

論 文 内 容 要 旨

Amplified luminescence proximity homogeneous
assay 法を用いた自己免疫性蕁麻疹の新規検査法の
開発

主指導教員：松尾 裕彰教授

(広島大学病院 病院薬剤学)

副指導教員：森川 則文教授

(医系科学研究科 臨床薬物治療学)

副指導教員：横大路 智治准教授

(医系科学研究科 薬物療法開発学)

古賀 祐基

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景・目的】

自己免疫性蕁麻疹 (aiCSU) 患者の多くは IgE 抗体や高親和性 IgE 受容体 α サブユニット (Fc ϵ RI α) に対する IgG 自己抗体を有している。現在、aiCSU は自己血清皮内テスト (ASST) やヒスタミン遊離試験 (HRT) の結果をもとに診断されている。しかし、ASST はしばしば偽陽性が認められる、HRT は検査に健常者の好塩基球を必要とするなど汎用性に欠点がある。また、ELISA 法などの免疫学的検査法は、ヒスタミン遊離活性を有していない自己抗体が検出されるため、aiCSU 診断の特異度は低い。本研究では、簡便かつ高精度な自己免疫性蕁麻疹の新規検査法を開発することを目的として、Fc ϵ RI α または IgE 抗体で標識した amplified luminescence proximity homogeneous assay ビーズを用い、Fc ϵ RI 受容体架橋能を有する自己抗体を検出する方法 (AlphaCL 法) を構築し、その有用性を評価した。

【方法】

ASST または HRT で陽性を示した aiCSU 患者 21 名の血清を用いた。また、コントロールとして健常者 9 名の血清を用いた。HRT は、2 名の健常者末梢血から得られた好塩基球を用いて実施した。未処理および乳酸処理により IgE を除去した好塩基球に患者血清を添加し、37°C で 40 分間反応させた際に、上清中に遊離および細胞に残存したヒスタミン量を HPLC で測定した。各ヒスタミン量からヒスタミン遊離率を算出し、遊離率が 5% 以上を陽性とした。本研究では、乳酸処理した好塩基球からのヒスタミン遊離率が未処理の遊離率より高い場合を抗 Fc ϵ RI α 自己抗体型と定義した。AlphaCL による抗 Fc ϵ RI α 自己抗体の検出は、リコンビナントヒト Fc ϵ RI α で標識したアクセプタービーズ (終濃度 20 μ g/mL) およびドナービーズ (5 μ g/mL) を用い、4% に希釈した血清と室温・遮光下で 1 時間反応させた。また、抗 IgE 自己抗体の検出では、ヒト IgE で標識したアクセプタービーズとドナービーズ (両終濃度 20 μ g/mL) を 1% の血清と室温・遮光下で 24 時間反応させた。反応終了後、EnspireTM マルチモードプレートリーダーで発光強度 (励起波長, 680 nm; 検出波長, 615 nm) を測定した。

【結果・考察】

HRT の結果、21 名の aiCSU 患者のうち、抗 Fc ϵ RI α 自己抗体型の患者は 9 名、抗 IgE 自己抗体型の患者は 4 名、どちらにも陰性を示した患者は 8 名だった。AlphaCL を用いて、aiCSU 患者血清中の抗 Fc ϵ RI α 自己抗体を検出した結果、健常者血清ではシグナルが検出されなかったが、患者血清では 21 名のうち 13 名 (61.9%) で蛍光シグナルが検出された。このとき、抗 Fc ϵ RI α 自己抗体に対する HRT で陽性を示した患者 9 名のうち 7 名 (77.8%) でシグナルが検出された。一方、HRT 陰性患者 12 名のうち 6 名でもシグナルが検出された。HRT 陽性患者における AlphaCL のシグナル値 (平均 \pm 標準偏差, 7,053 \pm 12,510 counts) は、陰性患者 (291 \pm 472 counts) よりも高い傾向を示した ($P=0.07$)。以上の結果から、AlphaCL は HRT で検出できなかった抗 Fc ϵ RI α 自己抗体も検出できる可能性が示唆された。今後、さらに検体数を増やして AlphaCL の感度や特異度、カットオフ値を定める必要がある。次に、AlphaCL を用いて、aiCSU 患者血清中の抗 IgE 自己抗体を検出した結果、健常者血清ではシグナルは検出されなかったが、患者血清では 21 名のうち 3 名 (14.2%) でシグナルが検出された。このとき、抗 IgE 自己抗体

に対する HRT で陽性を示した患者 4 名のうち 2 名 (50%) でシグナルが検出された。HRT 陽性患者における AlphaCL のシグナル値 ($1,042 \pm 1,212$ counts) は、陰性患者 (159 ± 655 counts) よりも高い傾向を示した ($P = 0.05$)。本研究では、AlphaCL による抗 IgE 自己抗体の検出感度は抗 FcεRIα 自己抗体の検出感度よりも低かった。その要因として、血清タンパク質が抗 IgE 自己抗体の IgE 抗体への結合を阻害している可能性が考えられる。今後、血清タンパク質を除去するなどの方法で検出感度を向上させる必要があると考えられる。

【結論】

本研究では、aiCSU 患者の血清中に含まれる抗原架橋能を有する自己抗体を検出する新規検査法 (AlphaCL) の開発に成功した。AlphaCL による抗 FcεRIα と抗 IgE 自己抗体の検出感度 (15/21, 71.4%) は HRT (13/21, 61.9%) よりも高く、簡易的かつ実用的な検査法である。本研究の成果は今後、aiCSU 患者の新しい診断法に応用が期待できる。