(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3734846号
(P3734846)
(45)発行日　平成18年1月11日(2006.1.11)　(24)登録日　平成17年10月28日(2005.10.28)

(51)Int.Cl.　　F I
A61K 38/00 (2006.01)　　A61K 37/02
A61P 37/08 (2006.01)　　A61P 37/08

請求項の数 6　(全 10 頁)

(21)出願番号　特願平6-260044
(22)出願日　平成6年10月25日(1994.10.25)
(65)公開番号　特開平7-188055
(43)公開日　平成7年7月25日(1995.7.25)
審査請求日　平成13年10月4日(2001.10.4)
(31)優先権主張番号　特願平5-289037
(32)優先日　平成5年11月18日(1993.11.18)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000006138
明治乳業株式会社
東京都江東区新砂１丁目２番１０号
(74)代理人　110000084
特許業務法人アルガ特許事務所
(74)代理人　100068700
弁理士　有賀　三幸
(74)代理人　100077562
弁理士　高野　登志雄
(74)代理人　100096736
弁理士　中嶋　俊夫
(74)代理人　100101317
弁理士　的場　ひろみ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アレルギー疾患予防及び治療剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐで示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするアレルギー疾患予防及び治療剤。

【請求項２】

Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｓｅｒで示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするアレルギー疾患予防及び治療剤。

【請求項３】

アレルギー疾患が、スギ花粉アレルゲン及び／又はダニアレルゲンに起因するアレルギー疾患である請求項１又は２記載のアレルギー疾患予防及び治療剤。

【請求項４】

Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐで示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするヒスタミン遊離抑制剤。

【請求項５】

Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｓｅｒで示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするヒスタミン遊離抑制剤。

【請求項６】

ヒスタミン遊離が、スギ花粉アレルゲン及び／又はダニアレルゲンに起因するものである請求項４又は５記載のヒスタミン遊離抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明はアレルギー疾患予防及び治療剤に関し、更に詳細には感作細胞におけるヒスタミン等の化学伝達物質の脱顆粒現象を阻害することにより種々のアレルギー症状を防止するアレルギー疾患予防及び治療剤に関する。
【０００２】
【従来の技術】
我が国のアレルギー性疾患は年々増加しており、１９９２年の厚生省調査によると日本人の１／３は何らかのアレルギー症状を呈していると言われている。この増加原因として住宅環境を含めた生活環境の変化が挙げられており、ダニアレルゲン等のアレルゲンの増加、食生活の変化、ストレス、大気汚染の影響などが関与していると言われている。
【０００３】
アレルギー疾患の症状は多彩であるが、そのほとんどはＩ型アレルギー（即時型アレルギーとも呼ばれる）で、気管支喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎、アレルギー性胃腸炎、食物アレルギー等が挙げられる。
【０００４】
アレルギー反応を引き起こす抗原となるものをアレルゲンというが、主要なアレルゲン（本明細書では抗原と表現する場合がある）には、牛乳、鶏卵、大豆等の食物類、スギ、ヒノキ、シラカバ、ブタクサ等の花粉類、居住環境に生息する室内塵中のダニ類などがあり、これらによるアレルギーの発症頻度は極めて高い。
【０００５】
Ｉ型アレルギーの発症機序は、大きく次の３段階に大別されている。
【０００６】
第１段階：ヒト体内に入った種々の抗原はマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれ分解されてペプチドとなる。このペプチドの一部（Ｔ細胞が認識するエピトープ）は自己のＭＨＣ蛋白と複合体を形成し、Ｔ細胞にその抗原性を伝え、Ｔ細胞を活性化する。活性化されたＴ細胞は、Ｂ細胞の分化、増殖を促し、抗原特異的なＩｇＥ抗体産生を誘導する。産生されたＩｇＥ抗体は、標的細胞である皮膚や粘膜に存在する肥満細胞や、末梢血の好塩基球の細胞表面上のＩｇＥレセプターに結合して感作状態が成立する。
【０００７】
第２段階：再び侵入した抗原は感作細胞表面で２分子以上のＩｇＥ抗体と結合し、抗原を介して架橋現象を生じさせる。この架橋現象が引き金となって脱顆粒と共にヒスタミンやロイコトリエン等の化学伝達物質が遊離する。
【０００８】
第３段階：遊離したこれらの化学伝達物質が平滑筋収縮や毛細血管透過性増加をもたらし、所謂アレルギー症状を発症する。
【０００９】
Ｉ型アレルギーの予防及び治療方法には、抗アレルギー薬による方法や、減感作療法、食事療法などがある。抗アレルギー薬は、第２段階を作用点とするものが多く、細胞膜の安定化によって化学伝達物質の遊離を阻害すると言われている酸性抗アレルギー薬と、第３段階を作用点とする抗ヒスタミン作用を有する塩基性抗アレルギー薬がある。減感作療法は古くから実施されているが、原因アレルゲンを少量ずつアレルギー患者に皮下注射するため、アナフィラキシー等の副作用の問題、頻繁な受診と長期間の治療が必要であることなどの問題点が多いことから、余り用いられていない。食事療法は原因となるアレルゲンを日常の食生活から除いた方法により予防するが、アレルゲンを特定するのが容易ではなく、また調理上非常に煩雑になる。
【００１０】
さて、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン等の細胞外マトリックスは組織や器官形成の際の結合組織形成においてなくてはならないものである。つまり、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞などで合成されたこれらの細胞外マトリックスは細胞の外

周に線維状あるいは網目状の会合体を形成し、これらの会合体がさらに集合して最終的に血管基底膜や結合組織を形成する。これら細胞外マトリックスの構成成分の多くは細胞に対して親和性を示し、細胞を核として組織形成をおこなう。

【００１１】

フィブロネクチンは、これら細胞外マトリックスの中でも、非常に強い細胞親和性を示す。フィブロネクチンのアミノ酸配列と細胞接着活性との解析結果から、このフィブロネクチンの細胞に対する高親和性は、フィブロネクチン分子中のＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｓｅｒの４つのアミノ酸配列［（ＲＧＤＳ；それぞれのアミノ酸の一文字表記を示す）このうち、ＲＧＤの３つのアミノ酸配列が必須］と、細胞膜に存在するフィブロネクチンレセプター（ＦＮＲ）との結合によるものであることが明らかになった（Ｍ．Ｄ．Ｐｉｅｒｓｃｈｂａｃｈｅｒ、Ｅ．Ｒｕｏｓｌａｈｔｉ、Ｎａｔｕｒｅ　３０９：３０－３３、１９８４）。つまり、このＲＧＤ配列を有する合成ペプチドは、フィブロネクチンと細胞との相互作用を阻害する。

【００１２】

最近、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等の細胞外マトリックスに対するレセプターが免疫系の細胞で次々に同定され、Ｔ細胞の分化、リンパ球の移動（ホーミング）等に、これらの相互作用が重要であることが示唆されている。これらのレセプターは共通のサブユニット構造を持つことから、インテグリンスーパーファミリーと呼ばれ、ヒトＴ細胞に見つけられたＶＬＡ（ｖｅｒｙ　ｌａｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎｓ）もインテグリンスーパーファミリーの一つである。ＶＬＡ－５はＦＮＲと免疫学的に同等で、ＲＧＤペプチドによりフィブロネクチンとの結合が阻害される（Ｙ．Ｔａｋａｄａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　３２６：６０７－６０９、１９８７）。ＦＮＲ（ＶＬＡ－５）はラットの肥満細胞上や好塩基球上にも発現されており、そのリガンドであるフィブロネクチンと結合することにより、Ｉ型アレルギー反応における抗原－ＩｇＥ抗体－ＩｇＥレセプターを介したラットの肥満細胞や好塩基球のヒスタミン遊離反応を増幅している。（Ｍ．Ｍ．Ｈａｍａｗｙ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１４９：６１５－６２１、１９９２）。

【００１３】

しかしながら、肥満細胞上や好塩基球上、そしてＴ細胞上のＦＮＲ（ＶＬＡ－５）の生理的役割に関しては詳細には判っていないのが現状である。

【００１４】

また、スギ花粉については、その主要なアレルゲンであるＣｒｙｊ　Ｉ分子のアミノ酸配列が明らかにされている（ＷＯ９３／０１２１３）。しかし、このアミノ酸配列のうちのどの部分がいかなる役割をしているか等の詳細については全く判明していない。

【００１５】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、前記アレルギー反応の第２段階、すなわち感作細胞表面上における抗原の架橋現象による、ヒスタミン等の化学伝達物質の遊離を阻害することにより、従来とは異なった新たな作用機序を持つ医薬を提供することにある。

【００１６】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはラット培養肥満細胞膜上に見出されているＦＮＲ（ＶＬＡ－５）がヒト末梢血中の好塩基球細胞膜に存在するか否かについて検討し、これを見出した。更にこのＦＮＲ（ＶＬＡ－５）をＦＮＲ抗体を加えて細胞膜表面で架橋させると著しいヒスタミン遊離反応が起こることを見出した。この結果は、ＦＮＲ（ＶＬＡ－５）が直接的あるいは間接的に好塩基球のヒスタミン遊離反応に連携していることを明らかにしたものである。また、スギ花粉アレルゲンＣｒｙｊ
Ｉによりスギ花粉症患者好塩基球からのヒスタミン遊離反応が起こるが、この反応はＲＧＤＳ（ＲＧＤ）により強く阻害された。さらに、ダニアレルギー患者好塩基球にダニ粗抽出抗原を加えるとヒスタミン遊離反応が起こるが、ＲＧＤＳ（ＲＧＤ）ペプチドを加えると、この反応も強く阻害された。すなわち、ＲＧＤＳ（ＲＧＤ）ペプチドが、Ｃｒｙｊ

Ｉやダニアレルゲンに感受性のアレルギー患者の血液の肥満細胞や好塩基球からのヒスタミン遊離反応を強く阻害することから、ＲＧＤ（ＲＧＤＳ）ペプチドが抗アレルギー剤として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【００１７】

すなわち、本発明はＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）で示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするアレルギー疾患予防及び治療剤を提供するものである。また、本発明はＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）で示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするヒスタミン遊離抑制剤を提供するものである。

【００１８】

本発明に用いられるペプチドは、ＲＧＤで示されるアミノ酸配列を有するものであれば特に制限されないが、本発明の目的がアレルギー反応であることを考慮すれば、不必要な他の作用を有するアミノ酸配列を有さないことが望ましい。かかる観点から、より好ましいペプチドはＲＧＤ又はＲＧＤＳである。

【００１９】

本発明のＲＧＤペプチドは、通常のペプチド合成法、例えば固相ペプチド合成法によって製造することができる。

【００２０】

本発明のＲＧＤペプチドは、後述するようにスギ花粉アレルギー患者及びダニアレルギー患者血液からのそれぞれのアレルゲンによるヒスタミン遊離反応を強く抑制することから、Ｉ型アレルギー症の諸症状、例えば眼のかゆみや痛み等のアレルギー性結膜炎、鼻炎、皮膚炎、喘息等の予防及び治療に用いることができる。

【００２１】

本発明予防及び治療剤の投与方法は、特に制限されないが、アレルギー疾患の症状を呈している患者に投与する治療的投与法でもよいが、アレルギー症状を呈する前に、予め投与する予防的投与法でもよい。

【００２２】

本発明予防及び治療剤は、経口、非経口いずれの手段でも投与することができる。経口投与用の製剤としては、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤等が挙げられ、非経口投与用の製剤としては、注射剤、点鼻剤、点眼剤、経皮用剤等が挙げられる。これらの製剤を調製するにあたっては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤等の通常用いられる担体を用いることができる。

【００２３】

本発明予防及び治療剤の投与量は、投与時期、体重、年令、症状等により異なるが、通常ペプチドとして１～１０００㎎／kg／dayが好ましい。

【００２４】

【作用】

ＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）ペプチドの作用点は、前記アレルギー反応の第２段階、すなわち感作細胞表面上における抗原の架橋現象からヒスタミン等の化学伝達物質の遊離までの段階を阻害することによるが、その作用機序は大きく２つ考えられる。

一つは、アレルゲンタンパクのアミノ酸配列中にＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）配列を有する場合、ヒトの肥満細胞上や好塩基球上のＦＮＲ（ＶＬＡ－５）にＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）配列を介してアレルゲンが結合し、これらの細胞上でのアレルゲンによる架橋反応に寄与し、その結果、これらの細胞によるヒスタミン等の化学伝達物質の放出反応を起こす。つまり、感作状態が成立しているヒト肥満細胞や好塩基球と、ＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）配列を有するアレルゲンが接触した時、架橋反応が起こるためには、アレルゲン１分子に２箇所以上のＩｇＥとの結合部位が必要であるが、それとは別にアレルゲン分子中のＲＧＤ配列と細胞表面のＦＮＲ（ＶＬＡ－５）との結合と、更に１箇所以上のアレルゲンエピトープとＩｇＥとの結合による、ＦＮＲ（ＶＬＡ－５）とＩｇＥレセプターというヘテロなレセプターの組み合わせによる架橋反応が可能である。この系にＲＧＤペプチドが存在すると、このペプチドがＦＮＲ（ＶＬＡ－５）とアレルゲンとの結合を阻害する。

もう１つの作用機序は、ＦＮＲ（ＶＬＡ－５）が、細胞内のシグナル伝達機構において何らかの形で肥満細胞、あるいは好塩基球の脱顆粒反応に連携していて、ＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）ペプチドがＦＮＲ（ＶＬＡ－５）に結合することによって脱顆粒反応が阻害される可能性である。

【００２５】

従って、本発明のペプチドはアレルギー疾患の諸症状、つまりアレルギー性結膜炎、鼻炎、皮膚炎、喘息等の予防及び治療に有用である。

【００２６】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【００２７】

実施例１　Ｃｒｙｊ　Ｉの精製

スギ花粉は、静岡県及び神奈川県内で２月に伐採されたスギの枝に着花した雄花から採取し、－７０℃で保存した。Ｃｒｙｊ　Ｉは安枝等の方法（アレルギー、２９：７６３－７７２、１９８０）により、スギ花粉からＤＥ５２、ＣＭ５２（Ｗｈａｔｍａｎ）ゲルを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。

【００２８】

実施例２　ヒト好塩基球細胞膜上におけるＦＮＲ（ＶＬＡ－５）の存在

ラットの培養細胞ＲＢＬ－２Ｈ３は、肥満細胞と好塩基球のｉｎ　ｖｉｔｒｏのモデルとしてアレルギーの研究分野で広く使用される細胞で、この細胞膜上にＦＮＲ（ＶＬＡ－５）が存在することは既に確認されている（安田勝彦他、日本免疫学会学術集会記録　２１：５３０、１９９１；　Ｍ．Ｍ．Ｈａｍａｗｙ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１４９：６１５－６２１、１９９２；安田勝彦他、日本免疫学会学術集会記録　２２：３４６、１９９２）。

しかし、ヒトの好塩基球上にＦＮＲ（ＶＬＡ－５）が存在するかどうかは未だ証明されていない。本発明者らは、その存在についてヒスタミン遊離試験により検討した。

ヒスタミン遊離試験は、栄研化学（株）製のヒスタミンキット「栄研」を用いて行った。健常人の静脈血をヘパリン存在下に採血し、遊離試験用緩衝液にて２倍に希釈して９６穴Ｖ底プレートに５０μｌずつ入れ、燐酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．２（ＰＢＳ）を１００μｌをこれに加えた。更にヒツジ抗ヒトフィブロネクチン抗体（Ｔｈｅ　Ｂｉｎｄｉｎｇ　Ｓｉｔｅ　ＬＴＤ）溶液を、最終希釈率１／２０、１／２００、１／２，０００となるように５０μｌずつ加えた。コントロールとして、ヒツジ抗ヒトフィブロネクチン抗体（Ａｎｔｉ　ＦＮ　Ａｂ）の代わりにＰＢＳ５０μｌを加え陰性対照とした。なお、血漿中にフィブロネクチンは３０㎎／ｄｌ存在しており（以前は寒冷不溶性グロブリンと呼ばれていた。）、新たにこの実験系には加える必要がないために加えていない。３７℃で３０分間反応させた。反応終了後、１，５００ｒｐｍで５分間遠心分離を行い、その上清１００μｌ中のヒスタミン濃度を測定した。結果を図１に示す。

【００２９】

図１から明らかなように、陰性対照及び低濃度の抗体（Ａｎｔｉ－ＦＮ：１／２，０００、Ａｎｔｉ－ＦＮ：１／２００希釈）では、ヒスタミンの遊離はほとんど認められなかったが、１／２０の希釈率である高濃度の抗体（Ａｎｔｉ－ＦＮ；１／２０）によって著しいヒスタミンの遊離が認められた。これらの結果から、ラットの細胞と同様に、血液細胞の中で最もヒスタミンを含んでいる細胞であるヒト好塩基球にＦＮＲ（ＶＬＡ－５）が存在し、このレセプターを介して血漿フィブロネクチンが好塩基球と結合しており、かつそのフィブロネクチン－ＦＮＲ（ＶＬＡ－５）複合体を、ヒツジ抗ヒトフィブロネクチン抗体により細胞表面で架橋させることによって、ヒスタミンが遊離したものと考えられる。この事実は、肥満細胞や好塩基球でのヒスタミン遊離反応が、アレルゲン－ＩｇＥ－ＩｇＥレセプターによる架橋構造形成や、抗ＩｇＥレセプター抗体を添加することによって起こる架橋構造の形成、つまりＩｇＥレセプターを介した架橋反応が主要な経路であるとい

う従来の考え以外に、ＦＮＲ（ＶＬＡ－５）の架橋構造形成によってもヒスタミンの遊離が惹起されたことを示すと考えられる。

【００３０】

実験例３　Ｃｒｙｊ　Ｉによるスギ花粉症患者血液からのヒスタミン遊離反応

アレルギー患者の血液を用いて、これに該当するアレルゲンを加えることにより遊離するヒスタミン量を測定する方法は、患者のアレルゲンを同定するための鋭敏な検索方法である。しかし、遊離するヒスタミン量は、加えるアレルゲンに最適濃度があるため、高すぎても、低すぎても検出できないことがある。そのためにスギ花粉症患者を血液を用いて、ヒスタミン遊離反応におけるＣｒｙｊ　Ｉの最適濃度を検討した。スギ花粉症患者の静脈血をヘパリン存在下で採血し、種々の濃度のＣｒｙｊ　Ｉ存在下のヒスタミン遊離量を実施例２に準じて測定した。結果を図２に示す。

【００３１】

図２から明らかなように、ＰＢＳのみを加えたコントロールに比べ、ＣｒｙｊＩの加える濃度を増加させるに従いヒスタミン遊離量は増加し、５０μｇ／ml濃度では細胞の総ヒスタミン量の８３．２％を遊離した。従って、５０μｇ／mlのＣｒｙｊ　Ｉ濃度においてＲＧＤＳのペプチドによるヒスタミン遊離阻害実験を行った。

【００３２】

実験例４　Ｃｒｙｊ　ＩのヒスタミンＲＧＤＳペプチドによる阻害

実験例３と同様にスギ花粉症患者の静脈血をヘパリン存在下に採血後、遊離試験用緩衝液で２倍希釈して５０μｌずつ９６穴Ｖ底プレートに入れた。ＲＧＤＳペプチド（株式会社ペプチド研究所製）のＰＢＳ溶液を最終濃度０．１、０．３、１．０mg／mlになるように１００μｌずつ各穴に加え（コントロールとしてＰＢＳのみ１００μｌの系を作る）、更にＣｒｙｊ　Ｉを最終濃度５０μｇ／mlになるように５０μｌずつ加えて（コントロールとしてＰＢＳのみ５０μｌの系も作る）３７℃３０分間反応させた。反応終了後、１，５００ｒｐｍ５分間遠心分離を行い、上清１００μｌ中のヒスタミン遊離量を測定した。結果を図３に示す。

【００３３】

Ｃｒｙｊ　Ｉ非存在下、つまりＲＧＤＳペプチド単独では、０．１mg／mlから１．０mg／mlの範囲でほとんどヒスタミンの遊離は認められなかった。一方、Ｃｒｙｊ　Ｉ存在下ではＲＧＤＳペプチド濃度の増加に従ってヒスタミン遊離が抑制され、ＲＧＤＳペプチド１．０mg／ml濃度では、ペプチド非添加の系（ＰＢＳのみ加えた系）に比べ、約６０％の抑制率を示した。

【００３４】

実施例５　ＲＧＤＳペプチドとＲＧＤペプチドの活性比較

実施例４と同様にスギ花粉症患者の静脈血を用いてＲＧＤＳペプチドとＲＧＤペプチドのヒスタミン遊離反応に対する阻害活性を比較検討した。実験方法は実施例４と同様に行った。結果を図４に示す。

【００３５】

Ｃｒｙｊ　Ｉ非存在下では、ＲＧＤＳペプチドもＲＧＤペプチドも０．１mg／mlから３．０mg／mlの範囲でほとんどヒスタミンの遊離は認められなかった。一方、ＲＧＤＳペプチドとＲＧＤペプチドによるヒスタミン遊離の阻害効果はほぼ同じ値を示し、両者ともに有効であった。

【００３６】

実施例６　ダニアレルギー患者血液でのＲＧＤペプチドによるヒスタミン遊離反応阻害

ダニアレルゲンとスギアレルゲンの両者のアレルゲンに対してそれぞれＲＡＳＴ値４以上の陽性患者静脈血をヘパリン存在下に採血し、実施例５と同様にしてＣｒｙｊ　Ｉ５０μｇ/ml、あるいはヤケヒョウヒダニの虫体をＰＢＳによって抽出した粗抽出溶液（ＭＢＥ）０．１μｇ／ml（実施例３と同様にして、至適なＭＢＥ濃度を決定した。）存在下にそれぞれのアレルゲンでのＲＧＤペプチドの特異性を検討した。両者のアレルゲンに対して陽性患者であるので、ＲＧＤペプチド非存在下で、Ｃｒｙｊ　Ｉ単独、あるいはＭＢＥ単

独でヒスタミン遊離反応が生じた（図５）。これにＲＧＤペプチドを加えると、Ｃｒｙｊ　Ｉ、ＭＢＥ共にＲＧＤペプチド１．０mg／mlでほぼ定量的にヒスタミン遊離を抑制した。したがって、ＲＧＤペプチドはスギ花粉症患者及びダニアレルギー患者のいすれにも有効である。

【００３７】

実施例７　抗ＩｇＥ抗体によるヒスタミン遊離反応でのＲＧＤペプチドの阻害効果

スギアレルゲンに対してＲＡＳＴ値１の陽性患者血清静脈血をヘパリン存在下に採血し、実施例６と同様にして抗ＩｇＥ抗体（マウス抗ヒトＩｇＥモノクローナル抗体；Pierce社製）２．５μｇ／ml（実施例３と同様にして、至適な抗ＩｇＥ抗体濃度を決定した。）存在下にＲＧＤペプチドの阻害効果を検討した（図６）。

【００３８】

抗ＩｇＥ抗体によるヒスタミン遊離試験は、好塩基球表面でＩｇＥレセプターに結合している患者ＩｇＥ抗体を、抗ＩｇＥ抗体によって架橋させることによってヒスタミンを遊離させる反応である。この抗ＩｇＥ抗体によるヒスタミン遊離反応は、種々のアレルゲンでのヒスタミン遊離反応と同様に、ＩｇＥレセプターの架橋によって生ずる反応であることから、種々のアレルゲンを代表したヒスタミン遊離反応として実験に汎用されている。この結果、ＲＧＤペプチド非存在下での抗ＩｇＥ抗体によって遊離するヒスタミン量を１００％とすると、ＲＧＤ濃度、０．３、１、３ mg／mlとＲＧＤ濃度が増加するにつれてヒスタミン遊離量が阻害された。この結果から、ＲＧＤペプチドによるヒスタミン遊離反応の阻害は、各種のアレルゲンに対して有効であると言える。

【００３９】

【発明の効果】

本発明のＲＧＤ（又はＲＧＤＳ）ペプチドは、各種アレルゲンに対して感受性のあるアレルギー患者の肥満細胞や好塩基球からのヒスタミン遊離を濃度依存性に阻害するので、抗アレルギー剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図１】抗フィブロネクチン抗体によるヒト好塩基球からのヒスタミン遊離反応を示す図である。

【図２】スギ花粉アレルゲンＣｒｙｊ　Ｉによるヒト好塩基球からのヒスタミン遊離反応を示す図である。

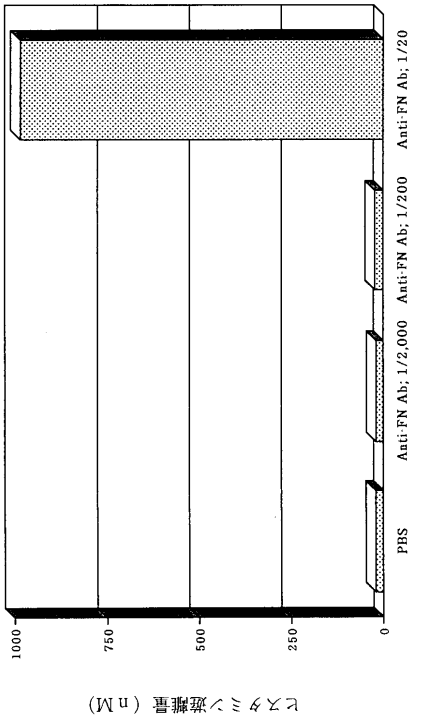
【図３】スギ花粉アレルゲンＣｒｙｊ　Ｉによるヒト好塩基球からのヒスタミン遊離に対するＲＧＤＳペプチドの阻害作用を示す図である。

【図４】スギ花粉アレルゲンＣｒｙｊ　Ｉによるヒト好塩基球からのヒスタミン遊離に対するＲＧＤＳテトラペプチドとＲＧＤトリペプチドの阻害作用とを比較する図である。

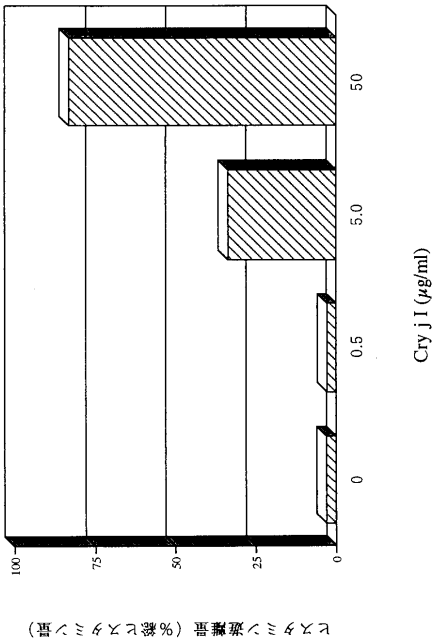
【図５】スギ花粉アレルゲンとダニアレルゲンの両者に陽性である患者好塩基球からの、Ｃｒｙｊ　Ｉ、ダニ虫体抽出物アレルゲン（ＭＢＥ）、それぞれのアレルゲンによるヒスタミン遊離に対するＲＧＤペプチドの阻害作用を示す図である。

【図６】抗ＩｇＥ抗体によるヒスタミン遊離反応でのＲＧＤペプチドの阻害効果を示す図である。

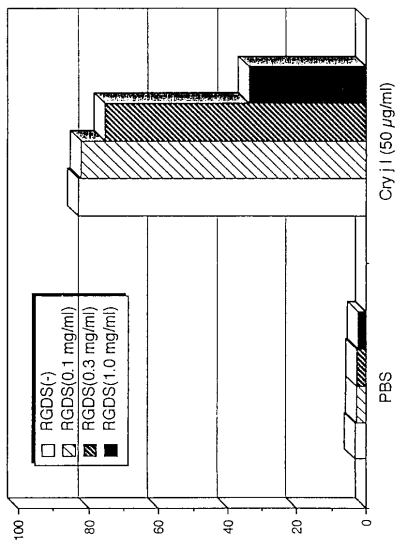
【図１】


PBS
Anti-FN Ab; 1/2,000
Anti-FN Ab; 1/200
Anti-FN Ab; 1/20
0
250
500
750
1000
ヒスタミン遊離量（nM）

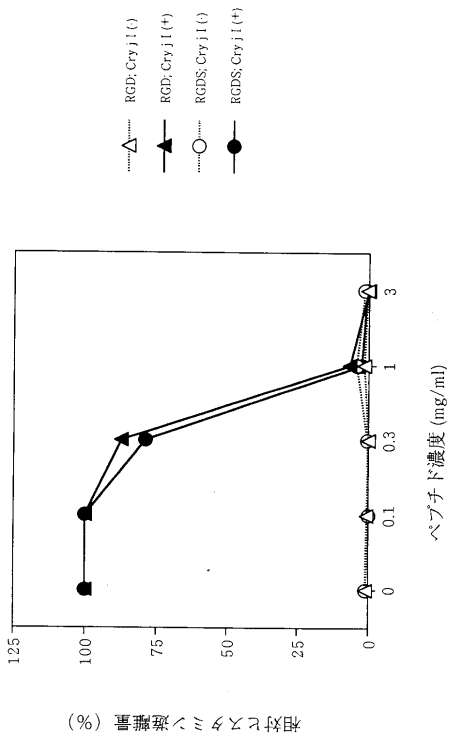
【図２】


0
0.5
5.0
50
Cry j I (μg/ml)
0
25
50
75
100
ヒスタミン遊離量（%総ヒスタミン量）

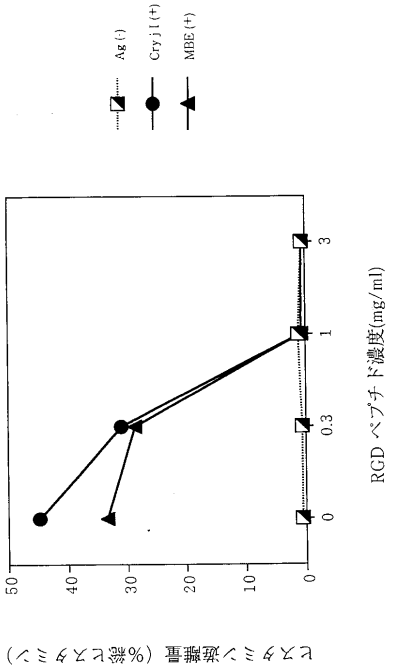
【図３】


RGDS(-)
RGDS(0.1 mg/ml)
RGDS(0.3 mg/ml)
RGDS(1.0 mg/ml)
PBS
Cry j I (50 μg/ml)
0
20
40
60
80
100
ヒスタミン遊離量（%総ヒスタミン量）

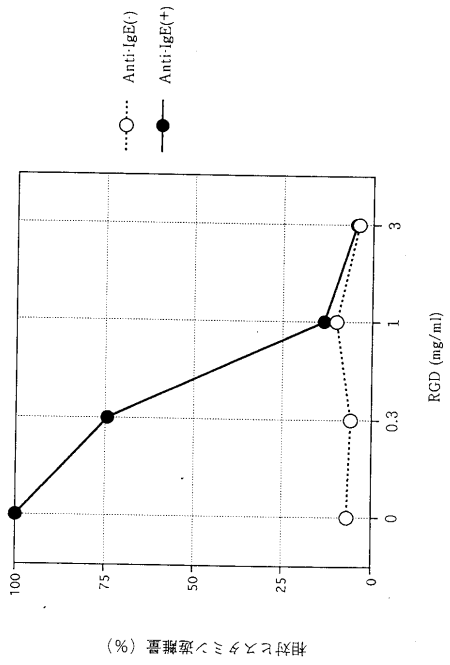
【図４】


RGD; Cry j I (-)
RGD; Cry j I (+)
RGDS; Cry j I (-)
RGDS; Cry j I (+)
0
0.1
0.3
1
3
ペプチド濃度 (mg/ml)
0
25
50
75
100
125
相対ヒスタミン遊離量（%）

【図５】


Ag(-)
Cryj1(+)
MBE(+)
0
10
20
30
40
50
0
0.3
1
3
ヒスタミン遊離量（%総ヒスタミン）
RGDペプチド濃度(mg/ml)

【図６】


Anti-IgE(-)
Anti-IgE(+)
0
25
50
75
100
0
0.3
1
3
相対ヒスタミン遊離量（%）
RGD (mg/ml)

フロントページの続き

(72)発明者　紀　光助
神奈川県小田原市成田５４０番地　明治乳業ヘルスサイエンス研究所内

審査官　川口　裕美子

(56)参考文献　HAMAWY MM et al, J Immunol, １９９２年, Vol.149, No.2, p.615-21

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 38/00
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/EMBASE(STN)
JMedPlus(JOIS)