

## 2000年（第16回）日本国際賞受賞者 2000 (16th) Japan Prize Laureate



### 石坂公成博士（日本）

ラホイアアレルギー免疫研究所名誉所長  
1925年生まれ

### Dr. Kimishige Ishizaka (Japan)

President Emeritus, La Jolla Institute for Allergy and Immunology  
Born in 1925.

## 免疫グロブリン E の同定とアレルギーの機序

石坂公成

### 歴史的背景

約50年前、私が免疫学を始めた頃は、アレルギーは特異体質によるもの、或いは心因性の疾患であると考えられていた。しかし、多くの免疫学者は、この疾患の成立には免疫学的な機序が関係しているのではないかと疑っていた。その理由は、アレルギー患者の皮内に、その患者が sensitive であるアレルゲンを注射すると、紅斑を伴う皮膚反応が出る。しかも、患者血清を正常人の皮膚に注射しておいて、翌日アレルゲンを局所に注射すれば皮膚反応がみられるということがわかっていたからである。このことは1921年に Prausnitz と Küstner が記載したことであるが、この活性の本態はそれから40年間不明であった。

1920年代から50年代の中頃まで、免疫学者達は、抗体の示す活性はすべて一種類の抗体分子に associate しているものと考えていた。普通の血清反応では、アレルギー患者の血清中にはアレルゲンに対する抗体が見つからないので、Prausnitz-Küstner (P-K) 反応を起こす物質が抗体であるとは言えなかったわけである。そこで免疫学者達は、この抗体様物質をレアギンと呼んでいた。レアギンがどんな性質を持つかについては、1950年代に多くの免疫化学者や蛋白質化学者が検討したが、これらの研究者の一致した見解は、レアギンの物理化学的性質は普通の抗体とは少し違うということであった。

一方、1960年代の始めに、抗体活性をもつ蛋白質は一種類ではないことがわかり、免疫グロブリンという概念が確立され、レアギンは minor の免疫グロブリンアイソタイプに属するのではないかと考えられるようになった。ここで、IgA を確立した Belgium の Heremans が1962年に、アレルギー患者の血清から IgA を精製したところ、レアギンの活性は IgA 分画中に回収されるという事を報告した。この結果は何人かの人によって確認され、更に、レアギンが IgA であることを示唆するいくつかの傍証も上がったので、1962年から1965年にかけては、レアギンは IgA 抗体であると考えられていた。

当時の私の目的は、アレルギーの機序を知る事にあつたので、若しレアギンが IgA ならば、IgA 抗体をたくさんとって、それを使ってアレルギーの機序を研究しようと考えた。そこで、B 型や O 型の正常人を A 型物質で免疫して、抗 A 抗体をつくり、血清を分画して IgG, IgM, IgA を取り出した。ところが、A 型物質に対する抗体は、それが IgA でも、IgG でも、IgM でも、ヒトの皮膚を感作することが出来なかった。一方、アレルギー患者の血清から同じ方法で IgA を精製してみると、Heremans の言うように、レアギン活性はその中に回収された。私は、抗体の生物学的活性は、その Fc 部分によって決定されると信じていたので、アレルゲンに対する IgA 抗体がレアギン活性をもつのに、IgA

同種凝集素にはその活性がないということは信じられなかった。アレルギー患者血清からとった IgA 分画の中には IgA 以外の蛋白は検出出来なかったが、私は、この中にはまだ不純物が含まれており、レアギン活性はその不純物に associate しているのではないかと考えた。事実、その IgA 分画に IgA に特異的な抗体 (抗 IgA) を加えて、IgA を全部沈澱させてしまったところ、レアギン活性はすべて上清中に回収された。即ち、IgA 分画中のレアギンは IgA ではないことがわかる。

### IgE の同定

上述の実験結果は我々に非常に難しい問題を提供した。IgA 分画から IgA を除いた上清は水みたいなもので、その中に存在する免疫グロブリンは 1 cc 中に 1  $\mu$ g 程度しかなかったが、そのレアギン活性は、元の血清の活性と同程度であった。このことは、レアギン活性を持つ蛋白の血清中の濃度が血清 1 cc 中にマイクログラムの order であることを示唆している。その時まで、私はこの蛋白を単離しようとして仕事をしてきたが、この蛋白の血清中の濃度を考えると、そのアプローチでは患者血清が数リター必要になる。そんなに多量の血清を患者からとることは出来ないので、私はここで strategy を変更せざるを得なくなった。

私のとった strategy は、レアギン活性を持つ蛋白に特異的な抗体をつくり、これを使って、この蛋白を同定しようということであった。このために、レアギン活性の強い分画でくり返しウサギを免疫し、得られた抗血清を既知の免疫グロブリンで吸収した。吸収後の抗血清は、ヒトの IgG や IgA とも、また、正常血清との間にも沈降反応を起こさなかったが、何匹かのウサギのうち、一匹のウサギから取った抗血清はレアギンを吸収した。しかも、この抗血清中の抗体はブタクサに sensitive な患者血清からとった reagin-rich の分画中の  $\gamma$ 1 グロブリンと反応する。そして、この抗体と  $\gamma$ 1 グロブリンとでつくられた precipitin band は、放射性同位元素でラベルしたブタクサのアレルゲンを特異的に結合することがわかった。即ち、この  $\gamma$ 1 グロブリンは抗体活性を持つ蛋白であることがわかる。ここで使った抗血清の中には既知の免疫グロブリンと反応する抗体は入っていないから、

この  $\gamma$ 1 グロブリンは今までに記載されていない免疫グロブリンであると考えられる。私がこの  $\gamma$ 1 グロブリンを  $\gamma$ E と呼んだ理由は、この免疫グロブリンに属する抗体によって Erythema-wheal type のアレルギー性皮膚反応が起こると信じていたからである。事実、アレルギー患者の血清を DEAE とか、ゲルろ過とか、電気泳動で分画した時、どんな方法で分画しても、レアギンの分布は  $\gamma$ E 抗体の分布と一致したし、また、患者血清中の  $\gamma$ E 抗体の濃度は、P-K 反応で計ったレアギンの活性と相関した。そこで、最終的には、いろいろの方法を組み合わせて、患者血清中の  $\gamma$ E を精製した。最後にとれたサンプルの中には、 $\gamma$ E 以外の免疫グロブリンは検出されず、しかもこのサンプルの P-K titer は 1 : 80,000 だったので、レアギンは  $\gamma$ E 抗体であると結論した。期待したように、 $\gamma$ E は他の免疫グロブリンには存在しないユニークな抗原決定基をもち、 $\kappa$  及び  $\lambda$  の light chain determinant を他の免疫グロブリンと共有しているので、ユニークな免疫グロブリンアイソタイプと考えられた。その後、 $\gamma$ E と同じ抗原構造を有する骨髄腫蛋白 (myeloma protein) が見つかったので、 $\gamma$ E は IgE と呼ばれるようになった。

### IgE の標的細胞

IgE が同定された時点では、IgE がアレルギー疾患において重要な役割を演じている可能性については、疑問を抱く人が大勢を占めていた。そこで我々は、IgE 抗体が、皮膚のみならず、肺の組織を感作することを証明しようとした。当時、我々はヒトの IgE 抗体がサルの皮膚を感作することを知っていたので、サルの肺のフラグメントを使用した。肺のフラグメントに、ブタクサに sensitive な患者の血清を加えて、一晚 incubate した後、このフラグメントにブタクサ抗原を作用させると、ヒスタミンやロイコトリエンが遊離される。所が、患者血清を抗 IgE 抗体で吸収し、吸収血清で同じ肺のフラグメントを感作すると、抗原を加えてもヒスタミンもロイコトリエンも遊離されない。この結果は、IgE 抗体が肺組織を感作する能力を持ち、細胞に結合した IgE 抗体にアレルゲンが反応すると、アレルギー症状を起こす誘発物質が遊離することを示している。

しかし、免疫学者が、アレルギー性疾患に於ける IgE 抗体の役割を認めたのは、IgE が高い親和性で好塩基球や肥満細胞に結合する事、即ちこれらの細胞には IgE レセプター (FcεRI) が存在することがわかってからである。白血球の浮遊液に、EDTA の存在で、アイソトープでラベルした抗 IgE 抗体を加えて incubate すると、抗体は殆どすべての好塩基球に結合するが、他の白血球には結合しない。IgE が好塩基球に選択的に結合することは、ラジオラベルした E myeloma protein を白血球の浮遊液に加えることによって確認された。

次に我々は、IgE が結合する組織細胞を同定するため、E myeloma protein をサルに注射しておき、その肺の細胞浮遊液にラジオラベルした抗 IgE を加えたところ、抗 IgE は肥満細胞のみに結合した。同じ細胞浮遊液にラベルした抗 IgG を加えたときは、抗 IgG はマクロファージに結合し、肥満細胞には結合しない。この事実は、IgE が肥満細胞上に存在することを示す。又、この細胞浮遊液に抗 IgE を作用させると、ヒスタミンやロイコトリエンが遊離してくるが、抗 IgG を作用させても、これらの誘発物質は遊離してこない。このことは、肥満細胞に結合している IgE に抗 IgE が作用した結果、上記の誘発物質が遊離することを示している。肺細胞浮遊液中のヒスタミンの大部分は肥満細胞の顆粒の中に存在している。従ってこの結果は、肥満細胞に結合している IgE 抗体にアレルギーが作用すると、脱顆粒がおこることを示唆した。

IgE と IgE レセプター間の結合の特徴は、その高い親和性である。ラットやマウスの肥満細胞と同種の IgE や、ヒトの好塩基球とヒトの IgE について調べた結果によれば、IgE とレセプター間の結合の平衡定数は  $10^9 \sim 10^{10} \text{M}^{-1}$  であった。極めて少量の IgE 抗体で感作が成り立つ理由は IgE が高い親和性で肥満細胞上のレセプターに結合するためと考えられる。又、レアギンの特徴の一つは、感作が長時間続くことであるが、この性質は、IgE とレセプターの結合の解離定数が低いためと考えられる。

#### IgE によるアレルギー性反応の分子論的解析

何故 IgE だけが肥満細胞に結合するのか？何故他の免疫グロブリンはこの細胞には結合しないのか？という疑問であるが、これは予想され

たように、IgE 分子がその Fc 部分に特殊な構造をもつためであることが明らかになった。E myeloma protein の Fc フラグメントは高い親和性で肥満細胞に結合するが、この蛋白の Fab や F (ab')<sub>2</sub> フラグメントは肥満細胞に親和性をもたない。更に、大腸菌でつくったリコンビナントのヒトの IgE Fc フラグメントは、E myeloma protein と同じ親和性でヒトの好塩基球に結合することも明らかになった。その後の研究によって、IgE はその CH<sub>3</sub> ドメインによって肥満細胞のレセプターに結合することも明らかになった。

一方、IgE レセプターは Henry Metzger のグループによって、α, β, γ の 3 種類のポリペプチド鎖から成っていることが明らかにされ、それぞれのポリペプチド鎖をコードする cDNA のヌクレオチドの配列から、各ポリペプチド鎖のアミノ酸配列が明らかになった。それらの構造から予想されるように、IgE の Fc 部分はレセプターの α 鎖に結合する事、そして β や γ 鎖は α 鎖からのシグナルを細胞内の酵素に伝える働きをしている事も明らかになった。

アレルギーの立場から根本的な課題の一つは、肥満細胞に結合している IgE 抗体にアレルギーが反応すると、何故脱顆粒が起こるか？ということである。この点について、1970年頃までに分かったことは、脱顆粒が起こるためには、肥満細胞に結合している 2 分子或いはそれ以上の IgE 抗体が多価のアレルゲンや、2 価の抗 IgE によって架橋されることが必要であるということであったが、次いで、IgE の架橋が引き金になる理由は、IgE が強固に結合しているレセプターが dimerize されるためである事が明らかになった。その証拠には、レセプターに対する抗体を作って、これを肥満細胞に作用させると、IgE の関与なしにヒスタミン遊離がおこる。抗レセプターの Fab フラグメントはヒスタミン遊離を起ささない。しかし、レセプターに結合している抗レセプターの Fab フラグメントを、それに対する抗体で架橋すればヒスタミン遊離が起こる。これらのことを総合すると、IgE を介して肥満細胞が活性化されるのは、レセプターの dimerization が原因と考えられる。但し、生理的な状態で、このレセプターに結合するのは IgE だけであるから、IgE とアレルギーによってしか、このレセプターの架橋は起こ

らないわけである。

IgE リセプターの dimerization によって次に起こることが予想されるのは、細胞膜に associate している酵素の活性化である。事実、リセプターを架橋すると、チロシンキナーゼの活性化が起こり、フォスホリパーゼ C をリン酸化して活性化する。活性化されたフォスホリパーゼは、フォスファチジルイノシトール三リン酸を加水分解して、ジアシルグリセロールと、イノシトール1,4,5三リン酸を形成する。後者は細胞内の Ca イオンの mobilization を起こし、細胞質内の Ca イオンが上昇する。肥満細胞に Ca イオンを導入すると、脱顆粒が起こることを考えると、上記のプロセスは脱顆粒に関与していると考えられる。又、IgE リセプターの dimerization はフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> をも活性化し、その結果フォスホリリドが加水分解されて、アラキドン酸が出来る。我々は、このプロセスがロイコトリエンやプロスタグランジンなどのアラキドン酸誘導体の形成に essential な過程であると考えている。

### IgE 抗体の産生とその制御

IgE 抗体はアレルギー性疾患の成立に重要な役割を演じていると考えられるので、IgE 抗体が如何なる機序でつくられ、如何に制御されているかが検討されることになった。マウスを用いた実験から分かったことは、IgE 抗体は限られた実験条件の下でしかつくられないという事である。一般的に言えば、持続的な IgE 抗体の産生は、遺伝的にその抗原に対して抗体産生を起こし易い系のマウスを少量の抗原で適当なアジュバントを加えて免疫した時にのみ得られる。所が、例えばブタクサによる花粉症患者の血清について見ると、アレルゲンに対する IgE 抗体の濃度は1年を通じてそれ程変化しないし、IgG 抗体の濃度と同程度であって、IgA 抗体の濃度より高い。血清中の IgG の濃度が IgE の濃度の1万倍もある事を考えると、アレルギー患者ではアレルゲンに対する抗体産生を IgE アイソタイプに向かわせる機構が働いているのではないかと思われた。この機構は長い間わからなかったが、他の研究者の仕事によって、抗体産生に関与するヘルパーに原因がある事が分かってきた。抗体産生細胞の前駆細胞である B 細胞が、どのように分化して、如何なるアイソ

タイプの抗体をつくるようになるかは、多くの免疫学者によって研究された結果、その B 細胞と協調するヘルパー T 細胞によってコントロールされている事が明らかにされた。この点に関して、1986年に、Tim Mossman らは、マウスのヘルパー T 細胞のクローンは、それが活性化された時に作るサイトカインの種類によって、二つのタイプ (Th1, Th2) に分けられること、そして IgE 抗体産生のためには、IL-4、IL-5をつくる Th2 タイプのヘルパーが必要である事を明らかにした。IL-4 が IgE 抗体の産生に必須であることは、IL-4 遺伝子を欠如したマウスで証明された。IL-4 遺伝子をもたないマウスは IgG 抗体をつくるが IgE 抗体をつくることができない。

この原理は多分ヒトにもあてはまる。ヒトのヘルパー T 細胞の中には、IL-4とガンマインターフェロンをつくる Th0 タイプのヘルパーも存在するが、アレルギー患者の、アレルゲンに特異的なヘルパーは抗原刺激に際して IL-4 をつくるものが多く、IL-4 をつくらない Th1 タイプのクローンは非常に少ない。所が、同じ患者からツベルクリンや破傷風毒素に特異的なヘルパー T 細胞クローンをとると、大部分は Th1 タイプの細胞である。この事実は、患者がアレルゲンに対しては IgE 抗体をつくるが、ツベルクリンや破傷風毒素に対する IgE 抗体をつくらないという事実と相関している。アレルギー患者がアレルゲンに対する IgE 抗体をつくるのは、アレルゲンに特異的なヘルパーの大部分が Th2 であるためと考えられる。

何故アレルゲンに特異的な Th が Th2 タイプになったのであろうか？この点について重要なことは、Th1 と Th2 は共通の前駆細胞が分化して出来たもので、この細胞が Th1 に分化するか、Th2 に分化するかはいろいろのファクターでコントロールされているということである。例えば、ナイーブな T 細胞を刺激する抗原量が最少の時は、Th2 に分化しやすい。また、naive T 細胞の抗原刺激に関与する抗原提示細胞の種類も、分化の方向に影響するものと思われる。アレルゲンは一般に、呼吸器系や皮膚を通して体内に入り、リンパ組織に達するアレルゲンの量は極めて微量である。また、このような抗原導入の経路は多分 Th2 への分化に好適なものであろう。事実、マウスの皮膚に卵白ア

ルブミンを貼付して免疫を行った場合には、Th2 タイプのヘルパーができ易く、IgE 抗体が産生されやすい。

ヘルパー T 細胞の分化に関して、もうひとつの大切なことは、naive T 細胞が抗原刺戟を受ける時、細胞周囲に存在するサイトカインによって、分化の方向がきまることである。この細胞が IL-12 の存在で抗原刺戟を受けると、細胞は Th1 の方向に分化するが、同じ細胞を IL-4 の存在下で刺戟すると Th2 への分化が促進される。このサイトカインの影響は、アレルギー患者が始めは一つのアレルゲンに sensitive なのに、段々と、種々のアレルゲンによってアレルギーを起こすようになるという臨床的事実を説明しうるものではないかと思われる。一つのアレルゲンに対する IgE 抗体が作られている時は、そのアレルゲンに特異的な Th2 が刺戟されて IL-4 をつくっている。若しこのリンパ組織に第二のアレルゲンが入ってきた時には、そのアレルゲンに特異的な naive T 細胞の周辺には IL-4 が存在するので、この細胞も Th2 の方向に分化し、従って第二のアレルゲンに対しても IgE 抗体がつくられやすくなるのであろう。

#### アレルギー炎症の機序

1980年代に入って、アレルギーの研究はアレルギー性炎症に関心が集まってきた。例えば、アレルギー性気管支喘息を例にとると、患者は、アレルゲンに暴露した後、直ちに呼吸困難を起こすことがある。この即時型の症状は、IgE 抗体によって起こる肥満細胞からの誘発物質の遊離によって説明できる。しかし多くの患者は、6～8時間後に、更にひどい呼吸困難を起こす。この反応（遅発型反応）はアレルギー性炎症の結果であり、患者は非特異的刺戟に対しても気道過敏性を示すようになる。

IgE が発見された直後には、アレルギー性炎症は IgE とは無関係の機序で起こるものとされていた。所が、アレルギー患者の皮内に抗 IgE を注射すると、直後に erythema-wheal reaction が起こるだけでなく、数時間後には注射局所にアレルギー性炎症が起こることがわかった。この事は、IgE/肥満細胞系が即時型反応のみならず、遅発型反応をも起こしうる事を示している。この意味で興味がある知見は、肥満細胞上の IgE が架橋されると、ヒスタミンやロイコトリ

エンの遊離が起こるだけでなく、肥満細胞は TNF $\alpha$  や IL-5 のようなサイトカインを合成して遊離することである。アレルギー性炎症の特徴の一つは好酸球の浸潤であるが、IL-5は好酸球を活性化し、骨髄に働いて好酸球増多を惹起し、更に、好酸球の局所への浸潤にも関与することが判明した。活性化された好酸球は、血小板活性化因子やロイコトリエンを産生し、これらの物質は気管支平滑筋の収縮を起こす。更に、活性化した好酸球は、種々のサイトカインや、アレルギー性反応に重要な役割を演じていると考えられる蛋白を遊離する。この中で注目されている物質は、eosinophilic cationic protein や major basic protein と呼ばれる蛋白質である。これらの物質は細胞障害性が強く、気道上皮を障害し、その結果、気道は非特異的刺戟にも敏感に反応し、所謂、気道過敏性を起こすと考えられる。

しかし、アレルギー性炎症の機序はもっと複雑である。喘息患者の気道洗浄液やアトピー性皮膚炎の組織を調べてみると、IL-5 の mRNA を持つ多くの細胞が認められるが、これらは主に T 細胞である。従って、アレルギー炎症の惹起に関与する IL-5 の主な source は肥満細胞ではなく、Th2 細胞と考えられる。

アレルギー性炎症の解析には実験動物モデルが必要である。気管支喘息の特徴である気道過敏性は、ヒトの喘息でしかみられないものとされていたが、最近は犬やマウスを使って、この症状を再現できるようになった。これらのシステムでは、動物を適当なアジュバントを加えた抗原で免疫して IgE 抗体をつくらせておき、その動物に抗原のエロゾルを mist の形で一定時間、2～3回吸入させる。これによって、気道にアレルギー性の炎症がおこるが、これらの動物の静脈内にアセチルコリンを注射して気道の収縮を測定すると、免疫してエロゾルを吸入させた動物の気道はアセチルコリンに対して過敏になっていることがわかる。

気道におけるアレルギー性炎症の成立には抗原特異的 Th2 細胞が重要な役割を演じている。しかし、我々の最近の実験結果は、IgE/肥満細胞系も気道過敏性の発現に関与していることを示している。我々は、遺伝的に肥満細胞を欠く W/W<sup>v</sup> マウスと同系の +/+ マウスを免疫し、それに抗原のエロゾルを吸入させた。これらの

二つの純系マウスの間では、IgE 抗体の産生や気道内への好酸球の浸潤の程度については差が認められなかったが、気道過敏性には差が認められた。肥満細胞を持つ+/+マウスはアセチルコリンに対する気道過敏性を示したが、W/W<sup>v</sup> マウスでは同じ濃度のアセチルコリンを静注しても気道収縮は起こらなかった。しかも、+/+マウスの骨髄を培養して分化させた肥満細胞を W/W<sup>v</sup> マウスに移入してやれば、W/W<sup>v</sup> マウスも+/+マウスと同様の気道過敏性を示すようになった。即ち、このシステムでは、アレルギー性炎症の惹起に主役を演ずる IL-5 は、主として Th2 に由来するが、気道過敏性の発現には IgE/肥満細胞も重要な役割を演じていると思われる。

#### あとがき

ヒトの IgE は肥満細胞上のリセプターに高い親和性を有する唯一の免疫グロブリンである。このリセプターに結合している IgE 抗体が多価の抗原によって架橋されると、細胞は活性化されてヒスタミンやアラキドン酸誘導体を遊離し、これによってアレルギー症状が起こる。IgE 抗体が花粉症に見られる症状を起こすことは、この機構で説明しうる。一方、IgE 抗体の産生に主役を演ずる Th2 細胞はアレルギー性炎症の惹起にも重要な役割をもっている。このようなアレルギーの機序の研究にもとづいて、アレルギー性疾患をコントロールするいくつかの方策が示唆されている。

IgE の発見とその特性の解明はアレルギー反応の機序の解析を可能にした。そして、これらの基礎研究は、多くの研究者によってアレルギー性疾患の研究に応用された。我々の研究が認められたのは、これらの研究者がアレルギーの研究を発展させてくれたお蔭である。