allergy* 25, 848-52 (1995).
 7. Sugimura, K. et al. Th1/Th2 response profiles to the major allergens Cry j 1 and Cry j 2 of Japanese cedar pollen. *Allergy* 51, 732-40 (1996).
 8. Merayo-Lloves, J., Zhao, T. Z., Dutt, J. E. & Foster, C. S. A new murine model of allergic conjunctivitis and effectiveness of nedocromil sodium. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1129-40 (1996).
 9. Fukushima, A., Shii, D., Sumi, T., Kageyama, T. & Ueno, H. *Cryptomeria japonica*-induced allergic conjunctivitis in mice. *Biol Pharm Bull* 30, 1745-7 (2007).
 10. Imaoka, K., Sakaguchi, M. & Inouye, S. [Antibody responses against Japanese cedar pollen allergen (Cry j I) in different strains of rats]. *Jikken Dobutsu* 42, 61-5 (1993).
 11. Mamoni, R. L., Rossi, C. L., Camargo, Z. P. & Blotta, M. H. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 65, 237-41 (2001).
 12. Sakaguchi, M., Inouye, S., Miyazawa, H. & Tamura, S. Measurement of antigen-specific mouse IgE by a fluorometric reverse (IgE-capture) ELISA. *J Immunol Methods* 116, 181-7 (1989).
 13. Plebani, A., Ugazio, A. G., Avanzini, A. M., Monafò, V. & Burgio, G. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for cow's milk protein-specific IgE using biotinylated antigen. Avoidance of interference by specific IgG. *J Immunol Methods* 90, 241-6 (1986).
 14. Plebani, A. et al. Role of IgE in the pathogenesis of milk allergy in infancy: reassessment by a new ELISA technique. *J Clin Lab Immunol* 20, 93-6 (1986).
 15. Olivieri, V., Beccarini, I., Gallucci, G., Romano, T. & Santoro, F. Capture assay for specific IgE. An improved quantitative method. *J Immunol Methods* 157, 65-72 (1993).
 16. Seitzer, U. et al. Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a mouse model exhibiting an IgE response to Timothy grass allergens. *Med Sci Monit* 9, BR407-12 (2003).
 17. Magone, M. T., Chan, C. C., Rizzo, L. V., Kozhich, A. T. & Whitcup, S. M. A novel murine model of allergic conjunctivitis. *Clin Immunol Immunopathol* 87, 75-84 (1998).
 18. Snapper, C. M., Kehry, M. R., Castle, B. E. & Mond, J. J. Multivalent, but not divalent, antigen receptor cross-linkers synergize with CD40 ligand for induction of Ig synthesis and class switching in normal murine B cells. A redefinition of the TI-2 vs T cell-dependent antigen dichotomy. *J Immunol* 154, 1177-87 (1995).
 19. Snapper, C. M. & Paul, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944-7 (1987).
 20. Kaneko, M. et al. Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: hochu-ekki-to). *Immunopharmacology* 36, 79-85 (1997).
 21. Kim, J. Y. et al. DA-9601, *Artemisia asiatica* herbal extract, ameliorates airway inflammation of allergic asthma in mice. *Mol Cells* 22, 104-12 (2006).
 22. Lee, S. H., Sohn, Y. S., Kang, K. K., Kwon, J. W. & Yoo, M. Inhibitory Effect of DA-9201, an Extract of *Oryza sativa* L., on Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness in Mouse Asthma Model. *Biol Pharm Bull* 29, 1148-53 (2006).
 23. Ishimitsu, R., Nishimura, H., Kawauchi, H., Kawakita, T. & Yoshikai, Y. Dichotomous effect of a traditional Japanese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang on allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol* 1, 857-65 (2001).
 24. Toda, M. et al. Inhibition of immunoglobulin E response to Japanese cedar pollen allergen (Cry j I) in mice by DNA immunization: different outcomes dependent on the plasmid DNA inoculation method. *Immunology* 99, 179-86 (2000).
 25. Takagi, H. et al. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17525-30 (2005).
 26. Sakurai, K. et al. IgE production after four routes of injections of Japanese cedar pollen allergen without adjuvant: crucial role of resident cells at intraperitoneal or intranasal injection site in the production of specific IgE toward the allergen. *Microbiol Immunol* 49, 433-41 (2005).
 27. Fang, S. P., Tanaka, T., Tago, F., Okamoto, T. & Kojima, S. Immunomodulatory effects of gyokuheifusan on INF-gamma/IL-4 (Th1/Th2) balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Biol Pharm Bull* 28, 829-33 (2005).
 28. Suzuki, T. et al. Suppressing effects of Hochu-ekki-to, a traditional Chinese medicine, on IgE production and histamine release in mice immunized with ovalbumin. *Biol Pharm Bull* 22, 1180-4 (1999).
 29. Kobayashi, H. et al. Hochu-ekki-to suppresses development of dermatitis and elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Drugs Exp Clin Res* 29, 81-4 (2003).
 30. Kobayashi, H. et al. The effects of Hochu-ekki-to in patients with atopic dermatitis resistant to conventional treatment. *Int J Tissue React* 26, 113-7 (2004).

31. Chapman, M. D., Wunschmann, S. & Pomes, A. Proteases as Th2 adjuvants. *Curr Allergy Asthma Rep* 7, 363-7 (2007).
32. Schulz, O., Sewell, H. F. & Shakib, F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med* 187, 271-5 (1998).
33. Shirasaki, H., Yamamoto, T., Koyanagi, Y., Watanabe, N. & Himi, T. Detection of Specific IgE Antibodies in Sera of Japanese Birch-Allergic Patients Using Recombinant Allergens Bet v 1, Bet v 2 and Bet v 4. *Allergol Int* 57, 93-6 (2008).
34. Rossi, R. E., Monasterolo, G. & Monasterolo, S. Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles. *Allergy* 58, 929-32 (2003).
35. Seymour, B. W. et al. Gender differences in the allergic response of mice neonatally exposed to environmental tobacco smoke. *Dev Immunol* 9, 47-54 (2002).
36. Kang, H., Ahn, K. S., Cho, C. & Bae, H. S. Immunomodulatory effect of Astragali Radix extract on murine TH1/TH2 cell lineage development. *Biol Pharm Bull* 27, 1946-50 (2004).
37. Kurashige, S., Akuzawa, Y. & Endo, F. Effects of astragali radix extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. *Cancer Invest* 17, 30-5 (1999).