

スギアレルギー性結膜炎における血清および涙液中の スギ特異的 IgE および IgG サブクラス抗体 (図5)

佐藤ひとみ・金山 貴子・宮永 嘉隆 (東京女子医科大学附属第2病院眼科)
中川 武正・宮本 昭正 (東京大学医学部内科物理療法学教室)

Japanese Cedar Pollen-Specific Antibodies of IgE and IgG Subclasses in Patients with Allergic Conjunctivitis

Hitomi Sato*, Takako Kanayama*, Yoshitaka Miyanaga*
Takemasa Nakagawa** and Terumasa Miyamoto**

*Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College, Daini Hospital

**Department of Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo

要 約

スギ花粉によるアレルギー性結膜炎患者26例および健常者9例について、血清中のスギ花粉特異的 IgE, IgG₁ および IgG₄ 抗体, また涙液中の IgE および IgG₄ 抗体を測定した。IgE 抗体は RAST 法により, IgG₁ および IgG₄ 抗体は ELISA 法を用いて測定した。なお, IgG₁ 抗体測定には抗 IgG₁ ポリクローナル抗体を, IgG₄ 抗体には抗 IgG₄ モノクローナル抗体を用いた。血清中の IgG₁ 抗体は患者群および健常者群で差は認められなかったが, IgE および IgG₄ 抗体は患者血清で有意の高値を示した。涙液中では IgE 抗体が患者群で有意に高値を示したが, IgG₄ 抗体では有意差を認めなかった。(日眼 92:1605—1609, 1988)

キーワード: アレルギー性結膜炎, IgG₄, スギ花粉

Abstract

Japanese cedar pollen-specific IgE, IgG₁ and IgG₄ antibodies in the sera and IgE and IgG₄ antibodies in tears were evaluated in twenty-six patients with allergic conjunctivitis and nine normal subjects.

IgE antibodies were evaluated using the RAST method. IgG₁ and IgG₄ antibodies were evaluated with the ELISA method using anti-human IgG₁ polyclonal antibodies and anti-human IgG₄ monoclonal antibodies, respectively.

IgE and IgG₄ antibody levels in the sera of patients with conjunctivitis were significantly higher than those of normal subjects, while IgG₁ antibody levels showed no significant difference. IgE antibody levels in the tears of patient with conjunctivitis were significantly higher than those of normal subjects, but IgG₄ antibody levels showed no significant difference. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1605—1609, 1988)

Key words: Allergic conjunctivitis, IgG₄, Japanese cedar pollen

別刷請求先: 116 東京都荒川区西尾久 2-1-10 東京女子医大第2病院眼科 佐藤ひとみ (昭和63年5月24日受付)

Reprint requests to: Hitomi Sato, M.D. Tokyo Women's Medical College, Daini Hospital

2-1-10 Nishiogu, Arakawa-Ku, Tokyo 116, Japan

(Accepted for publication May 24, 1988)

I 緒 言

日常の眼科診療において、アレルギー性結膜炎患者は、環境因子の変化などに伴い近年増加する傾向がみられ、中でもスギ花粉抗原は最も一般的な原因物質とされている。これらI型アレルギーの免疫学的発生機序は、IgEのほかIgG抗体が深く関連し、眼科領域ではライ麦花粉やブタクサなどに対するアレルギー性結膜炎患者のIgE、IgG₁およびIgG₄の検出例が報告されている^{1)~3)}。

IgG₄については当初、即時型アレルギー反応とIgG short-term sensitizing antibody (IgG STS) に代表される anaphylactic なIgG抗体との関連が検討されたが、最近ではむしろ阻止抗体 (blocking antibody) として抑制的に作用することが知られている。例えば、気管支喘息患者においては減感作療法にて抗原特異的IgG抗体は症状の軽快とともに増加し、IgE抗体は逆に低下する³⁾。しかし眼科領域においては結膜炎が主なアレルギー性疾患であり、治療はステロイド、DSCG等の点眼薬が主体となる。従って、減感作療法を施行することは稀であり、これまで頻度の高い疾患の割にその原因の検索が立ち後れてきた。そこで今回我々は、IgG₄の果たす役割を追求するための第一段階として、血清とともに涙液中のIgEおよびIgGサブクラス抗体の測定を試み、興味ある知見を得たのでここに報告する。

II 実験方法

臨床的にアレルギー性結膜炎と診断され、皮内反応でスギ花粉に対する過敏性を示した症例26例および健常者9例を対象として、血清中のIgE、IgG₁、IgG₄および涙液中のIgE、IgG₄抗体について検討を加えた。アレルギー性結膜炎患者群の内訳は、年齢11歳~58歳、平均35.1歳、うち男性6例、女性20例で、罹病期間は1~14年、平均3.8年である。健常者群は年齢18歳~66歳、平均32.9歳、うち男性2例、女性7例である。これらの症例について血清および涙液を採取した。涙液はマイクロキャピラリーを用いて結膜嚢より約100 μ l採取し、血清とともに-20 $^{\circ}$ Cに保存した。

スギ花粉特異的IgE抗体はファデザイム RAST キット (Pharmacia 社) を用いて測定し、単位はファデザイム RAST ユニット (PRU) で示した。すなわち、リファレンスを用いた吸光度標準曲線から、吸光度より各血清および涙液中のIgE抗体濃度を求め、アレル

ギー性結膜炎患者群および健常者群の抗体値を検定した。

また、スギ花粉特異的IgG₁およびIgG₄の測定は基本的に Engvall らの方法に準じたELISA法を採用した⁵⁾。即ち、polyvinyl chloride microtiter plate (Dinatech, Alexandria, Va) に、phosphate-buffered-saline (PBS: 0.1M sodium phosphate, 0.15M sodium chloride, pH 7.2) で100 μ g/mlに希釈したスギ花粉抗原を50 μ l注入した。これを4 $^{\circ}$ Cの条件で1日静置し、PBSを用いて3回洗浄した。次いで1%牛血清アルブミン (BSA) 添加PBS (PBS-BSA) 100 μ lを加えて、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置、残存する付着部位のブロックを行なった。次いで、PBSを用いて再洗浄の後、被検血清もしくはPBS-BSAによる3倍希釈の被検涙液を50 μ l注入し、37 $^{\circ}$ Cで2時間 incubate を行なった。これを再び洗浄し、PBS-BSAで500倍に希釈した抗ヒトIgG₁抗体もしくは抗ヒトIgG₄抗体を50 μ l注入し、4 $^{\circ}$ Cでover night incubate を行なった。ここで、IgG₁の測定にあたっては500倍に希釈したヒツジポリクローナル抗IgG₁抗体、IgG₄の測定にあたってはマウスモノクローナル抗IgG₄抗体を用いた。

これを再び洗浄した後、ここにPBS-BSAで1,000倍に希釈した peroxidase 標識の抗ヒツジIgG抗体、もしくは抗マウスIgG抗体を50 μ l注入し、37 $^{\circ}$ Cで1時間 incubate した。再洗浄の後 substrate として、o-phenylenediamine 溶液 (Sigma) を50 μ l注入し、室温で1時間 incubate した。なお substrate solution は0.1M citric acid および0.2M Na₂ HPO₄を混合した buffer 50ml に o-phenylenediamine を20mg 加えて混和し、使用直前に5 μ lの30% H₂O₂を加えたものを使用した。

この試料に4N H₂SO₄を50 μ l加え、反応を停止させたあと、automated microtiter plate reader (MTP 12, Corona Electric, Tokyo) を用いて500nmにおける吸光度を測定した。血清中の抗体測定は duplicate とし、その平均値を採用、涙液においては1回の測定値を採用し、それぞれの値から background 値を差し引いて、OD500としてその抗体値を表した。なお、background 値は、被検血清もしくは被検涙液を加える際に、PBS-BSAを代用して同様の操作を行なった時の吸光度である。なお、これらの成績の検定方法は Student t test を採用した。

また、スギ花粉抗原は鳥居薬品より提供された凍結乾燥末、ヒツジ抗IgG₁抗体はベルン大学より提供され

たポリクローナル抗体, マウス抗 IgG₄抗体はヤマサ醤油研究所より提供されたモノクローナル抗体を用いた。

III 結 果

初めに血清での成績を示す。血清中のスギ花粉特異的 IgE 抗体についてアレルギー性結膜炎患者群および健常者群を比較した成績を Fig. 1 に示す。患者群の成績は健常者群に比べ、有意に高値を示した。また、血清中 IgG₁抗体には有意の差が認められなかったのに対し (Fig. 2), IgG₄抗体は患者群に有意の高値が認められた (Fig. 3)。なお、これら3種の抗体間に相関は認められなかった。

次に涙液での成績を示す。涙液中の IgE 抗体はアレルギー性結膜炎患者群で健常者群に比べ有意に高値を示した。涙液中の IgG₄抗体は患者群および健常者群で有意の差は認められなかった。また、涙液中の IgE と IgG₄抗体の間に相関は認められなかった。

一方、IgE および IgG₄抗体の血清中および涙液中抗体値の相関は、アレルギー性結膜炎患者群における解析では認められず、罹病期間と各抗体の間にもやはり相関は認められなかった。また、血清中 IgG₁/IgG₄の比

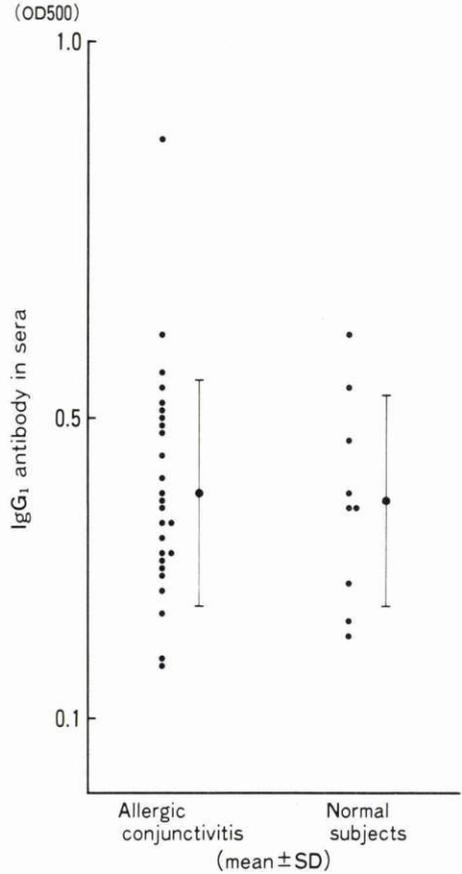


Fig. 2 Comparison of IgG₁ antibodies to Japan Ceders in sera using ELISA between patients with allergic conjunctivitis and normal subjects. There are no significant difference between the two groups.

もアレルギー性結膜炎患者群と健常者群で有意差は認められなかった。

IV 考 按

本試験の結果、血清中の IgE および IgG₄抗体がアレルギー性結膜炎患者群において有意に高値を示したのに対し、IgG₁抗体には差は認められなかった。即時型アレルギー反応の発生は IgE dependent であり、IgE 抗体の高値は当然の結果である。アレルギー性結膜炎患者で、血清 IgG₁が上昇しなかったのは、生体に侵入した抗原の量や種類に関係があるのかもしれない。一方 IgG₄抗体の高値は IgE 抗体とともに即時型アレルギー反応と何らかの関連があることを示唆した。しかし、IgG₄と IgE 抗体の相関は認められず、罹病期間と

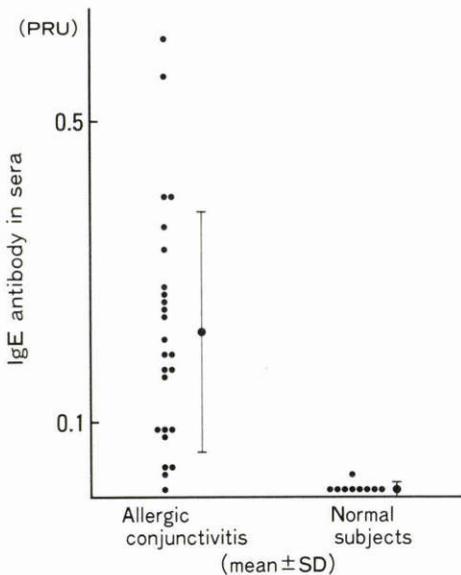


Fig. 1 Comparison of IgE antibodies to Japan Ceders in sera using RAST between patients with allergic conjunctivitis and normal subjects. The levels were significantly elevated in the patients with allergic conjunctivitis. (p<0.01)

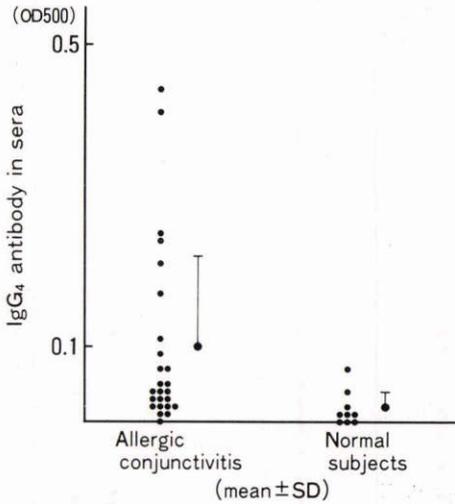


Fig. 3 Comparison of IgG₄ antibodies to Japan Ceders in sera using ELISA between patients with allergic conjunctivitis and normal subjects. The levels were significantly elevated in the patients with allergic conjunctivitis. ($p < 0.01$)

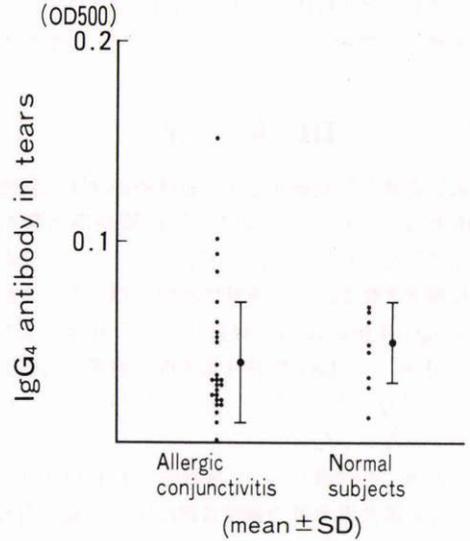


Fig. 5 Comparison of IgG₄ antibodies to Japan Ceders in tears using ELISA between patients with allergic conjunctivitis and normal subjects. there are no significant different between the two groups.

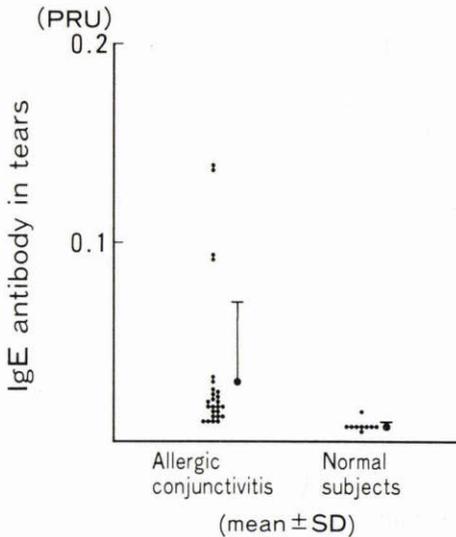


Fig. 4 Comparison of IgE antibodies to Japan Ceders in tears using RAST between patients with allergic conjunctivitis and normal subjects. The levels were significantly elevated in the patients with allergic conjunctivitis. ($p < 0.01$)

IgG₄抗体との相関も認められなかったことより、本試験の結果からはIgG₄の意義を結論づけることはできない。気管支喘息では、即時型気管支反応(immediate asthmatic response: IAR)と遅発型気管支反応(late

asthmatic response: LAR)があり、IARはIgE dependent, LARはIgG₁ dependentであり、減感作療法に関与するのはLARのほうで、IgG₁/IgG₄の値が大きい場合にはLARを発現させる可能性が考えられている⁶⁾。アレルギー性結膜炎にLAR様の反応があるかどうかは不明であるが、IgG₁/IgG₄の値は患者群および健常者群に有意差はみられず、やはりIgG₄の blocking antibodyとしての作用は証明できなかった。

涙液中の抗体の測定は、涙液採取量が少なく、また、未発表の同様の実験でほぼ同等の結果を得ているため1回の測定を値として採用した。

涙液においては、Ballowらは、春季カタルの結膜炎患者の涙液中IgE抗体をやはりRASTにて測定し、約半数の症例でIgE抗体を検出している¹⁾。今回我々の実験ではさらに健常者群との比較を行なった結果、アレルギー性結膜炎患者群でIgE抗体が有意に高値を示し、即時型アレルギー反応において局所でもIgE抗体が増加していることがわかる。また、Ballowらは、ライ麦花粉に対するアレルギー性結膜炎患者の涙液中IgG₄抗体をやはりELISAにて測定し高い値を得ている。また、トランスフェリンをマーカーとして検索した結果、抗体が結膜組織をtarget organとして局所的に産生されるとしている²⁾。今回の実験では、涙

液中のIgG₄抗体はアレルギー性結膜炎患者群および健常者群で有意差はなかったが、アレルギー性結膜炎患者群がやや高値を示す傾向が認められた。ただし、罹病期間との相関は認められず、重症度との関連は明らかでないため、IgG₄の免疫学的作用を考察することは難しい。

また、血清および涙液中の各抗体間の相関がみられなかったこと、中でも特にIgG₄においては涙液中のIgG₄が高値を示しても血清中のIgG₄がかなり低値である症例が患者群で認められ、アレルギー性結膜炎患者の局所での抗体産生を考える一つの材料として興味深い^{11,27)}。IgG₄抗体はantigenやtarget cellなどの違いによりanaphylacticな作用があるとの報告もあり、また抗原への長期暴露によっても増加するという報告もあり多様性を有している可能性も否定できない^{8)~11)}。今後IgG₄の意義について眼科領域で研究を進めるために、測定方法の改良に加え、今回調査できなかったアレルギー性結膜炎患者の重症度とIgG₄抗体値との関係の検索などをおこなっていきたい考えである。

本論文の要旨は、昭和62年度第92回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) **Barrow M, Menderson L**: Specific immunoglobulin E antibodies in tear secretion of patients with vernal conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 66: 112-118, 1980.
- 2) **Barrow M, Menderson L**: Pollen-specific IgG antibodies in the tears of patients with allergic-like conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 73: 376-380, 1984.
- 3) **Barrow M, Menderson L, Donshik PC, et al**: IgG specific antibodies to eye grass and ragweed antigens in the tear secretions of patients with vernal conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 69: 114, 1982.
- 4) **Nakagawa T, Takaishi T, Sakamoto Y, et al**: IgG₄ antibodies in patients with house-dust-Mite-Sensitive bronchial asthma: Relationship with antigen-specific immunotherapy. *Int Archs Allergy Appl Immun* 71: 122-125, 1983.
- 5) **Engval E, Pearlman P**: Enzyme-Linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labelled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109: 129-135, 1972.
- 6) **中川武正**: アレルギーの発生機序. *病態生理* 5: 251-256, 1986.
- 7) **中川武正**: アトピー性疾患の減感療法—その現状と展望—. *臨床免疫* 17: 353-361, 1985.
- 8) **Platts-Mills TAE**: Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. *J Immunol* 122: 2218-2225, 1979.
- 9) **Perelmutter L**: IgG₄; Non-IgE mediated atopic disease. *Ann Allergy* 52: 64-67, 1984.
- 10) **Shakib F**: The IgG₄ subclass. *Monogr Allergy Karger Basel* 19: 223-226, 1986.
- 11) **Aalberse RC, Gaag RC, van der Gaag R, van Leeuwen J**: Serologic aspects of IgG₄ antibodies. *Journal Immunology* 130: 722-726, 1983.

(第92回日眼総会原著)