

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

氏名 増田 健一

指導教官 辻本 元

論文題目 **Studies on the allergic reactions to Japanese cedar pollen in dogs**

イヌにおけるスギ花粉に対するアレルギー反応に関する研究

近年、日本においてはスギ花粉飛散時期にスギ花粉症を発症する人口の増加が著しく、その対応が大きな社会的問題となっている。ヒトのスギ花粉症においては、結膜炎、鼻炎、喘息、さらにはアトピー性皮膚炎などの臨床症状を起こすことが特徴的であり、これらはスギ花粉抗原に対する I 型アレルギー反応によって発生していることが示されてきた。

スギ花粉抗原中の成分には、主要アレルゲンと呼ばれる 2 種類のタンパク質が見つかっており、これらはスギ花粉特異的 IgE 値の上昇を惹起する。Cry j 1 は 1983 年に安枝らによって同定された 45 kDa のタンパク質であり、ペクテートリアーゼの酵素活性を持っている。Cry j 1 特異的 IgE 値の上昇はスギ花粉症を発症したヒトのほとんどにおいて認められ、さらに、Cry j 1 には IgE の認識部位である B 細胞エпитープおよび T 細胞の認識部位である T 細胞エпитープが同定されており、スギ花粉症の発症における Cry j 1 の重要性が免疫学的に解明されてきた。一方、第 2 番目の主要アレルゲンとして 38 kDa のタンパク質である Cry j 2 が同定されている。Cry j 2 特異的 IgE がスギ花粉症患者の血清中に検出されるが、その頻度は Cry j 1 特異的 IgE が検出される頻度よりも低い。このようなことから、スギ花粉症に対する根治的治療法を考えた場合には、その標的タンパク質として Cry j 1 が重要であると考えられている。

日本人におけるスギ花粉の感作状況から、日本に生息するヒト以外の動物においてもヒトと同様にスギ花粉による感作が存在するものと想定された。ニホンザルにおいては、スギ花粉飛散時期に鼻炎、結膜炎などのヒトのスギ花粉症と類似した症状を呈し、また血清中にスギ花粉抗原特異的 IgE 値の上昇が認められ、リンパ球芽球化反応および末梢血好塩基球からのヒスタミン放出がスギ花粉抗原によって特異的に誘導されることが示されている。イヌにおいては、アトピー性皮膚炎を発症した 5 症例が、スギ花粉抗原に対して皮内反応陽性であったとする報告があり、

スギ花粉感作が存在することが示唆されているが、疫学および免疫学的に詳細な検討は行われておらず、その実態は不明のままであった。

実験的感作は成立するが、症状の発生が認められないマウスなどの実験動物とは異なり、自然発症によりスギ花粉症を起こす動物は自然発症疾患モデル動物として重要性が高いと考えられる。とくに、イヌはその飼育されている環境がヒトにおける周囲の環境と同一であることが多く、ヒトにおけるスギ花粉感作の環境を反映していると考えられ、ヒトのスギ花粉自然感作のモデル動物として重要である。また、イヌのアトピー性皮膚炎は最もよく認められるアレルギー性疾患の一つであり、その症例数も多いことから、アレルギー研究における有用性は高いと言える。これらのことから、スギ花粉に感作されており、臨床症状としてアトピー性皮膚炎を呈するイヌのアレルギー反応を詳細に検討することは、将来的にスギ花粉症に対する根治的治療法開発に役立つと考えられる。

今回の研究においては、はじめに、第1章においてイヌにおけるスギ花粉の感作状況を把握するため、皮内反応および抗原特異的 IgE 検査を用い、アトピー性皮膚炎のイヌにおけるスギ花粉感作を疫学的に検討した。第2章では、スギ花粉感作が認められたアトピー性皮膚炎のイヌにおいて、スギ花粉に対する反応性をリンパ球芽球化反応および末梢血好塩基球のヒスタミン放出によって検討した。第3章では、これらのイヌにおいてスギ花粉主要アレルゲンである Cry j 1 および Cry j 2 に対する IgE 反応性について検討した。第4章においては、Cry j 1 の感作が認められた症例について、その症状を臨床的に観察するとともに、血清中 Cry j 1 特異的 IgE 値の季節的変動および Cry j 1 に対するリンパ球芽球化反応を検討した。

## 第1章 日本のアトピー性皮膚炎のイヌ42頭におけるアレルゲンの同定

アトピー性皮膚炎のイヌにおいては、さまざまな環境抗原に感作されていることが知られている。そこで、日本におけるアトピー性皮膚炎のイヌ42頭において、26種類の抗原を用いた皮内反応および24種類の抗原を用いた抗原特異的 IgE 検査を実施し、その感作抗原について疫学的に解析した。その結果、今回検討した42症例において最も高率に感作が認められた抗原はハウスダストマイトであり、その割合は皮内反応において60%、IgE 検査において54.8%であった。その次にスギ花粉の感作が高率に認められ、皮内反応および IgE 検査においてそれぞれ50%および16.7%であった。以上のことから、スギ花粉はアトピー性皮膚炎のイヌにおいてハウスダストマイトに次いで高頻度に認められる環境アレルゲンであることがわかった。

## 第2章 アトピー性皮膚炎のイヌにおけるスギ花粉抗原に対する *in vivo* および *in vitro* 反応性に関する検討

イヌにおいてはスギ花粉に対するアレルギー反応に関する詳細な検討は行われていない。そ

ここで、本章においては、スギ花粉に感作が認められたアトピー性皮膚炎のイヌを用い、ヒトのスギ花粉症に用いられる検査系を使ってその免疫学的類似性について検討した。

第1章で行った検討においてスギ花粉の感作が認められたアトピー性皮膚炎のイヌ10症例において、スギ花粉抗原刺激による末梢血好塩基球のヒスタミン放出能および末梢血単核球のリンパ球芽球化反応について調べた。その結果、10症例中2例には1および10 ng/mlの抗原濃度において明らかなスギ花粉抗原特異的なヒスタミン放出が認められ、抗原濃度10 ng/mlにおけるヒスタミン放出率はそれぞれ24.1%および86.2%であった。スギ花粉抗原に対するリンパ球芽球化反応を検討した5症例においては、いずれもスギ花粉抗原特異的な反応が認められ、そのstimulation indexは4.0から6.5であった。

以上のことから、スギ花粉の感作が認められたアトピー性皮膚炎のイヌにおいては、スギ花粉症のヒトと同様なスギ花粉に対するアレルギー反応が認められることが明らかとなった。このことは、スギ花粉に対するアレルギー反応の獲得は、T細胞による抗原認識、スギ花粉特異的IgE産生、さらにそのIgEに受動感作された肥満細胞の脱顆粒による一連の反応によって起こることが示唆された。

### 第3章 アトピー性皮膚炎のイヌにおけるELISAによるスギ花粉主要アレルゲン(Cry j 1およびCry j 2)に対するIgE反応性

ヒトのスギ花粉症においては、2種類のスギ花粉主要アレルゲン(Cry j 1およびCry j 2)に対するIgE反応性が認められている。そこで、スギ花粉の感作が認められたアトピー性皮膚炎のイヌの血清を用い、これら主要アレルゲンに対するIgEの反応性を検討した。

スギ花粉粗抗原に対する血清IgEが検出された27頭のイヌのうち、全症例においてCry j 1特異的IgEの上昇が認められたが、Cry j 2特異的IgEの上昇は37% (10/27頭)のイヌに認められたに過ぎず、スギ花粉粗抗原に対するIgEはCry j 1特異的IgEであることが予想された。さらに、それを確認するために、Cry j 1特異的IgEが検出された血清をCry j 1によって吸収処理した後、スギ花粉粗抗原に対するIgEを測定した。その結果、スギ花粉粗抗原に対するIgEはほぼ完全に検出されなくなったことから、スギ花粉粗抗原に対するIgEはCry j 1特異的IgEであることが証明された。以上のことより、イヌにおいてはスギ花粉感作においてCry j 1が主要アレルゲンであることがわかった。

### 第4章 スギ花粉主要アレルゲンの感作が認められたイヌにおける季節性アトピー性皮膚炎

本章においてはCry j 1にのみ感作が認められたアトピー性皮膚炎のイヌの3症例について臨床的検討を行うとともに、そのアレルギー反応について詳細に解析した。

これら3症例においては、Cry j 1特異的IgE値は症状の発現と関連して季節変動を示しており、

スギ花粉の飛散時期の春に高値となり、非飛散時期の秋には低値となった。また、末梢血リンパ球の Cry j 1 に対する芽球化反応は、スギ花粉粗抗原に対するものとほぼ同程度であり、スギ花粉抗原に対して芽球化反応を示すリンパ球のほとんどは Cry j 1 に反応するものであることがわかった。このことから、これら 3 症例のイヌにけるスギ花粉に対するアレルギー反応は Cry j 1 に対するものが主体であり、それがアトピー性皮膚炎の発症と関連することが示唆された。

本研究成果はアトピー性皮膚炎のイヌにおけるスギ花粉感作に関わる疫学および免疫学的背景を明らかにしたものである。イヌにおける環境抗原として、スギ花粉抗原はアトピー性皮膚炎を惹起する一要因であることが疫学的に推察され、そのアレルギー反応はヒトと同様に I 型アレルギー反応であることを示した。さらに、このようなアレルギー反応はスギ花粉の主要アレルゲンの Cry j 1 に対するものが主体であることが判明した。これら一連の研究成果によって、イヌのスギ花粉症におけるアレルギー反応の全体像を把握することが可能となった。

今回の研究結果から、イヌにおけるスギ花粉に対するアレルギー反応は Cry j 1 を認識する一連の免疫反応が関わっていることが示唆された。このアレルギー反応はリンパ球芽球化反応が示す T 細胞による Cry j 1 の認識に始まり、IgE 検査結果が示す B 細胞による Cry j 1 特異的 IgE 上昇、最終的には皮内反応やヒスタミン放出能の解析結果が示すように、IgE に受動感作された肥満細胞の脱顆粒による即時型反応の発現につながるものと考えられた。ヒトにおいては、これらアレルギー反応を不応答化する安全な免疫療法を開発するために、Cry j 1 の T 細胞抗原決定基 (T 細胞エピトープ) および B 細胞抗原決定基 (B 細胞エピトープ) が同定されてきた。本研究によって得られた成果に基づき、イヌにおいても今後このような治療戦略を実施することが可能となった。

イヌのスギ花粉感作におけるアレルギー反応がヒトと同様であることが示されたため、免疫療法などの根治的治療法を開発する際に、イヌがスギ花粉症自然発症動物モデルとして重要であることが示唆された。イヌにおけるスギ花粉感作の状況は、その飼育される環境がヒトと同じであることからヒトと同様と考えられ、さらにその感作成立はアレルギー素因を持つ個体に発症すると考えられ、実験的感作モデルと大きく異なる。このようなことから、スギ花粉に感作されアトピー性皮膚炎のイヌは、ヒトのスギ花粉症の状況をよく反映し、本研究のように自然感作動物モデルを詳細に検討することによって、将来的にはイヌを用いることによってスギ花粉症の根治的治療法の開発が可能であると考えられる。

本研究の結果はこれまでに不明であったイヌにおけるスギ花粉に対するアレルギー反応の免疫学的背景に関する知見を提供するものである。また、本研究の成果は、イヌのアトピー性皮膚炎の発症機序の解明に関与するばかりではなく、アレルギー性疾患全般の病態解明を目指した研究に寄与するとともに、スギ花粉症に対する新規治療法開発においてきわめて有用なモデル系を

提供するものと考えられる。