

博士論文

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

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

病院薬剤学研究室

平成 30 年度入学 古賀 祐基

主指導教員 松尾 裕彰

# 目次

序論.....	1
本論.....	6
第1章 抗 FcεRIα 自己抗体に対する AlphaCL 法の構築およびその有用性の評価 .....	6
第1節 ELISA 法および HRT による抗 FcεRIα 自己抗体の検出.....	7
1-1. 緒言 .....	7
1-2. 結果 .....	7
1-3. 考察 .....	11
第2節 AlphaCL 法による抗 FcεRIα 自己抗体の検出条件の最適化.....	12
2-1. 緒言 .....	12
2-2. 結果 .....	12
2-3. 考察 .....	15
第3節 AlphaCL 法による血清中抗 FcεRIα 自己抗体の検出.....	17
3-1. 緒言 .....	17
3-2. 結果 .....	17
3-3. 考察 .....	18
第4節 小括 .....	20
第2章 抗 IgE 自己抗体に対する AlphaCL 法の構築およびその有用性の評価 .....	22
第1節 ELISA 法および HRT による抗 IgE 自己抗体の検出 .....	23
1-1. 緒言 .....	23
1-2. 結果 .....	23
1-3. 考察 .....	24
第2節 AlphaCL 法による抗 IgE 自己抗体の検出条件の最適化.....	25
2-1. 緒言 .....	25
2-2. 結果 .....	25
2-3. 考察 .....	28
第3節 AlphaCL 法による血清中抗 IgE 自己抗体の検出.....	30
3-1. 緒言 .....	30
3-2. 結果 .....	30
3-3. 考察 .....	31
第4節 小括 .....	33
結論.....	35
実験の部 .....	36
論文目録 .....	47
参考文献 .....	48
謝辞.....	54

## 略語一覽

AAbs	autoantibodies
Abs	antibodies
aiCSU	autoimmune chronic spontaneous urticaria
Alpha	amplified luminescence proximity homogeneous assay
AlphaCL	Alpha involving cross-linking
ASST	autologous serum skin test
AU	absorbance unit
BAT	basophil activation test
CSU	chronic spontaneous urticaria
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine N, N, N', N' –tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPO	eosinophil peroxidase
EXiLE	IgE crosslinking-induced luciferase expression
FBS	fetal bovine serum
FcεRIα	high-affinity IgE receptor I α chain
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMC	human mast cell
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HRT	histamine releasing test
HSA	human serum albumin

Ig	immunoglobulin
IU	international unit
mAb	monoclonal antibody
MBP	major basic protein
N.D.	not detected
nhIgE	native human IgE
N.P.	not performed
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
no.	number
nos.	numbers
O.D.	optical density
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline Tween-20
pH	potential Hydrogen, power of Hydrogen
SD	standard deviation
Tween-20	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UAS	urticaria activity score
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

# 序論

蕁麻疹は、膨疹や浮腫が出現する皮膚の疾患であり、多くの場合は痒みを伴う。蕁麻疹に合併もしくは単独で起こる、皮膚を中心とした限局性の浮腫は血管性浮腫と呼ばれる。蕁麻疹の発症には皮膚マスト細胞の脱顆粒が関与すると考えられており、組織間隙に放出されたヒスタミンなどの化学伝達物質が皮膚微小血管や神経に作用し、膨疹や痒みなどが惹起される。

蕁麻疹は、発症の機序や膨疹の誘発因子、臨床上の特徴が多岐にわたることから、複数の病型に分類される (Table 1) [1,2]。特に immunoglobulin E (IgE) 抗体の関与で起こる I 型アレルギーは、蕁麻疹の主な発症機序として知られている。I 型アレルギーでは、マスト細胞や好塩基球の細胞膜上に発現する高親和性 IgE 受容体  $\alpha$  サブユニット (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) に IgE 抗体が結合し、そこに抗原が 2 つの IgE 抗体を架橋するように結合することで細胞が活性化され、症状が出現すると考えられている。一方、I 型アレルギー以外にアスピリンなどの薬剤の使用や運動負荷、寒暖差などを原因とする刺激誘発型の蕁麻疹や、明らかな原因が分からず痒みや膨疹が繰り返し出現する特発性の蕁麻疹などがある (Table 2) [1,2]。

Table 1. Subtypes of urticaria. [1,2]

<b>I. Spontaneous urticaria</b>
1. Acute spontaneous urticaria
2. Chronic spontaneous urticaria
<b>II. Inducible urticaria</b>
1. Allergic urticaria
2. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis
3. non-allergic urticaria
4. Aspirin-induced urticaria
5. Physical urticaria (mechanical urticaria cold urticaria solar urticaria, heat urticaria delayed pressure urticaria aquagenic urticaria)
6. Cholinergic urticaria
7. Contact urticaria
<b>III. Angioedema</b>
1. Idiopathic angioedema
2. Inducible angioedema
3. Bradykinin mediated angioedema
4. Hereditary angioedema (HAE)
<b>IV. Urticaria associated diseases</b>
1. Urticarial vasculitis
2. Urticaria pigmentosa
3. Schnitzler's syndrome and Cryopirin-associated periodic fever (CAPS)

Table 2. Factors associated with the pathogenesis of urticaria. [1,2]

**I. Direct triggers (mainly exogenous and transient)**

1. Exogenous antigens
2. Physical stimuli
3. Sweating
4. Foods  
Food antigens, food histamine, pseudo-allergens (pork, bamboo shoot, rice cake, spices, etc.), food additives (preservatives, artificial pigment), salicylic acids
5. Drugs  
Antigens, contrast media, NSAIDs, preservatives, succinic acid esters, vancomycin (red man syndrome), etc.
6. Exercises

**II. Background factors (mainly endogenous and continuous)**

1. Sensitization (specific IgE)
2. Infections
3. Tiredness/stress
4. Foods, except for antigens
5. Drugs  
Aspirin, other NSAIDs (for FDEIA), angiotensin converting enzymes (ACE) inhibitors (for angioedema), etc.
6. Autoantibodies against IgE or the high affinity IgE receptors
7. Underlying disease  
Collagen and related disease (SLE, Sjögren's syndrome, etc.), lympho-proliferating diseases, hereditary disorders (e.g. C1-INH deficiency), serum sickness, other organ dysfunctions, circadian rhythm (idiopathic urticaria tends to aggravate from evening toward morning)

特発性蕁麻疹は、全蕁麻疹患者の約7割を占め、その症状が6週間以上続く場合は慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticaria) に分類される (Fig. 1) [2-4]。慢性特発性蕁麻疹の発症機序は未だ完全には解明されていないが、発症の一因として自己抗体が関与することが明かにされている [5-7]。

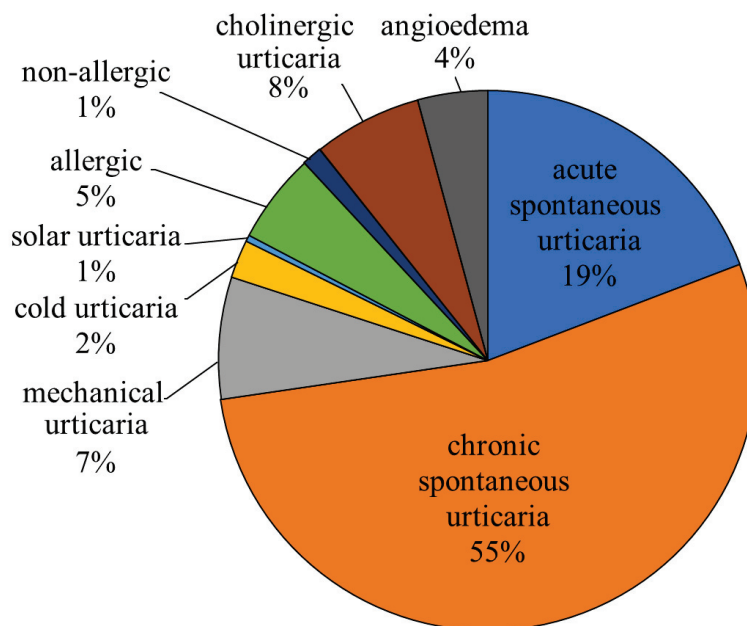


Fig. 1. Ratio of urticaria subtypes. [3]

自己抗体を介した反応によって惹起される慢性特発性蕁麻疹は、自己免疫性蕁麻疹 (autoimmune chronic spontaneous urticaria: aiCSU) と定義され、自己抗体のクラスの違いにより I 型および IIb 型の 2 つのエンドタイプに分類される [8]。I 型患者の場合、自己抗原に対する IgE 自己抗体が原因と考えられており、自己抗原として甲状腺ペルオキシダーゼ [9–12]、二本鎖 DNA [12,13]、インターロイキン-24 [11,14,15]、組織因子 [16] およびサイログロブリン [11] などが挙げられる。一方、IIb 型患者の場合は、マスト細胞や好塩基球上の FcεRIα やそれに結合した IgE に対する IgG 自己抗体が原因と考えられる。慢性蕁麻疹患者のうち、0–69%の患者が IgE 抗体に対する IgG 自己抗体を有し、4–64%の患者が FcεRIα に対する IgG 自己抗体を有することが報告されている [8]。抗 IgE 自己 IgG 抗体は、マスト細胞や好塩基球上の FcεRIα に結合した IgE 抗体と結合することで 2 分子以上の FcεRIα を架橋し、脱顆粒を起こす (Fig. 2) [7,17–20]。また、抗 FcεRIα 自己 IgG 抗体は、FcεRIα を直接架橋することで、脱顆粒を引き起こす (Fig. 2) [7,17–20]。

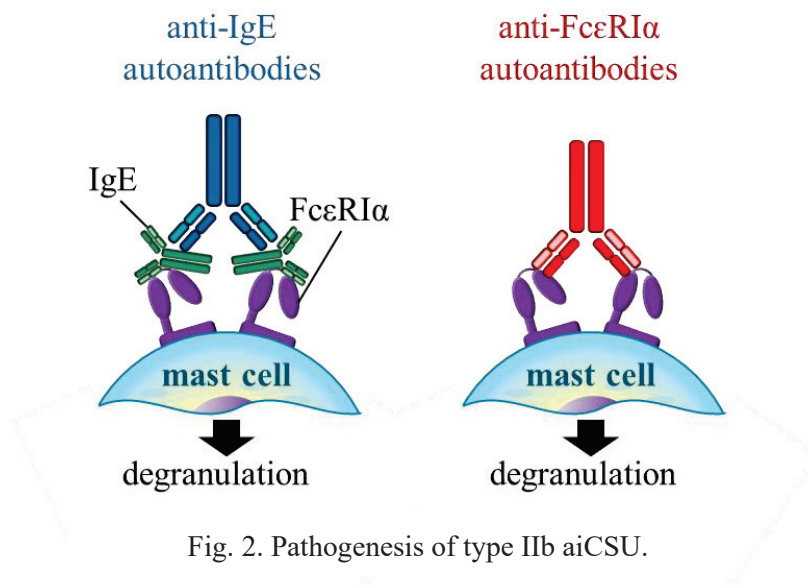


Fig. 2. Pathogenesis of type IIb aiCSU.

特発性蕁麻疹患者において、自己抗体の関与を調べる場合は、IIb 型のスクリーニングとして血清中の抗 FcεRIα および抗 IgE 自己抗体の検出が推奨される。自己抗体のスクリーニング法として、臨床的には自己血清皮内テスト (ASST) が実施されている。ASST は患者の血清を自身の皮内に注射し、一定時間後に出現した紅斑や膨疹の大きさを陽性対照 (ヒスタミン) や陰性対照 (生理食塩液) と比較する検査法である。反応の大きさが基準値以上であれば陽性と判定され、自己免疫性蕁麻疹の疑いと診断される。ASST は簡便かつ多くの施設で実施が可能であるが、血清中のブラジキニン [21] や C5a [22]、β-ヘキソサミニダーゼ放出活性を有する低分子量マスト細胞活性化因子 [23] などの自己抗体以外の因子がヒスタミン遊離活性を惹起し、しばしば偽陽性が認められる場合がある。ASST 陽性者には、さらにヒスタミン遊離試験 (HRT) が実施される。HRT は健常者の末梢血から分離した好塩基球に、患者の血清を添加した際に遊離されるヒスタミン量を測定する検査法である。HRT でヒスタミンの遊離が確認された場合、その血清中に抗 IgE 自己抗体または抗 FcεRIα 自己抗体が存在していると判断され、被験者は自己免疫性蕁麻疹と診断される。しかし HRT の実施には、健常者ドナーの好塩基球が必要である点や、好塩基球の反応性にドナー間で差があり結果にばらつきが生じるなど、判断基準の普遍性に欠ける点などが問題である [7,24]。また、遊離ヒスタミンや残存ヒスタミンの測定には、専用の設備が必要な点やその操作の煩雑性から実施可能な施設に限られるなどの問題点もある。近年では、遊離ヒスタミンではなく、フローサイトメトリー法を用いて好塩基球活性化マーカーである CD63 や CD203c の細胞表面発現率を測定する好塩基球活性化試験 (BAT) の臨床応用も検討されている [25]。しかし BAT も HRT と同様にドナー好塩基球を用いるため、健常者ドナー好塩基球の反応性の差が検査結果に影響する点が問題である。これらの問題を解決するために、ラットマスト細胞株にヒトの FcεRI 遺伝子と NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells) 依存的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株 (RS-ATL8 細胞) に、患者の血清より精製した IgG 抗体を添加し FcεRIα 架橋能を検出する IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法も報告されている [24]。しかし、EXiLE 法は細胞の管理や操作の煩雑さ、また実施可能な施設が限定されるなどの問題が挙げられる。好塩基球や細胞株を用いたヒスタミン遊離や活性化マーカー、FcεRIα 架橋能の測定法に加えて、免疫ブロット法や ELISA 法などの免疫学的検査法を用いた血清中自己抗体の検出が試みられている [26–28]。



しかし免疫学的検査法では、FcεRIα 架橋能を有する自己抗体と有しない自己抗体とを区別できないため、IIb 型患者の診断における特異度は低いと報告されている [29–31]。

このような背景から、臨床では FcεRIα の架橋能を有する自己抗体のみを検出することができる、簡便で特異度の高い検査法が望まれている。本研究ではこれらの条件を満たした自己免疫性蕁麻疹の新しい検査法の開発を目標に、amplified luminescence proximity homogeneous assay (Alpha) 法を用いた血清中自己抗体の検出法の開発を試みた。Alpha 法は、ドナービーズとアクセプタービーズの2種類のビーズを用い、生体サンプル中の分子間相互作用を検出するアッセイ法である [32,33]。本アッセイは、各ビーズに結合したタンパク質間で相互作用が生じた場合、ドナーおよびアクセプタービーズが互いに近接する。このとき、ドナービーズに 680 nm の励起光を照射することで一重項酸素が発生する。近接したアクセプタービーズが発生した一重項酸素と反応することで、615 nm の発光エネルギーを生じる。この発光強度を測定することで、タンパク質間相互作用の定量的な評価が可能である。本研究ではこの原理を応用し、ドナーおよびアクセプタービーズの両方に FcεRIα タンパク質または IgE 抗体を標識し、患者血清と反応させる。患者血清中に抗 FcεRIα または抗 IgE 自己抗体が含まれている場合、自己抗体は両ビーズ上のタンパク質を架橋するように結合し、ビーズ同士を近接させる。この時の発光強度を測定することで、患者血清中に自己抗体が含まれているか評価することができる。この Alpha 法を用いて架橋結合を検出する検査法を、AlphaCL 法 (Alpha involving Cross-Linking) と命名した (Fig. 3)。本研究では、患者血清中から自己抗体を検出できる AlphaCL 法を構築し、従来の検査法と比較しその有用性を評価した。

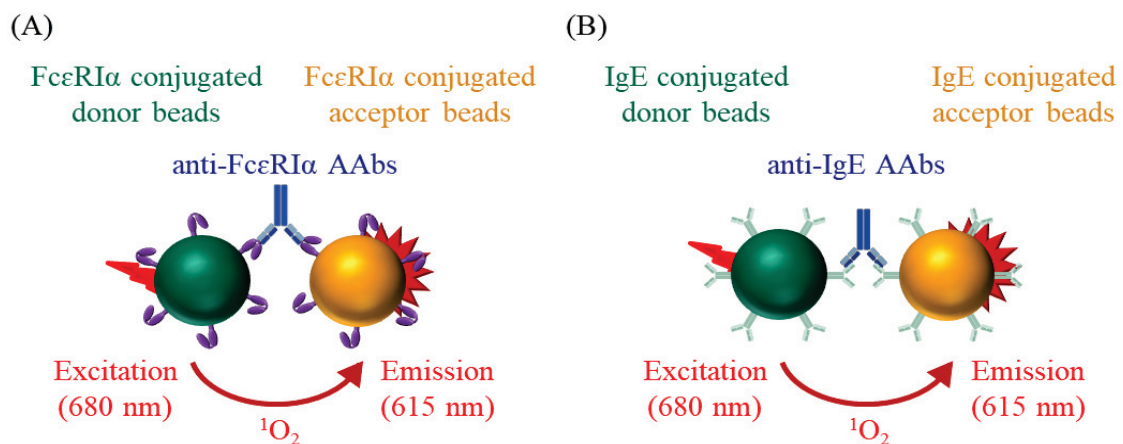


Fig. 3. The principles of AlphaCL to detect anti-FcεRIα (A) and anti-IgE autoantibodies (B).

# 本論

## 第1章 抗 FcεRIα 自己抗体に対する AlphaCL 法の構築およびその有用性の評価

慢性蕁麻疹患者の 4-64%が抗 FcεRIα 自己抗体を保有していると報告されている [8]。慢性特発性蕁麻疹患者において、自己抗体を検出することは、治療方針を決定するための指標となる。例えば、自己抗体の検出により自己免疫性蕁麻疹であることが裏付けられた場合には、シクロスポリンを用いた免疫学的治療を試みる一つの指標となる [2]。また、ヒト化抗 IgE モノクローナル抗体であるオマリズマブは、血中のフリーの IgE 抗体に結合し FcεRIα への IgE 抗体の結合を抑制したり、好塩基球表面上の FcεRIα の発現量を減少させたりする作用により、自己抗体による蕁麻疹症状の誘発を抑制すると考えられている [34,35]。したがって、抗 FcεRIα や抗 IgE 自己抗体の検出は、オマリズマブの使用を検討する判断材料になる。しかし序論で述べた通り、現在実施されている自己抗体の検出法は健常者ドナーの必要性や特異度の低さが問題点として挙げられる。

本章では、FcεRIα 標識ビーズに患者血清を添加する方法により抗 FcεRIα 自己抗体に対する AlphaCL 法を構築し、従来の検査法である ELISA 法や HRT と比較することで、その有用性を評価した。

## 第1節 ELISA 法および HRT による抗 FcεRIα 自己抗体の検出

### 1-1. 緒言

本節では、AlphaCL 法の比較対象とするために、従来の検査法である ELISA 法および HRT により患者血清中の抗 FcεRIα 自己抗体を検出した。また ELISA 法による抗 FcεRIα 自己抗体価 (吸光度 450 nm) と HRT によるヒスタミン遊離率との相関の有無を解析した。

抗体に認識される抗原の結合部位はエピトープと呼ばれ、連続するアミノ酸配列を認識する線形エピトープと、立体構造によって近接したアミノ酸を認識する構造的エピトープに分類される。患者血清中の抗 FcεRIα 自己抗体がどちらのエピトープを認識するかは不明であるため、本研究では変性処理を行うことなくタンパク質間の結合を解析することができる ELISA 法により、FcεRIα と血清中抗 FcεRIα 自己 IgG 抗体との結合を解析した。

HRT では、FcεRIα の IgE 占有率が高いドナー好塩基球と低いドナー好塩基球を別々に血清と反応させる方法により、患者血清中に抗 FcεRIα 自己抗体と抗 IgE 自己抗体のどちらの自己抗体が含まれているのかを鑑別することができる [36]。また好塩基球上で FcεRIα と結合している IgE 抗体は、乳酸処理により除去することができる [5]。すなわち、乳酸処理したドナー好塩基球に被験者の血清を添加した際、未処理の好塩基球を用いた場合よりも高いヒスタミン遊離率が認められれば、抗 FcεRIα 自己抗体を保有すると判断できる [5,36]。本節では、HRT により血清中抗 FcεRIα 自己抗体と抗 IgE 自己抗体の検出を試みた。なお、本研究では、ヒスタミン遊離率が 5%以上を陽性と判定した。また、抗 FcεRIα 自己抗体は IgE 除去の有無に関わらずヒスタミン遊離を惹起するため、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からの遊離率より高い場合を抗 FcεRIα 自己抗体型、未処理の好塩基球からのヒスタミン遊離率が乳酸処理からの遊離率より高い場合を抗 IgE 自己抗体型と定義した。

### 1-2. 結果

本実験では、ASST または HRT で陽性を示した自己免疫性蕁麻疹患者 21 名および健常者 9 名の血清を用いた。患者の年齢、性別、ASST、HRT および ELISA 法の結果を Table 3 に示す。

HRTの結果、抗 FcεRIα 自己抗体型の患者は 21 名中 9 名 (nos. 1–9)、抗 IgE 自己抗体型の患者は 4 名 (nos. 10–13)、どちらも陰性を示した患者は 8 名であった (nos. 14–21) (Table 3 および Fig. 4)。

ELISA 法により抗 FcεRIα 自己 IgG 抗体価を測定した結果、自己免疫性蕁麻疹患者および健常者ともに吸光度が増加し、両群間での有意な差は認められなかった (平均 ± 標準偏差; 患者群  $0.16 \pm 0.13$  AU, 健常者群  $0.14 \pm 0.07$  AU;  $P = 0.796$ ) (Table 3, Fig. 4)。また、ELISA 法で得られた吸光度と HRT によるヒスタミン遊離率との間に有意な相関は認められなかった (Fig. 5)。

Table 3. Characteristics of aiCSU patients

No.	Age (years)	Gender	ASST	HRT (%)		ELISA (Absorbance)	
				Lactic acid treated	Lactic acid untreated	anti-FcεRIα IgG	anti-IgE IgG
Patients							
1	66	F	Positive	71.0 <sup>†</sup>	18.0 <sup>†</sup>	0.06	0.18
2	77	F	Positive	66.2 <sup>‡</sup>	21.6 <sup>‡</sup>	0.11	1.24
3	38	F	Negative	17.5 <sup>§</sup>	0.4 <sup>§</sup>	0.10	0.41
4	42	F	Positive	45.4 <sup>¶</sup>	30.4 <sup>¶</sup>	0.41	0.83
5	70	F	N.P.	38.3 <sup>#</sup>	28.9 <sup>#</sup>	0.09	0.18
6	59	F	Positive	35.4 <sup>‡</sup>	5.8 <sup>‡</sup>	0.02	0.08
7	66	F	Negative	10.7 <sup>‡</sup>	3.5 <sup>‡</sup>	0.14	0.23
8	38	F	Negative	8.5 <sup>‡</sup>	0 <sup>‡</sup>	0.33	1.57
9	48	F	Negative	7.1 <sup>‡</sup>	0 <sup>‡</sup>	0.15	0.73
10	58	M	Positive	0 <sup>†</sup>	27.0 <sup>†</sup>	0.12	0.52
11	76	F	Positive	0 <sup>§</sup>	43.2 <sup>§</sup>	0.18	1.32
12	53	F	Positive	0 <sup>§</sup>	15.2 <sup>§</sup>	0.07	0.13
13	73	M	Positive	6.4 <sup>‡</sup>	33.0 <sup>‡</sup>	0.24	0.38
14	32	F	Positive	0 <sup>§</sup>	3.1 <sup>§</sup>	0.23	0.17
15	38	F	Positive	1.2 <sup>§</sup>	3.0 <sup>§</sup>	0.05	0.13
16	69	F	Positive	1.6 <sup>§</sup>	1.5 <sup>§</sup>	0.18	0.17
17	45	M	Positive	0.5 <sup>§</sup>	0.3 <sup>§</sup>	0.23	0.18
18	30	F	Positive	0.6 <sup>§</sup>	0 <sup>§</sup>	0.18	0.43
19	40	M	Positive	0 <sup>‡</sup>	0 <sup>‡</sup>	0.20	0.53
20	50	F	Positive	0 <sup>‡</sup>	0 <sup>‡</sup>	0.18	0.14
21	53	F	Positive	0 <sup>‡</sup>	0 <sup>‡</sup>	0.20	1.20
Healthy subjects							
1	-	-	-	-	-	0.22	0.15
2	-	-	-	-	-	0.13	0.28
3	-	-	-	-	-	0.09	0.07
4	-	-	-	-	-	0.29	0.35
5	-	-	-	-	-	0.11	0.29
6	-	-	-	-	-	0.16	0.76
7	-	-	-	-	-	0.07	0.21
8	-	-	-	-	-	0.06	0.36
9	-	-	-	-	-	0.16	0.15

Each HRT was performed using leukocytes from two healthy donors. The results are shown as histamine release (%) from the donor's leukocytes (each symbol) that showed the highest histamine release induced by the patients' sera. When each donor leukocyte untreated with lactic acid was stimulated with anti-IgE Abs, histamine release was <sup>†</sup>62.0%, <sup>‡</sup>30.6%, <sup>§</sup>54.6%, <sup>¶</sup>59.4% and <sup>#</sup>70.7%, respectively. ASST, autologous serum skin test; HRT, histamine release test; AAbs, autoantibodies; M/F, male/female; N.P., not performed.

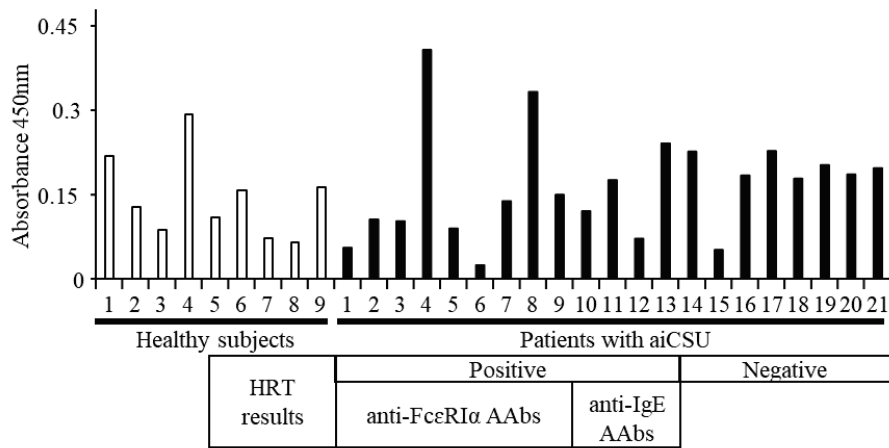


Fig. 4. Detection of anti-FcεRIα AAbs in sera from healthy subjects and aiCSU patients by ELISA. Serum levels of anti-FcεRIα AAbs ( $0.16 \pm 0.13$  AU for patients and  $0.14 \pm 0.07$  AU for healthy subjects;  $P = 0.796$ ) were not significantly different between the aiCSU patients and healthy subjects.

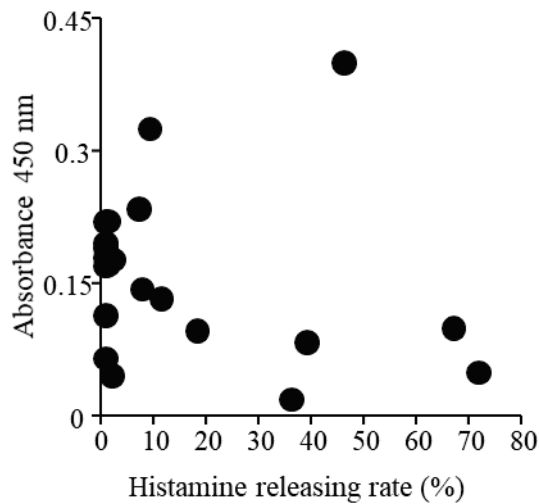


Fig. 5. The correlation between the serum levels of AAbs for FcεRIα in the ELISA and their responses in the HRT among aiCSU patients. No statistical correlations were obtained by Spearman's correlation coefficient by rank test.

### 1-3. 考察

本節では、ELISA 法および HRT を用いて患者血清中の抗 FcεRIα 自己抗体の検出を試みた。ELISA 法の結果、抗 FcεRIα 自己 IgG 抗体が自己免疫性蕁麻疹患者と健常者で検出された (Fig. 4)。また、ELISA 法で得られた吸光度、すなわち抗 FcεRIα 自己抗体価と HRT で得られたヒスタミン遊離率との間には有意な相関が認められなかった (Fig. 5)。この結果は、自己免疫性蕁麻疹患者や健常者血清中にヒスタミン遊離活性を有していない抗 FcεRIα 自己抗体が存在することを示唆している。Fiebiger らは、慢性特発性蕁麻疹の患者に加えて、他の自己免疫性皮膚疾患の患者においても抗 FcεRIα 自己抗体が検出されたことを報告している [37]。一方、同氏らの報告では、慢性特発性蕁麻疹患者の抗 FcεRIα 自己抗体のみがヒスタミン遊離活性を有していたことが示されている [37]。また同氏を含むいくつかの研究グループは、慢性特発性蕁麻疹患者の血清中で検出された抗 FcεRIα 自己抗体は主に IgG<sub>1</sub> や IgG<sub>3</sub> サブタイプであったのに対し、皮膚糸状菌症の患者血清中では IgG<sub>2</sub> や IgG<sub>4</sub> など慢性特発性蕁麻疹患者とは異なるサブタイプの抗 FcεRIα 自己抗体が検出されたと報告している [30,37,38]。これらの報告は、個々の IgG サブタイプの比率の違いが、ヒスタミン遊離活性の違いに影響している可能性を示している。

さらに、Altrichter らは、ASST に陽性を示す慢性特発性蕁麻疹患者において、抗 FcεRIα 自己 IgM 抗体が上昇していたことを報告した [39]。本研究の ELISA 法では抗 FcεRIα 自己抗体として、IgG 抗体のみを検出している。IgM 抗体がヒスタミン遊離活性を有しているかは解明されていないが、IgM 抗体が 2 分子以上の FcεRIα を架橋している可能性や IgG 抗体と FcεRIα との架橋結合に干渉している可能性などが考えられる。

以上の報告から、今後は自己抗体による FcεRIα 架橋能の有無に IgG 抗体のサブタイプや IgM 抗体などのクラスの違いが、どの程度関与しているのかを解析する必要があると考えている。

## 第2節 AlphaCL 法による抗 FcεRIα 自己抗体の検出条件の最適化

### 2-1. 緒言

Alpha 法によるタンパク質間の相互作用の解析には、ビーズの種類や結合能、対象タンパク質との親和性、反応に用いる緩衝液の組成や pH、ビーズ濃度、添加順、インキュベーション時間および温度など、多くの因子が影響する。通常、測定条件を決定する場合には、類似した検出系の文献情報を参照するのが一般的であるが、本研究のように対象タンパク質で2種のビーズを架橋する検出系については、ほとんど報告がない。本節では、FcεRIα で標識したドナーおよびアクセプタービーズを用いて、血清中の抗 FcεRIα 自己抗体を検出するための最適な検出条件を決定することを試みた。

本節では HRT にて、抗 FcεRIα 自己抗体を有している3名の患者血清 (No. 2, No. 3 および No. 5) を使用し、ビーズ濃度、インキュベーション時間および血清の希釈倍率を検討した。また、AlphaCL 法の発光が、抗 FcεRIα 自己抗体とビーズ上の FcεRIα との特異的な架橋結合に由来するものであることを確認するために、阻害実験を行った。さらに、AlphaCL 法で検出が可能な患者血清中抗 FcεRIα 自己抗体の濃度域を評価するために、抗ヒト FcεRIα マウスモノクローナル抗体である CRA1 を用いて抗体濃度依存性を評価した。

### 2-2. 結果

患者1名 (No. 2) の血清を用いて、ビーズ濃度とインキュベーション時間の変化に伴うシグナル値の変化を評価した。本実験におけるシグナル値は、アクセプタービーズの濃度上昇に伴い増加し、アクセプタービーズの終濃度 20 μg/mL、ドナービーズの濃度 5 μg/mL で最も高いシグナル値を示した (Fig. 6)。一方、シグナル値は、インキュベーションを24時間行ったときに最大となった (Fig. 6)。しかし、シグナル値は、1時間のインキュベーションで十分にバックグラウンドのシグナル値と差がついており、可能な限り短時間での検査を想定して、今後の実験では、インキュベーション時間を1時間とした。



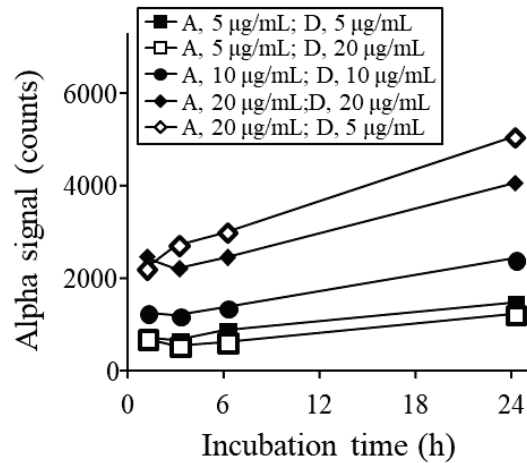


Fig. 6. Determination of optimal acceptor and donor bead concentrations and incubation time using serum from aiCSU patient no. 2. A, acceptor bead concentrations; D, donor bead concentrations.

次に3名の患者血清を用い、決定した条件で適切な患者血清の希釈倍率を決定した。本実験におけるシグナル値は、患者3名とも血清濃度依存的な上昇を示した (Fig. 7)。しかし、血清が終濃度4%の時点で、そのシグナル値はバックグラウンドのシグナル値の標準偏差の2倍値 (2SD) を超えていた。したがって、本結果においても最少量の血清による検査を想定し、今後の操作は血清濃度4%とした。

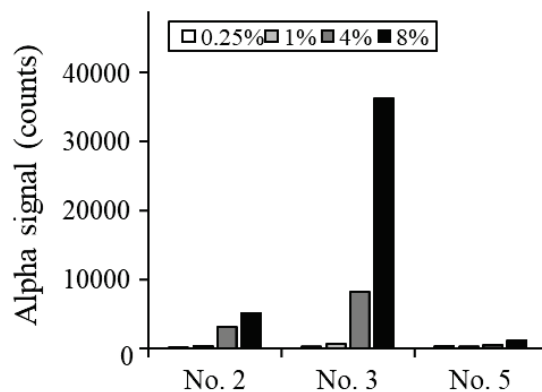


Fig. 7. Determination of optimal dilutions of sera from three aiCSU patients.

AlphaCL 法の特異性を評価するため、リコンビナントヒト FcεRIα タンパク質 (rhFcεRIα, R&D SYSTEM) を用いた阻害実験を行った。患者 3 名の血清にあらかじめ rhFcεRIα (20 μg/mL) またはバッファーのみを添加し、室温で 1 時間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後の血清を上記条件のビーズ混合液と反応させ、1 時間後に発光強度を測定した。その結果、あらかじめバッファーのみを加えた血清では、いずれの患者においてもシグナル値の上昇が認められた (Fig. 8)。一方、rhFcεRIα とプレインキュベーションした血清では、シグナル値が検出されなかった (Fig. 8)。以上の結果から、AlphaCL 法の発光は、抗 FcεRIα 自己抗体とビーズの FcεRIα との特異的な架橋結合に由来することが証明された。

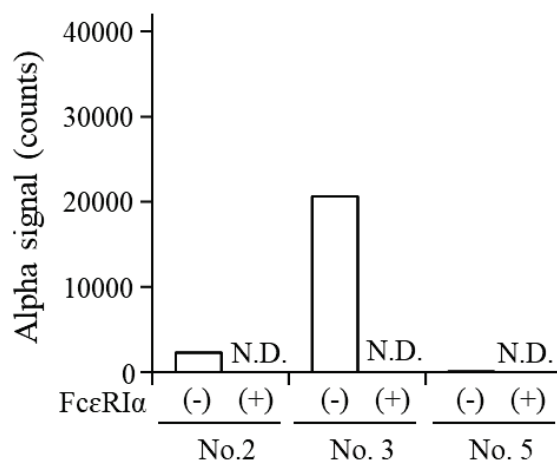


Fig. 8. Specific crosslinking of FcεRIα proteins on the surface of acceptor and donor beads by anti-FcεRIα AAbs in the sera from three aiCSU patients. N.D., not detected.

患者血清中の抗 FcεRIα 自己抗体の検出可能な濃度域を評価するために、CRA1 を用いた実験を行った。その結果、シグナル値は CRA1 の濃度依存的に上昇し、終濃度 0.005–1 μg/mL の範囲で検出が可能であることが示された (Fig. 9)。

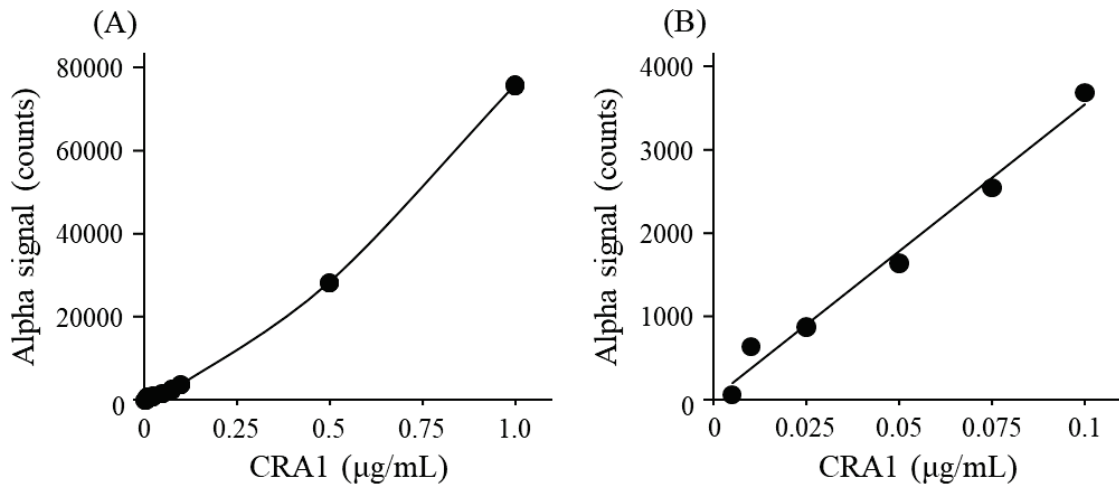


Fig. 9. Concentration-dependent crosslinking of acceptor and donor beads by mouse anti-human FcεRIα mAb (CRA1) over the entire range (A, 0.005–1 μg/mL) and at low concentrations (B, 0.005–0.1 μg/mL).

### 2-3. 考察

本節では、AlphaCL 法による抗 FcεRIα 自己抗体の検出条件を最適化することを目的に、検出条件の検討を行った。その結果、今回の検討の範囲では、インキュベーション時間が長いほど、また血清濃度が濃いほど、シグナル値が増大する傾向を示した (Figs. 6 および 7)。しかし先に述べたように、将来的な検査を想定した場合での条件の決定が必要と判断し、インキュベーション時間は 1 時間、血清濃度は 4% とした。

検出に最適なビーズ濃度を解析した結果、アクセプタービーズとドナービーズの添加比率が 4:1 の時に最も高いシグナル値を示した (Fig. 6)。この要因として、各ビーズの表面に標識されている FcεRIα の量の違いが関与していると推察される。PerkinElmer 社のプロトコルでは、ドナービーズをタンパク標識する際に使用するタンパク質の量は、アクセプタービーズの標識に使用する量よりも多く用いる方法が推奨されている。実際に、ビーズの表面に結合している FcεRIα の量は不明であるが、ドナービーズにはアクセプタービーズよりも多くの FcεRIα タンパク質が結合している可能性が考えられる。Alpha 法によるシグナルの検出には、アクセプターとドナーの 2 種のビーズが 1:1 の比で抗 FcεRIα 自己抗体により架橋される必要がある (Fig. 3)。しかし、理論上、同種ビーズ上に標識された 2 分子の FcεRIα を架橋している場合なども考えられる。このことから、2 種のビー

ズが最も効率よく、抗 FcεRIα 自己抗体により架橋されたのがアクセプターとドナービーズの比率が 4:1 であったと考えている。

AlphaCL 法のシグナル値は、いずれの患者においても血清濃度依存的に上昇を示した (Fig. 7)。一方、シグナル値の上昇の程度は、患者間で個体差があった。この要因として、血清中の抗体価の個体差が影響していると考えられる。HRT の結果は、好塩基球のドナー間でヒスタミン遊離活性に個体差が生じやすいことが知られている [7,24]。そのため HRT よりも、AlphaCL 法の方がより正確な血清中の自己抗体価を反映していると考えられる。

本実験では、ビーズ表面に結合すると想定される FcεRIα の最大量の約 5 倍量の FcεRIα を血清にあらかじめ添加した。FcεRIα とプレインキュベーションした血清を用いて AlphaCL 法を行った場合、シグナル値は検出されなかった (Fig. 8)。この結果は、AlphaCL 法の発光は、抗 FcεRIα 自己抗体とビーズ表面の FcεRIα との特異的な結合に由来していることを示している。

抗 FcεRIα 抗体である CRA1 を用いた実験においては、AlphaCL 法のシグナル値は CRA1 濃度 0.005–1 μg/mL の範囲で濃度依存的な上昇を示した (Fig. 9)。Izaki らの報告をもとに、本アッセイで用いた 4%患者血清中の抗 FcεRIα 自己抗体の濃度を算出すると、約 0.46–0.55 μg/mL と概算される [24]。このことから、AlphaCL 法は aiCSU 患者の血清中の抗 FcεRIα 自己抗体の検出が可能であることが示された。

### 第3節 AlphaCL 法による血清中抗 FcεRIα 自己抗体の検出

#### 3-1. 緒言

前節までの条件検討の結果、AlphaCL 法による抗 FcεRIα 自己抗体の最適な検出条件を決定した。本節では前節で決定した条件下で自己免疫性蕁麻疹患者 21 名および健常者 9 名中の抗 FcεRIα 自己抗体の検出を試みるとともに、従来検査法と比較し、その有用性を評価した。

#### 3-2. 結果

AlphaCL 法を用いて血清中の抗 FcεRIα 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。一方、患者血清では 21 名のうち 13 名 (61.9%) でシグナルが検出された (Fig. 10)。このとき、抗 FcεRIα 自己抗体に対する HRT で陽性を示した患者 9 名 (nos. 1-9) 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 (nos. 10-21) のうち 6 名でもシグナルが検出された。また、AlphaCL 法のシグナル値と ELISA 法の吸光度に有意な相関関係は認められなかった (Fig. 11)。

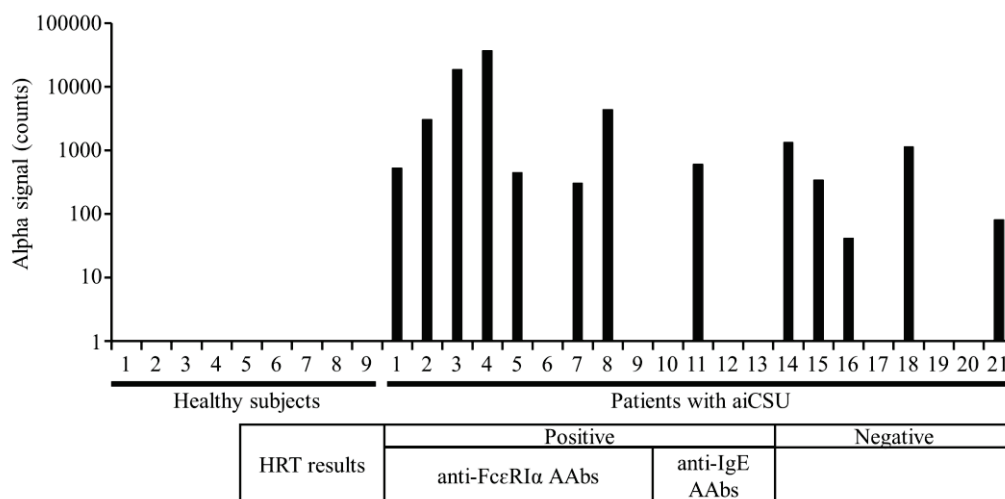


Fig. 10. Detection of anti-FcεRIα AAbs in sera from healthy subjects and aiCSU patients by AlphaCL. When the histamine release from lactic acid-treated leukocytes in the HRT was greater than that from untreated cells (in patient nos.1-9), we described this as “anti-FcεRIα AAbs”. In the opposite case (in patient nos. 10-13), we described this as “anti-IgE AAbs”. “Negative” means histamine release rates were < 5% from both untreated and lactic acid-treated leukocytes.

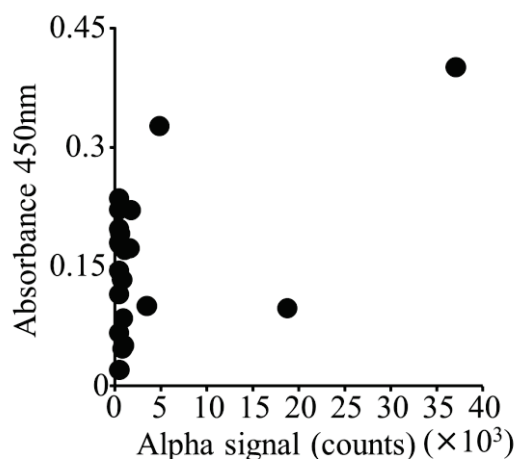


Fig. 11. The correlation between the serum levels of AAbs for FcεRIα in the ELISA and their AlphaCL signals among aiCSU patients.

### 3-3. 考察

AlphaCL 法を用いて血清中の抗 FcεRIα 自己抗体を検出した結果、患者血清では 21 名のうち 13 名 (61.9%) でシグナルが検出された (Fig. 10)。このとき、HRT 陰性患者 12 名 (nos. 10–21) 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 法のシグナル値 (平均 ± 標準偏差, 7053 ± 12510 counts) は、陰性患者 (291 ± 472 counts) よりも高い傾向を示した ( $P = 0.07$ )。以上の結果から、AlphaCL 法は HRT で検出できなかった抗 FcεRIα 自己抗体も検出できる可能性が示唆された。

一方で、今回は検体数が少なくカットオフ値を定めることができなかった。したがって、検出された HRT 陰性患者 6 名が真の陽性か否かを判断することができなかった。そのため、今後はさらに検体数を増やし、AlphaCL 法の感度や特異度、カットオフ値を定める必要があると考えている。また、HRT の結果は、使用したドナー好塩基球の反応性の個体差によりに偽陽性や偽陰性を生じやすいことが知られている。そのため AlphaCL 法でシグナルが検出されなかった患者 No. 6 については、ドナー好塩基球の数を増やして再度 HRT を施行する必要があると考えている。

本研究では ELISA 法と AlphaCL 法との間に相関は認められなかった (Fig. 11)。この要因として、第 1 章 1-3 で述べたように、ELISA 法が FcεRIα 架橋能の有無に関係なく全ての抗 FcεRIα 自己 IgG 抗体を検出したのに対し、HRT や AlphaCL 法は FcεRIα 架橋能を有する抗 FcεRIα 自己抗体を検

出したためであると考えている。また、HRT 法や AlphaCL 法では、IgM 抗体がビーズと架橋している可能性や IgG とビーズとの架橋結合に干渉している可能性などが考えられ、今後、血清中 IgG 抗体を精製し、HRT 法や AlphaCL 法を実施する必要があると考えている。

AlphaCL 法で認められる抗 FcεRIα 自己抗体による架橋結合の形成と臨床症状の病勢との関連性は不明である。AlphaCL 法におけるビーズ同士の検出可能な距離は約 200 nm 以内である [40]。一方、IgG 抗体サイズは一般的に約 10–15 nm である。したがって、AlphaCL 法は IgG 自己抗体が各ビーズ表面上に固定された FcεRIα 同士を架橋することで、ビーズ同士が接近し、発光すると考えられる。一方、マスト細胞の細胞膜は流動性を有しており、膜タンパク質である FcεRIα は細胞表面を移動し、自己抗体の Fab 部分と結合すると考えられる [41]。したがって、2 分子の FcεRIα が抗 FcεRIα 自己抗体と結合する様式は AlphaCL 法とマスト細胞で異なるが、架橋結合の形成能は両者で同等であると推測される。一方、蕁麻疹症状の出現には、FcεRIα の架橋結合だけでなく、脱顆粒によって放出される化学伝達物質の量や、化学伝達物質に対する反応性の差によって変動すると考えられる。今後は多数の検体を用いて AlphaCL 法で得られたシグナル値と患者の蕁麻疹の数や瘙癢の程度を点数化した urticaria activity score (UAS) を比較し、AlphaCL 法の結果と臨床症状の病勢との関係性を明らかにしたいと考えている。

## 第4節 小括

本章では、抗FcεRIα自己抗体に対する新規検査法 (AlphaCL法) を構築し、その結果を従来の検査法であるELISA法やHRTと比較し、AlphaCL法の有用性を評価した。

第1節では、AlphaCL法の評価の比較対象として、ELISA法とHRTを用いて、患者血清中の抗FcεRIα自己抗体を検出した。また、ELISA法の特異性を評価するために、ELISA法で得られた吸光度 (抗FcεRIα自己抗体価) と抗FcεRIα自己抗体に対するHRTで得られたヒスタミン遊離率と比較した。結果として、ELISA法の吸光度は健常者群と自己免疫性蕁麻疹患者群との間に有意な差はなく、またヒスタミン遊離率との相関も認められなかった。この結果は、健常者や自己免疫性蕁麻疹患者の血清中にヒスタミン遊離活性を有していない抗FcεRIα自己抗体が存在することを示唆している。健常者と患者間で抗FcεRIα自己抗体にヒスタミン遊離活性の違いが認められる要因として、IgG自己抗体のサブクラスや、IgM抗体などのクラスの違いが関与している可能性がある。今後、IgG自己抗体のサブクラス比や自己抗体のクラス比を測定し、ヒスタミン遊離活性との関連性を明らかにする必要があると考えている。

第2節では、少数の患者血清を用いて、抗FcεRIα自己抗体に対するAlphaCL法の検出条件の最適化を行った。その結果、最適なビーズ濃度 (アクセプタービーズ, 20 μg/mL; ドナービーズ, 5 μg/mL)、インキュベーション時間 (1時間) および血清の希釈倍率 (4%) を決定した。またAlphaCL法の特異性と検出可能な抗FcεRIα自己抗体の濃度域を評価するため、阻害実験やCRA1を用いた濃度依存性の実験を実施し、シグナル値がFcεRIαと血清中の抗FcεRIα自己抗体との結合に特異的であることや、抗FcεRIα抗体の濃度依存的事であることを明らかにした。

第3節では、第2節で得られた自己抗体の最適な検出条件を用いて、自己免疫性蕁麻疹患者21名および健常者9名の血清から抗FcεRIα自己抗体の検出を試みた。その結果、健常者血清からシグナルは検出されなかったが、患者21名中13名からはシグナルが検出された。このとき、HRT陰性を示した13名のうち、6名からシグナルが検出された。この結果から、AlphaCL法はHRTで検出できなかった抗FcεRIα自己抗体も検出できる可能性が示唆された。しかし、本研究は解析した検体数が少ないためカットオフ値が定まっておらず、この6名が真の陽性であるのかを判定できて



いない。今後は、さらに検体数を増やして AlphaCL 法の感度や特異度、カットオフ値を求める必要があると考えている。

## 第2章 抗IgE自己抗体に対するAlphaCL法の構築およびその有用性の評価

前章で、自己免疫性蕁麻疹患者の血清中に含まれるFcεRIαの架橋能を有する抗FcεRIα自己抗体を検出するAlphaCL法を確立することに成功した。構築したAlphaCL法を用いて、患者21名の血清中抗FcεRIα自己抗体を検出した結果、21名中8名(38.1%)では抗FcεRIα自己抗体が検出されなかった。Kolkhirらは、慢性蕁麻疹患者の0-69%がIgE抗体に対する自己抗体(抗IgE自己抗体)を有していることを報告している[8]。一方、日本人を対象とした研究においては、Niimiらが、ASSTで陽性を示した日本人の慢性患者を対象にHRTを行った結果、5%がIgE抗体に対する自己抗体を有していたと報告している[36]。

本章では、抗IgE自己抗体を検出することができるAlphaCL法を構築し、従来の検査法であるELISA法やHRTと比較することで、その有用性を評価した。

## 第1節 ELISA 法および HRT による抗 IgE 自己抗体の検出

### 1-1. 緒言

本節では、第1章と同様に AlphaCL 法の比較対象として、ELISA 法および HRT を用いて患者血清中の抗 IgE 自己抗体を検出することを目的とした。また、ELISA 法と HRT とを比較することで ELISA 法の特異性を評価した。本章の ELISA 法では、第1章と同様に抗 IgG 抗体を用いて、血清中の抗 IgE 自己 IgG 抗体の結合を解析した。

### 1-2. 結果

第2章では、第1章と同じ、ASST 陽性または HRT 陽性を示した自己免疫性蕁麻疹患者 21 名および健常者 9 名の血清を用いた (Table 3)。

ELISA 法による抗 IgE 自己 IgG 抗体価を測定した結果、自己免疫性蕁麻疹患者および健常者ともに吸光度が増加し、両群間の有意な差は認められなかった (患者群  $0.60 \pm 0.53$  AU , 健常者群  $0.34 \pm 0.22$  AU;  $P = 0.191$ ) (Table 3, Fig. 12)。また、ELISA 法による吸光度と HRT によるヒスタミン遊離率との間には有意な相関は認められなかった (Fig. 13)。

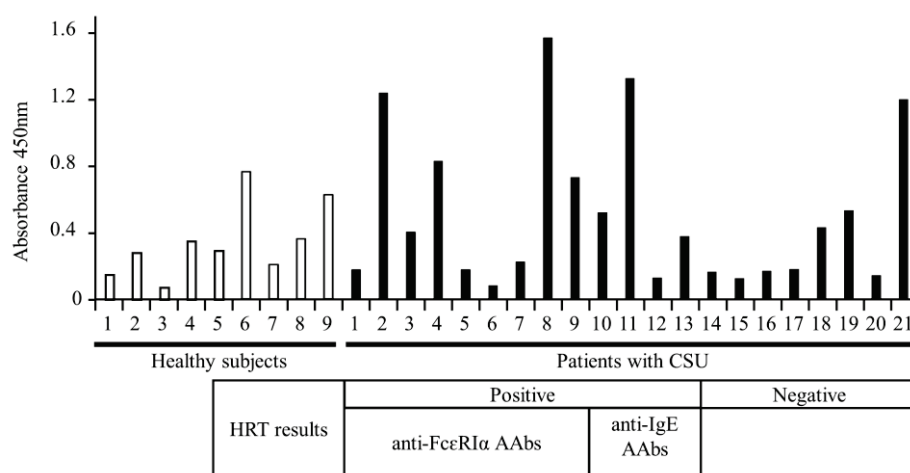


Fig. 12. Detection of anti-IgE AAbs in sera from healthy subjects and aiCSU patients by ELISA. Serum levels of anti-IgE autoantibodies ( $0.60 \pm 0.53$  AU for patients and  $0.34 \pm 0.22$  AU for healthy subjects;  $P = 0.191$ ) were not significantly different between the aiCSU patients and healthy subjects.

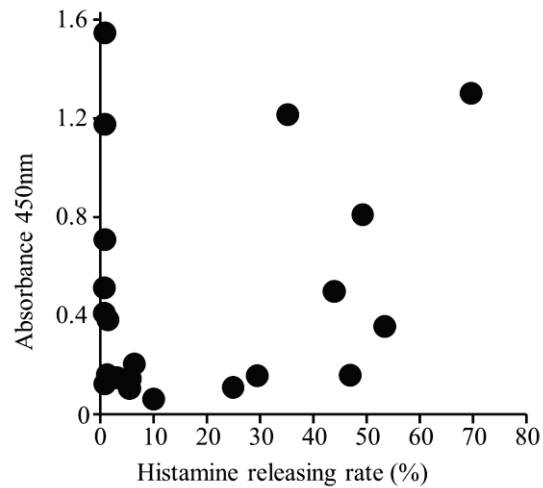


Fig. 13. The correlation between the serum levels of AAbs for IgE in the ELISA and their responses in the HRT among aiCSU patients. No statistical correlations were obtained by Spearman's correlation coefficient by rank test.

### 1-3. 考察

本節では、ELISA 法および HRT を用いて患者血清中の抗 IgE 自己抗体を検出することを試みた。その結果、抗 FcεRIα 自己抗体と同様に、ELISA 法で得られた抗 IgE 自己抗体価と HRT で認められたヒスタミン遊離率との間には有意な相関が認められなかった。この要因として、IgG 抗体のサブタイプの比率や IgM 抗体などのクラスの違いが、ヒスタミン遊離活性の違いに影響を与えている可能性が考えられる [30,37-39]。

## 第2節 AlphaCL 法による抗 IgE 自己抗体の検出条件の最適化

### 2-1. 緒言

第1章の第2節で述べたように、ビーズの種類や結合能、対象タンパク質との親和性、反応に用いる緩衝液の組成や pH、ビーズ濃度、添加順、インキュベーション時間および温度などは、AlphaCL 法のシグナル値に大きく影響する。前章で決定した FcεRIα 標識ビーズと、本章で用いる IgE 抗体標識ビーズでは自己抗体の検出に最適な条件が異なると考えられる。本節では、HRT で抗 IgE 自己抗体型と判定された2名の患者血清 (No. 10 および No. 11) を用いて、最適なビーズ濃度、インキュベーション時間および血清の希釈倍率を決定した。次いで AlphaCL 法の発光が、抗 IgE 自己抗体とビーズに標識された IgE 抗体との特異的な架橋結合に由来するものであることを確認するために、阻害実験を行った。さらに、AlphaCL 法で検出が可能な患者血清中の抗 IgE 自己抗体の濃度域を調べるために、抗ヒト IgE 抗体を用いて抗体濃度依存性を確認した。

### 2-2. 結果

患者1名 (患者 No. 10) の血清を用いて、ビーズ濃度とインキュベーション時間の変化に伴うシグナル値の変動を評価した。その結果、シグナル値は、アクセプターおよびドナービーズの終濃度がともに 20 μg/mL かつインキュベーション時間が 24 時間の時に最大値を示した (Fig. 14)。そのため今後の操作は、ビーズ濃度を 20 μg/mL、インキュベーション時間を 24 時間とした。

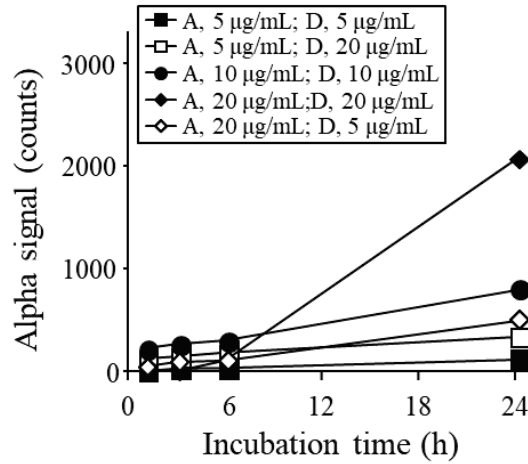


Fig. 14. Determination of optimal acceptor and donor bead concentrations and incubation time using serum from aiCSU patient no. 10. A, acceptor bead concentrations; D, donor bead concentrations.

次に2名の患者血清を用い、決定した条件下で患者血清の希釈倍率を検討した。本実験におけるシグナル値は、患者2名 (No. 10 および No. 11) とも血清濃度が終濃度 1%のとき最大となり、4% および 8%では、濃度依存的に減少した (Fig. 15)。そのため今後の操作は、血清濃度 1%とした。

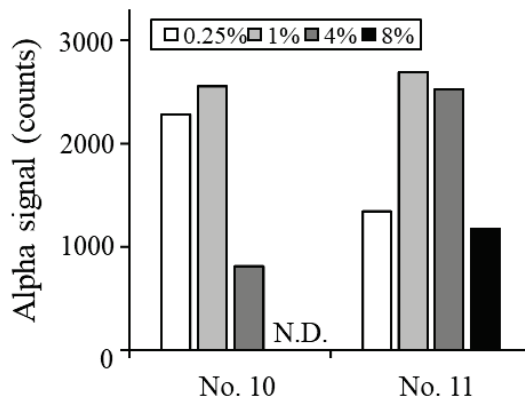


Fig. 15. Determination of optimal dilutions of sera from three aiCSU

AlphaCL 法の特異的な結合を評価するために、IgE 抗体を用いた阻害実験を行った。患者2名の血清に、あらかじめ IgE 抗体 (20 µg/mL) またはバッファーのみを添加し、室温で1時間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後の血清を 1%となるようにビーズ混合液と反応さ

せ、24 時間後に発光強度を測定した。その結果、あらかじめバッファーのみを加えた血清では、両患者ともシグナル値の上昇が認められた (Fig. 16)。一方、IgE 抗体とプレインキュベーションした血清では、シグナル値の減少が認められた (Fig. 8)。以上の結果から、AlphaCL 法の発光は、ビーズ表面に固定された IgE 抗体と抗 IgE 自己抗体との特異的な架橋結合に由来することが示された。

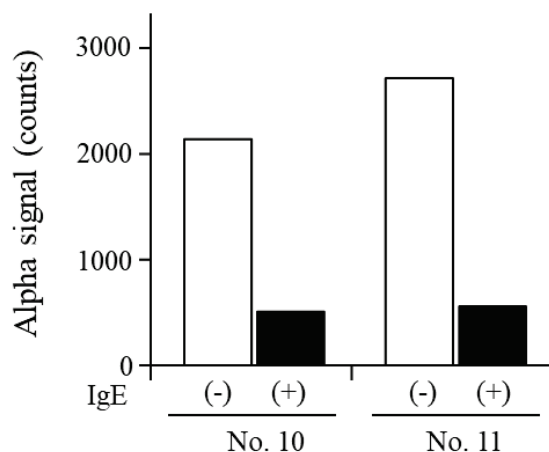


Fig. 16. Specific crosslinking of IgE proteins on the surface of acceptor and donor beads by anti-IgE AAbs in the sera from three aiCSU patients.

また、抗 IgE 抗体を用いて、AlphaCL 法で検出可能な患者血清中の抗 IgE 自己抗体の濃度域を確認した結果、シグナル値は抗 IgE 抗体の濃度依存的に上昇し、終濃度 0.005–1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度域で検出が可能であることが示された (Fig. 17)。

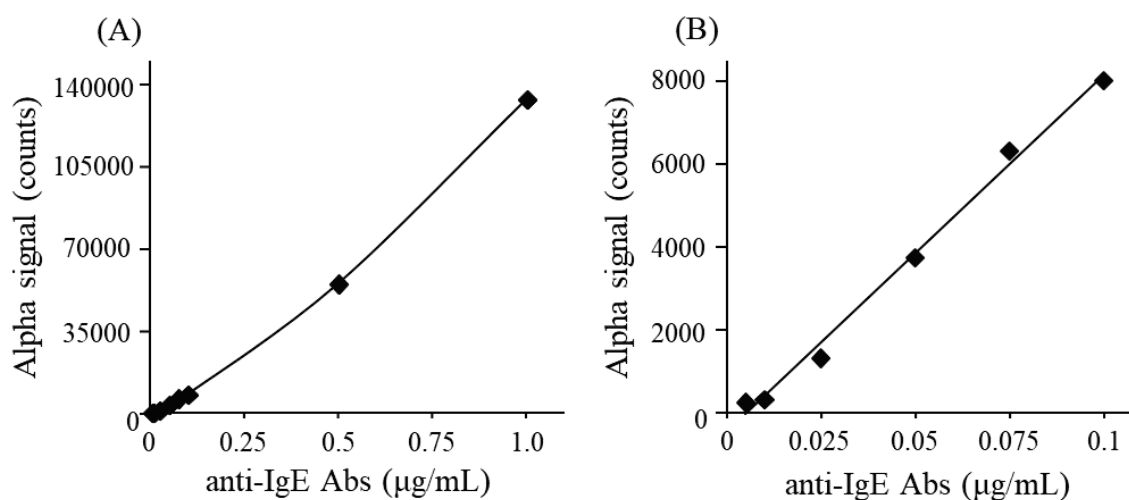


Fig. 17. Concentration-dependent crosslinking of acceptor and donor beads by rabbit anti-human IgE Ab over the entire range (A, 0.005–1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and at low concentrations (B, 0.005–0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 2-3. 考察

本節では、AlphaCL 法による抗 IgE 自己抗体の最適な検出条件を決定することを目的に、ビーズ濃度、インキュベーション時間および血清濃度を決定した。その結果、ビーズ濃度は両ビーズともに 20  $\mu\text{g/mL}$ 、インキュベーション時間は 24 時間、また血清濃度は 1%の時のシグナル値が最も大きい値を示した (Figs. 14 および 15)。Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  標識ビーズを用いた自己抗体の検出ではインキュベーション時間が 1 時間であったのに対し、IgE 標識ビーズを用いた自己抗体の検出では 24 時間と長い時間を要した。また、得られたシグナル値は、抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  自己抗体の検出時よりも低い値であった。以上の結果から、抗 IgE 自己抗体の検出感度は、抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  自己抗体の検出よりも低い可能性が示された。

AlphaCL 法による抗 IgE 自己抗体の検出におけるシグナル値は、血清濃度が 1%を超えると濃度依存的に低下した (Fig. 15)。この結果は、血清の構成物が、抗 IgE 自己抗体とビーズ表面上の IgE 抗体との結合を阻害している可能性を示唆するものである。予備実験において、患者番号 11 の血清を 50%の濃度で添加した結果、シグナル値は検出限界まで低下した。また、血清を添加していない IgE 標識ビーズに血清濃度と同程度のウシ  $\gamma$ -グロブリンやウシ血清アルブミンを添加し、バックグラウンドのシグナル値がどの程度変化するかを確認した。その結果、得られたシグナル値は、ウシ  $\gamma$ -グロブリンの添加により低下したが、ウシ血清アルブミンを添加した場合にはシグナル値の上昇が確認された (data not shown)。これらの結果から、高濃度の血清中に含まれる物質の電荷が、IgE 標識ビーズのシグナル産生に影響を与えた可能性が考えられる。さらに、抗 IgE 自己抗体の検出は血清中の IgE 抗体の影響を受ける可能性も考えられる。つまり、血清中の IgE 抗体とあらかじめ結合している抗 IgE 自己抗体は、IgE 抗体標識ビーズとは結合できないため検出されない可能性がある。また、Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  標識ビーズでは、血清中の IgE 抗体がビーズ表面の Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  と結合し、その IgE 抗体を標的とした抗 IgE 自己抗体を検出してしまう可能性も考えられる。したがって、正確に抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  自己抗体型または抗 IgE 自己抗体型を区別することは難しいと推察される。しかしながら、1%血清中の総 IgE 濃度は  $1\text{IU} \simeq 4.2\text{ ng}$  と換算した場合、約 4  $\text{ng/mL}$  と概算され、この濃度はビーズ表面に結合している IgE 抗体の濃度 2  $\mu\text{g/mL}$  よりも極めて薄い [42]。したがって、血清中に含まれる IgE 抗体は、AlphaCL 法の検出に影響を与えていない可能性も考えられる。今後は検出感度



を向上させるために、血清中 IgG または IgM 抗体の精製や不要なタンパク質を除去するなどの方法を行う必要があると考える。

あらかじめ IgE 抗体とプレインキュベーションした血清を用いた場合、シグナル値はバッファーのみとプレインキュベーションした場合に比べ、低い値を示した (Fig. 16)。今回プレインキュベーションに用いた IgE 抗体は、ビーズ表面に結合していると想定される量のおよそ 10 倍量を添加して実施した。この結果から、AlphaCL 法の発光は、抗 IgE 自己抗体とビーズ表面の IgE 抗体との特異的な結合に由来することが示された。

AlphaCL 法のシグナル値は抗 IgE 抗体濃度 0.005–1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で濃度依存的な上昇を示した (Fig. 17)。Izaki らの報告をもとに、本アッセイで用いた 1%患者血清中の抗 IgE 自己抗体の濃度を算出すると、約 0.072–0.084  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と概算される [24]。このことから、AlphaCL 法は aiCSU 患者の血清中の抗 IgE 自己抗体の検出が可能であることを示した。

### 第3節 AlphaCL 法による血清中抗 IgE 自己抗体の検出

#### 3-1. 緒言

前節で AlphaCL 法による抗 IgE 自己抗体の最適な検出条件を決定した。そこで本節では、最適な本条件下で自己免疫性蕁麻疹患者 21 名および健常者 9 名中の抗 IgE 自己抗体の検出を試みた。

#### 3-2. 結果

AlphaCL 法を用いて、aiCSU 患者血清中の抗 IgE 自己抗体を検出した。その結果、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 (Fig. 18)。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 (nos. 10–13) 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 法のシグナル値 ( $1,042 \pm 1,212$  counts) は、陰性患者 ( $159 \pm 655$  counts) よりも高い傾向を示した ( $P = 0.05$ )。本研究では、抗 IgE 自己抗体の検出率 (14.2%) は抗 FcεRIα 自己抗体の検出率 (61.9%) よりも低かった (Figs. 10 および 18)。また、AlphaCL 法と ELISA 法の相関関係については、AlphaCL 法の検出数が少なかつたため解析には至らなかった。

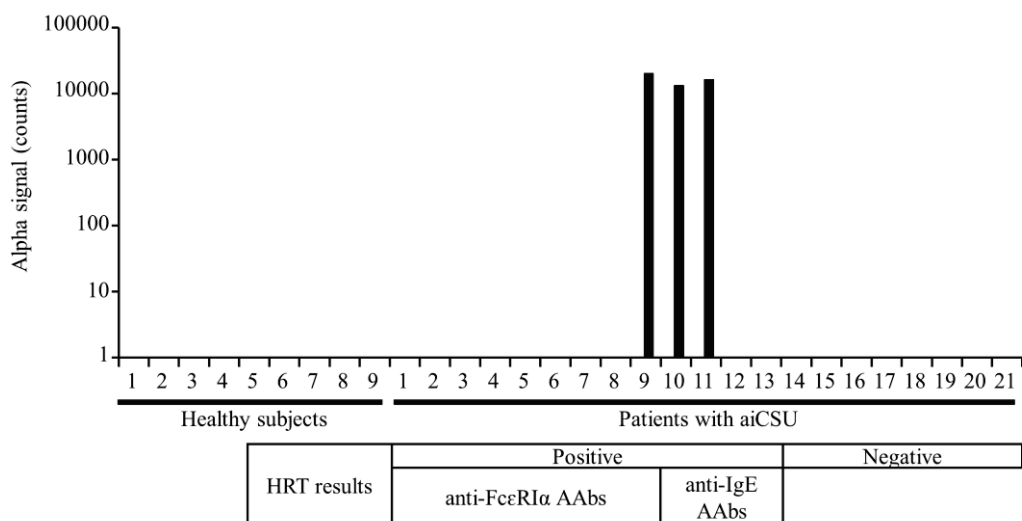


Fig. 18. Detection of anti-IgE AAbs in sera from healthy subjects and aiCSU patients by AlphaCL. When the histamine release from lactic acid-treated leukocytes in the HRT was greater than that from untreated cells (in patient nos.1–9), we described this as “anti-FcεRIα AAbs”. In the opposite case (in patient nos. 10–13), we described this as “anti-IgE AAbs”. “Negative” means histamine release rates were < 5% from both untreated and lactic acid-treated leukocytes.

### 3-3. 考察

本節では、AlphaCL法を用いて血清中の抗IgE自己抗体を検出した。その結果、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(Fig. 18)。

AlphaCL法によるHRT陽性者の抗IgE自己抗体の検出率(50%)は、第1章で示した抗FcεRIα自己抗体の検出率(77.8%)よりも低い値であった。この結果から、本検査法の検出感度は低いと示唆された。今後は、抗体の精製や血清中のタンパク質の除去などを行い、感度を上昇させる必要があると考えている。

抗FcεRIα自己抗体型である患者No. 9が抗IgE自己抗体として検出された(Fig. 18)。この要因として、No.9の患者におけるHRTの結果が偽陽性である可能性が考えられる。No.9における抗IgE自己抗体に対するHRTの結果、ヒスタミン遊離率は7.1%と陽性の中でも低く、また抗FcεRIα自己抗体は検出されなかった(Table 3)。HRTは好塩基球ドナーとの相性によって結果が異なることが報告されているため[21,25]、今後は複数のドナー好塩基球を用いてHRTを再度実施する必要がある。

ると考えている。一方 AlphaCL 法は、好塩基球ドナーの反応性による個体差を生じることがなく、高い精度で自己免疫性蕁麻疹のスクリーニングが可能であると考えている。

AlphaCL 法で抗 FcεRIα および抗 IgE 自己抗体のいずれも検出されなかった患者は、21 名中 6 名 (28.5%) であった (Figs. 10 および 18)。患者 6 名が両検査法で検出されなかった要因として、前述の抗 IgE 自己抗体の検出感度が低いことが挙げられる。また、6 名の患者は真にこれらの自己抗体を有していない可能性も考えられる。Bossi らを含む過去の研究から、IgG を除去した慢性蕁麻疹患者血清がマスト細胞の脱顆粒を惹起したことが報告されている [43,44]。また Bossi らは FcεRIα を発現していないマスト細胞 (HMC-1) が患者血清の添加により活性化されたことも報告している [45]。さらに 近年、HRT におけるヒスタミン遊離率に患者血清中の抗 IL-24 IgE 抗体やサブスタンス P、主要塩基性タンパク質 (MBP)、好酸球ペルオキシダーゼ (EPO)、凝固因子、補体、および IgE 自己抗体の関与が示唆されている [13,14,22,45-50]。今後、これらの因子がどの程度、自己免疫性蕁麻疹の発症に関与しているのかを明らかにする必要があると考える。

#### 第4節 小括

本章では、抗IgE自己抗体に対する新規検査法 (AlphaCL法) を構築し、その結果を従来の検査法と比較し、AlphaCL法の有用性を評価した。

第1節では、AlphaCL法の評価の比較対象として、ELISA法とHRTを用いて、患者血清中の抗IgE自己抗体を検出した。また、ELISA法の特異性を評価するために、ELISA法で得られた抗IgE自己抗体価と抗IgE自己抗体に対するHRTで得られたヒスタミン遊離率とを比較した。その結果、ELISA法で得られた抗IgE自己抗体価は健常者と自己免疫性蕁麻疹患者との間に有意な差はなく、またHRTとの相関も認められなかった。その要因として、自己抗体のサブクラスやクラスの違いが影響していると考えられる。今後、抗IgE自己抗体価とヒスタミン遊離活性との相関に、サブクラスやクラスの違いがどの程度関与しているのかを解析する必要がある。

第2節では、2名の患者血清を用いて、抗IgE自己抗体に対するAlphaCL法の検出条件の最適化を行った。その結果、最適なビーズ濃度 (アクセプタービーズ、ドナービーズともに 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、インキュベーション時間 (24 時間) および血清の希釈倍率 (1%) を決定した。またAlphaCL法の特異性と検出可能な抗IgE自己抗体の濃度域を評価するため、阻害実験や抗IgE抗体を用いた濃度依存性の実験を実施した。その結果、ビーズの発光は、IgE抗体と血清中の抗IgE自己抗体との結合に特異的であることや、抗IgE抗体の濃度依存的であることを明らかにした。

第3節では、第2節で得られた自己抗体の最適な検出条件を用いて、自己免疫性蕁麻疹患者21名および健常者9名の血清から抗IgE自己抗体の検出を試みた。結果として、健常者血清からシグナルは検出されなかった一方で、患者21名中3名でシグナルが検出された。また、抗IgE自己抗体に対するAlphaCL法の検出感度 (50%) は、抗Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 自己抗体に対するAlphaCL法の検出感度 (77.8%) より低い可能性が示唆されたことから、今後は血清中の抗体を精製する方法や共存タンパク質を除去する方法などで検出感度を向上させる必要があると考えている。また、AlphaCL法では患者21名中6名でいずれの自己抗体も検出されなかった。血清中には自己抗体以外の構成物がASSTやHRT時にヒスタミン遊離活性を引き起こすことが報告されている [13,14,22,45-50]。そのため今後は、これらの血清成分がどの程度自己免疫性蕁麻疹の発症に関与しているのかを明らかに

する必要があると考えている。

## 結論

これまで自己免疫性蕁麻疹の発症機序や検査法に関する研究が多く報告されており、血清中の自己抗体を検出することは自己免疫性蕁麻疹 IIb 型のスクリーニングに有用であると考えられている [18,20,24,25,28,39,51-53]。しかしながら、マスト細胞や好塩基球の表面にある 2 分子以上の FcεRIα や IgE 抗体を架橋結合する自己抗体のみを検出することができる、簡便かつ特異的な検査法はこれまでに報告されていない。そのため本研究では、慢性特発性蕁麻疹患者の血清中に含まれる FcεRIα 架橋能を有する自己抗体を検出する新規検査法の開発とその有用性を評価することを目的に、自己免疫性蕁麻疹患者の血清から自己抗体の検出を試みた。その結果、以下の知見を得た。

- 1) 自己免疫性蕁麻疹患者血清中の抗 FcεRIα および抗 IgE 自己抗体を検出する新しい検出系 (AlphaCL 法) を確立した。
- 2) AlphaCL 法による抗 FcεRIα 自己抗体と抗 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、HRT よりも感度が高い可能性を示した。

また、本検査法はその簡便な操作方法から、従来の検査法と比較して、1) 健常者ドナーの好塩基球や培養したマスト細胞を用いる必要がない点、2) FcεRIα や IgE 抗体に対する自己抗体を高感度で検出できる点、3) 簡便な操作のため多くの医療機関で実施できる点、4) 患者に対する侵襲行為が最小限である点が優れている。

本研究の成果が、今後自己免疫性蕁麻疹患者の新しい診断法へ応用されることを期待する。

## 実験の部

### 1. 患者血清

本研究では、2002年8月～2021年2月に広島大学病院皮膚科または島根大学医学部附属病院皮膚科を受診し、EAACI/GA2LEN/EDF/WAO ガイドラインに基づき慢性特発性蕁麻疹と診断された患者のうち、ASSTまたはHRTで陽性を示した患者21名の血清を用いた。なお、コントロール血清として9名の健常者血清を用いた。血清は使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。本研究は、ヘルシンキ宣言および現在の日本の法規制に準拠し、広島大学倫理委員会（承認番号E-1968-1）によって承認された。患者の同意は、書面によるインフォームドコンセントの提供またはオプトアウトの機会を設けることで同意を得た。

### 2. ASST

ASSTは、Takahagiらの報告に基づいて実施した [20, 54]。50  $\mu\text{L}$  の患者血清を患者の前腕の皮内に注射し、次いで陰性対照として生理食塩水 (50  $\mu\text{L}$ )、陽性対照としてヒスタミン溶液 (20  $\mu\text{L}$ 、生理食塩水中 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を、それぞれ間隔を空けて皮内に注射し、注射後 30 分後の反応を測定した。抗ヒスタミン薬を服用していない患者では、膨疹の直径が陰性対照より 1.5 mm 大きい場合を陽性判定とした。抗ヒスタミン薬服用中の患者では、紅斑が陰性対照より 5 mm 以上大きいか、或いは陽性対照より大きい場合を陽性とした。

### 3. HRT

HRTは、Matsuoらの報告に基づいて、軽微な変更を加えて実施した [55]。

#### 3-1. ヒト末梢血由来の好塩基球画分の調製

健常者ドナーの血液は、ベネエジェクト II 真空採血管 (EDTA, 7mL) を用いて、健常者2名の末梢静脈血から各 10 mL 採取した。50 mL 遠沈管にそれぞれ血液を全て移し、1% メチルセルロース溶液 5 mL を加え、スポイトで混合後に 30 分間静置した。赤血球が沈殿するため、好塩基球が豊富な上清をスポイトで新しい 50 mL 遠沈管に回収した。上清を緩衝液 A (137 mM NaCl, 5 mM glucose, 2.7 mM KCl, 0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.03% human



serum albumin [HSA], pH 7.4) で全量 50 mL となるようメスアップし、転倒混和後、乳酸処理用と未処理用の遠沈管に等量に分注した。各遠沈管を室温にて  $450 \times g$  で 15 分間遠心分離 (KUBOTA 5010) を行った。上清をアスピレーターで除去し、白血球を含む沈殿に未処理用の遠沈管には緩衝液 A で、乳酸処理用の遠沈管には 10%HSA を含む生理食塩水でそれぞれ 50 mL までメスアップした。未処理用の遠沈管は転倒混和後に室温静置した。乳酸処理用の遠沈管は転倒混和後に  $300 \times g$  で 10 分間遠心分離した。再度上清をアスピレーターで除去した後、0.1%乳酸緩衝液 (0.03% HSA, 0.1% lactic acid, 0.9% NaCl, pH 3.9) 10 mL を加え、スポイドで 4 分間穏やかにピペッティングした。その後、緩衝液 A で 50 mL にメスアップし、 $300 \times g$  で 10 分間遠心分離を行った。上清をアスピレーターで除去した後、未処理の遠沈管とともに、 $300 \times g$  で 10 分間遠心分離を行った。各遠沈管の上清を除去した後、それぞれに緩衝液 B (2 mM  $\text{CaCl}_2$  および 1 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む緩衝液 A, pH 7.4) 850  $\mu\text{L}$  を添加した。

### 3-2. 末梢血由来好塩基球からのヒスタミン遊離反応

3-1. で調製した好塩基球懸濁液 50  $\mu\text{L}$  を患者血清 (50  $\mu\text{L}$ )、緩衝液 B (50  $\mu\text{L}$ ) および抗ヒト IgE 抗体 (0.67 mg/ml, Dako, 50  $\mu\text{L}$ ) にそれぞれ添加し、 $37^\circ\text{C}$  で振とうしながら 40 分間インキュベーションし、ヒスタミン遊離反応を行った。インキュベーション後、緩衝液 A を 400  $\mu\text{L}$  ずつ加え、チューブを転倒混和した。その後、室温にて  $1400 \times g$  で 5 分間遠心分離 (KUBOTA 3700) し、上清を 1.5 mL チューブに回収した。沈殿物に緩衝液 C (137 mM NaCl, 5 mM glucose, 2.7 mM KCl, 0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4) を 450  $\mu\text{L}$  加え、ボルテックスで再懸濁させた。沈殿および上清に 20%  $\text{HClO}_4$  を 50  $\mu\text{L}$  ずつ加え、ボルテックス後に 30 分間静置した。その後、室温にて  $20000 \times g$  で 10 分間遠心分離 (KUBOTA 3700) し、遠心後の上清をそれぞれ 150  $\mu\text{L}$  ずつ HPLC 測定用 96 穴プレートにアプライした。それぞれの溶液に含まれるヒスタミン量を HPLC で測定した。

### 3-3. HPLC を用いたヒスタミンの定量

ヒスタミンの定量は、ポストカラム蛍光検出法を用いた HPLC により行った。3-2.の試料 20  $\mu$ L を注入し、分離カラムに通し、ヒスタミンの分離を行った後、ヒスタミンとオルトフタルアルデヒドを反応させ、その生成物を蛍光検出器により検出した。サンプルを解析する前に、毎回ヒスタミン標準液 (1, 2, 5, 10 ng/mL) を測定し、リテンションタイムおよび定量性を確認した。オートサンプラーを用いて 8 分間隔で試料の注入・分析を行った。HPLC の分離条件および検出条件は以下の通りである。

- 分離条件

カラム: shim pack VP-ODS(SHIMADZU) (カラム長 150 nm、内径 4.6 mm)

移動相 A: 10 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 100 mM 酒石酸緩衝液 (pH 4.4)

移動相 B: 100%メタノール

移動相の混合比: 酒石酸 : メタノール = 71.5 : 28.5

流量: 1.0 mL/min

カラム温度: 50°C

注入量: 20  $\mu$ L

- 検出条件

ポストカラム誘導体化法

反応相: ほう酸/オルトフタルアルデヒド緩衝液 (pH 9.2)

流量: 0.5 mL/min

検出: 蛍光検出 (励起波長 360 nm、蛍光波長 440 nm)

- 構成

Pump A (LC-20AD, SHIMADZU): 移動相として、流量 1.0 mL/min かつ圧力約 13.5 MPa

Pump B (LC-20AD, SHIMADZU): 反応相として、流量 0.5 mL/min かつ圧力約 4.5 MPa

デガッサー (DGU-20AS, SHIMADZU)

オートサンプラー (SIL-20AC, SHIMADZU): 8 分毎

カラムオープン (CTO-20A, SHIMADZU): 50°C

蛍光検出器 (RF-10AXL, SHIMADZU): 励起波長 360 nm および蛍光波長 440 nm

#### 3-4. ヒスタミン遊離率の算出

ヒスタミン標準液の各濃度から得られたピーク面積から、検量線を作成した。各サンプルヒスタミンピーク面積から、検量線を用いてヒスタミン濃度を算出した。各サンプルにおいて、遊離ヒスタミン量と残存ヒスタミン量の和から全ヒスタミン量を計算し、全ヒスタミン量に対する遊離ヒスタミン量の割合をヒスタミン遊離率として算出した。自然遊離による誤差を修正するために、緩衝液 B のヒスタミン遊離率を差し引いて補正を行った。

$$\text{ヒスタミン遊離率 (\%)} = \frac{\text{遊離ヒスタミン量}}{(\text{遊離ヒスタミン量} + \text{残存ヒスタミン量})} \times 100$$

陽性判定は、ヒスタミン遊離率が 5%以上とした。また、抗 FcεRIα 自己抗体は IgE 除去の有無に関わらずヒスタミン遊離を惹起するため、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 FcεRIα 自己抗体型とし、その逆を抗 IgE 自己抗体型と定義した。

#### 4. ELISA 法

ELISA 法は Altrichter らの報告をもとに、軽微な変更を加えて実施した [39]。96 ウェルマイクロプレート (F8 MAXISORP LOOSE NUNC-IMMUNO MODULE, Thermo Fisher Scientific) に rhFcεRIα タンパク質 (500 ng/mL, R&D SYSTEM) またはネイティブヒト IgE 抗体 (nhIgE, 2.5 μg/mL, Abcam) を 200 μL 注入し、4°Cで一晩静置した。各ウェルを 0.05% (v/v) の Tween-20 を含むリン酸緩衝液 (PBS-T, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) 200 μL で 5 回洗浄し、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS) を含む PBS 200 μL を加えて、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、各ウェルを PBS-T 200 μL で 5 回洗浄し、自己免疫性蕁麻疹患者または健常者血清 (0.1%) 200 μL を加え、室温で 2 時間反応させた。その後、PBS-T 200 μL で 5 回洗浄し、

FBS で希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (1:10000, Invitrogen) 200  $\mu$ L と室温で 1 時間反応させた。各ウェルを PBS-T 200  $\mu$ L で 5 回洗浄後、TMB Substrate (SeraCare Life Sciences) 100  $\mu$ L を加えて 15 分間発色させた。その後、1 M リン酸 100  $\mu$ L で反応を停止させた。マルチプレートリーダー (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific) を用いて、副波長 620 nm に対する波長 450 nm の吸光度を測定した。

## 5. AlphaCL 法

### 5-1. ビーズ濃度およびインキュベーション時間の検討

rhFc $\epsilon$ RI $\alpha$  または nhIgE で標識されたアクセプターおよびドナービーズ (各 5 mg/mL) はパーキンエルマー社の製造プロトコルに則って作製された。暗所にて各ビーズの終濃度がそれぞれ 5, 10, 20  $\mu$ g/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 (PerkinElmer) に 20  $\mu$ L ずつ添加した。次いで、Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  標識ビーズの方には抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  自己抗体型である患者番号 2 の血清を終濃度 4%となるよう AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、同プレートに 20  $\mu$ L 添加した。IgE 標識ビーズの方も同様に、抗 IgE 自己抗体型である患者番号 10 の血清を終濃度 1%となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、同プレートに 20  $\mu$ L 添加した。バックグラウンドとして、AlphaLISA immunoassay buffer のみ添加したウェルをそれぞれ用意した。ウェル内の溶液の揮発を防ぐため、TopSeal<sup>TM</sup>-A PLUS (PerkinElmer) でプレートを覆い、室温・遮光振盪下でインキュベーションを行った。その後、1, 3, 6 および 24 時間時点での発光強度を EnSpire<sup>TM</sup> マルチモードプレートリーダー (PerkinElmer) にて測定した。全ての操作は duplicate で行い、得られたシグナル値はバックグラウンドの値を引いて、ウェル間の平均値を用いた。

### 5-2. 血清濃度の検討

抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  自己抗体検出系は、暗所にて Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  標識アクセプタービーズの終濃度が 20  $\mu$ g/mL、ドナービーズが 5  $\mu$ g/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20  $\mu$ L 添加した。次いで、患者番号 2, 3, 5 の血清を終濃度 0.25, 1, 4, 8%となるよう AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、同プレートに 20  $\mu$ L 添加した。バックグラウンドとして、AlphaLISA

immunoassay buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 1 時間インキュベーションを行った。

抗 IgE 自己抗体検出系は、暗所にて IgE 標識ビーズの終濃度がともに 20 µg/mL となるように buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 µL 添加した。次いで、患者番号 10, 11 の血清を終濃度 0.25, 1, 4, 8%となるよう AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、同プレートに 20 µL 添加した。バックグラウンドとして、buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 24 時間インキュベーションを行った。

インキュベーション後、発光強度を 5-1 と同様の方法で測定した。

### 5-3. 特異性の評価 (阻害実験)

抗 FcεRIα 自己抗体検出系は、AlphaLISA immunoassay buffer で希釈された患者番号 2, 3, 5 の血清 8%に対し、阻害剤として rhFcεRIα 溶液 (20 µg/mL) または Buffer を添加し、室温振盪下で 1 時間プレインキュベーションを行った。暗所にて FcεRIα 標識アクセタービーズの終濃度が 20 µg/mL、ドナービーズが 5 µg/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 µL 添加した。その後、プレインキュベーションした血清を、同プレートに 20 µL 添加した。バックグラウンドとして、阻害剤の存在下・非存在下それぞれの buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 1 時間インキュベーションを行った。

抗 IgE 自己抗体検出系は、AlphaLISA immunoassay buffer で希釈された患者番号 10, 11 の血清 2%に対し、阻害剤として nhIgE 溶液 (20 µg/mL) または AlphaLISA immunoassay buffer を添加し、室温振盪下で 1 時間プレインキュベーションを行った。暗所にて IgE 標識ビーズの終濃度がそれぞれ 20 µg/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 µL 添加した。その後、プレインキュベーションした血清を、同プレートに 20 µL 添加した。バックグラウンドとして、阻害剤の存在下・非存在下それぞれの AlphaLISA immunoassay buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 24 時間インキュベーションを行った。

インキュベーション後、発光強度を 5-1 と同様の方法で測定した。

#### 5-4. 抗体濃度依存性の評価

抗 FcεRIα 自己抗体検出系は、暗所にて FcεRIα 標識アクセタービーズの終濃度が 20 μg/mL、ドナービーズが 5 μg/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 μL 添加した。次いで、健常者血清 (終濃度 4%) 中の CRA1 (Bio Academia) を終濃度 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 μg/mL となるよう buffer で希釈し、同プレートに 20 μL 添加した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 1 時間インキュベーションを行った。

抗 IgE 自己抗体検出系は、暗所にて IgE 標識ビーズの終濃度がともに 20 μg/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 μL 添加した。次いで、健常者血清 (終濃度 1%) 中の Polyclonal Rabbit Anti-Human IgE (Dako) を終濃度 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 μg/mL となるよう AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、同プレートに 20 μL 添加した。バックグラウンドとして、AlphaLISA immunoassay buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 24 時間インキュベーションを行った。

インキュベーション後、発光強度を 5-1 と同様の方法で測定した。

#### 5-5. 自己免疫性蕁麻疹患者および健常者の自己抗体の検出

抗 FcεRIα 自己抗体検出系は、暗所にて FcεRIα 標識アクセタービーズの終濃度が 20 μg/mL、ドナービーズが 5 μg/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 μL 添加した。その後、健常者 9 名および自己免疫性蕁麻疹患者 21 名の血清を終濃度 4%となるよう AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、同プレートに 20 μL 添加した。バックグラウンドとして、buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 1 時間インキュベーションを行った。

抗 IgE 自己抗体検出系は、暗所にて IgE 標識ビーズの終濃度がそれぞれ 20 μg/mL となるように AlphaLISA immunoassay buffer で希釈し、1/2 AreaPlate-96 に 20 μL 添加した。その後、健常者 9 名および自己免疫性蕁麻疹患者 21 名の血清を終濃度 1%となるよう AlphaLISA immunoassay buffer

で希釈し、同プレートに 20  $\mu$ L 添加した。バックグラウンドとして、AlphaLISA immunoassay buffer のみ添加したウェルを用意した。プレートを TopSeal™-A PLUS で覆い、室温・遮光振盪下で 24 時間インキュベーションを行った。

インキュベーション後、発光強度を 5-1 と同様の方法で測定した。

## 6. 統計解析

測定値は、平均値 $\pm$ 平均値の標準偏差 (S.D.) で示した。グループ間の平均値の差は、スチューデントの *t* 検定を用いて評価した。ELISA 法と HRT 間、ELISA 法と AlphaCL 法間の相関は、ランクテストによるスピアマンの相関係数によって分析した。 $P < 0.05$  を統計的に有意であるとした。

## 7. 試薬・資材・機器

### 7-1. 試薬

名称	社名
60% HClO <sub>4</sub>	Nakalai tesque
Albumin, from Human Serum (HSA)	Sigma-Aldrich
AlphaLISA immunoassay buffer (10×)	PerkinElmer
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich
Calcium chloride dihydrate	Nakalai tesque
CRA1 (1mg/mL)	Bio Academia
D-(+)-Glucose	Nakalai tesque
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (-)	日水製薬
FcεRIα AlphaLISA acceptor beads	PerkinElmer
FcεRIα AlphaLISA donor beads	PerkinElmer
Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO
γ-Globulins from bovine blood	Sigma-Aldrich
Goat anti-Human IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP	Invitrogen
HEPES	Nakalai tesque
Histamine Dihydrochloride	Sigma-Aldrich
Histamine dihydrochloride	SIGMA
Human IgE AlphaLISA acceptor beads	PerkinElmer
Human IgE AlphaLISA donor beads	PerkinElmer
Hydrochloric acid	Nakalai tesque
Potassium chloride	Nakalai tesque
Lactic Acid	Nakalai tesque
Magnesium Chloride Hexahydrate	Nakalai tesque
Methanol	Nakalai tesque



Native Human IgE protein (Azide free)	Abcam
Perchloric Acid (60%)	Nakalai tesque
Phosphoric Acid	Nakalai tesque
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgE	DAKO
Sodium Chloride	Nakalai tesque
Sodium Dihydrogen phosphate Dihydrate	Nakalai tesque
Sodium Hydroxide	Nakalai tesque
Tween-20	Nakalai tesque

## 7-2. 資材

名称	社名
1/2 AreaPlate-96	PerkinElmer
micro-plate (96 well)	Thermo Scientific
DSIMIC 13CP type	ADVANTEC
F8 MAXISORP LOOSE NUNC-IMMUNO MODULE	PerkinElmer
TMB Microwell Peroxidase Substrate System (2-Component System)	SeraCare Life Sciences
TopSeal™-A PLUS	PerkinElmer
サンプル エコノスポイト 3ml	サンプルテック
プレートシール	SUMILON
ベノジェクト II 真空採血管 (EDTA、薄紫、7mL)	テルモ

## 7-3. 機器

機器名	製品名	社名
マルチモードプレートリーダー	Multiskan™ GO	Thermo Fisher Scientific
	2300 EnSpire™	PerkinElmer
テーブルトップ遠心機	KUBOTA 5010	KUBOTA

マイクロ冷却遠心機	KUBOTA 3700	KUBOTA
恒温振とう培養器	SR-15	TAITEC
超純水装置	Milli-Q Advantage	日本ミリポア
高圧蒸気滅菌器	SANYO MLS-3020	SANYO
自動蒸留水製造機	純粹製造装置 WG222S	ヤマト科学
pH メーター	MP-220 pH Meter	METTLER TOLEDO
試験管ミキサー	VORTEX-GENIE2	Scientific Industries
Pump A	LC-20AD	SHIMADZU
Pump B	LC-20A	SHIMADZU
Degasser	DGU-20A5R	SHIMADZU
autosampler	SIL-20AC	SHIMADZU
Column oven	CTO-20A	SHIMADZU
fluorescence detector	RF-10AXL	SHIMADZU

## 論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

1. Koga Y, Yokooji T, Ogino R, Taogoshi T, Takahagi S, Ishii K, Chinuki Y, Morita E, Hide M, Matsuo H. A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria. *Allergol Int.* 2022; 71(1): 94-102.

## 参考文献

- [1] Hide M, Hiragun T. Japanese guidelines for diagnosis and treatment of urticaria in comparison with other countries. *Allergol Int.* 2012; 61: 517-527.
- [2] Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Bindslev-Jensen C, Brzoza Z, Canonica GW, et al. The EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy.* 2018; 73: 1393-1414.
- [3] Tanaka T, Kameyoshi Y, Hide M. Analysis of the prevalence of subtypes of urticaria and angioedema. *Alerugi.* 2006; 55:134-139.
- [4] Fine LM, Bernstein JA. Guideline of Chronic Urticaria Beyond. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2016; 8: 396-403.
- [5] Grattan CE, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CT, Bradfield JW. A serological mediator in chronic idiopathic urticarial—a clinical, immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol.* 1986; 114: 583-590.
- [6] Grattan CE, Francis DM, Hide M, Greaves MW. Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy.* 1991; 21: 695-704.
- [7] Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1599-1604.
- [8] Kolkhir P, Church MK, Weller K, Metz M, Schmetzer O, Maurer M. Autoimmune chronic spontaneous urticaria: what we know and what we do not know. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139: 1772-1781.
- [9] Kolkhir P, Metz M, Altrichter S, Maurer M. Comorbidity of chronic spontaneous urticaria and autoimmune thyroid diseases: A systematic review. *Allergy.* 2017; 72: 1440-1460.
- [10] Altrichter S, Peter HJ, Pisarevskaja D, Metz M, Martus P, Maurer M. IgE mediated autoallergy against thyroid peroxidase—a novel pathomechanism of chronic spontaneous urticaria? *PLoS One.* 2011; 6: e14794.

- [11] Sánchez A, Cardona R, Munera M, Sánchez J. Identification of antigenic epitopes of thyroperoxidase, thyroglobulin and interleukin-24. Exploration of cross-reactivity with environmental allergens and possible role in urticaria and hypothyroidism. *Immunol Lett.* 2020; 220: 71-78.
- [12] Chang TW, Chen C, Lin CJ, Metz M, Church MK, Maurer M. The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135: 337-342.
- [13] Hatada Y, Kashiwakura J, Hayama K, Fujisawa D, Sasaki-Sakamoto T, Terui T, et al. Significantly high levels of anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the degranulation of basophils from chronic urticaria patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 161: 154-158.
- [14] Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, Preusse P, Freier D, Church MK, et al. IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142: 876-882.
- [15] Lakin E, Church MK, Maurer M, Schmetzer O. On the lipophilic nature of autoreactive IgE in chronic spontaneous urticaria. *Theranostics.* 2019; 9: 829-836.
- [16] Asero R, Marzano AV, Ferrucci S, Lorini M, Carbonelli V, Cugno M. Co-occurrence of IgE and IgG autoantibodies in patients with chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Immunol.* 2020; 200: 242-249.
- [17] Kaplan AP. Chronic spontaneous urticaria: pathogenesis and treatment considerations. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017; 9: 477-482.
- [18] Schoepke N, Asero R, Ellrich A, Ferrer M, Gimenez-Arnau A, E H Grattan C, et al. Biomarkers and clinical characteristics of autoimmune chronic spontaneous urticaria (aiCSU): results of the PURIST study. *Allergy.* 2019; 74: 2427-2436.
- [19] Church MK, Kolkhir P, Metz M, Maurer M. The role and relevance of mast cells in urticaria. *Immunol Rev.* 2018; 282: 232-247.
- [20] Konstantinou GN, Asero R, Maurer M, Sabroe RA, Schmid-Grendelmeier P, Grattan CE. EAACI/GA(2)LEN task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria. *Allergy.* 2009; 64: 1256-1268.

- [21] Hofman ZLM, van den Elzen MT, Kuijpers J, de Maat S, Hack CE, Knulst AC, et al. Evidence for bradykinin release in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2020; 50: 343-351.
- [22] Yanase Y, Matsuo Y, Takahagi S, Kawaguchi T, Uchida K, Ishii K, et al. Coagulation factors induce human skin mast cell and basophil degranulation via activation of complement 5 and the C5a receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 2021; 147: 1101-1104.
- [23] Cugno M, Tedeschi A, Frossi B, Bossi F, Marzano AV, Asero R. Detection of low-molecular-weight mast cell-activating factors in serum from patients with chronic spontaneous urticaria. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016; 26: 310-313.
- [24] Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura JI, et al. Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs. *Allergol Int*. 2019; 68: 342-351.
- [25] Kim Z, Choi BS, Kim JK, Won DL. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Annals of Laboratory Medicine*. 2016; 36: 28-35.
- [26] Ferrer M, Kinét JP, Kaplan AP. Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti-Fc(ε)RIα (α-subunit) in chronic urticaria. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998; 101: 672-676
- [27] Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinét JP, Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1997; 99: 461-465.
- [28] Lee MF, Lin TM, Lin SW, Chen YH. A rapid method of detecting autoantibody against FcεRIα for chronic spontaneous urticaria. *PLoS One*. 2014; 9: e109565.
- [29] Kikuchi T, Kaplan A. Mechanisms of autoimmune activation of basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107: 1056-1062.
- [30] Soundararajan S, Kikuchi Y, Joseph K, Kaplan AP. Functional assessment of pathogenic IgG subclasses in chronic autoimmune urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 815-821.

- [31] Kaplan AP, Joseph K. Basophil secretion in chronic urticaria: autoantibody-dependent or not? *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120: 729-730.
- [32] Burlein C, Bahnck C, Bhatt T, Murphy D, Lemaire P, Carroll S, et al. Development of a sensitive amplified luminescent proximity homogeneous assay to monitor the interactions between pTEFb and Tat. *Anal Biochem.* 2014; 465: 164-171.
- [33] Sugimoto K, Hiwasa T, Shibuya K, Hirano S, Beppu M, Iose S, et al. Novel autoantibodies against the proteasome subunit PSMA7 in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2018; 325: 54-60.
- [34] Kaplan AP, Joseph K, Maykut RJ, Geba GP, Zeldin RK. Treatment of chronic autoimmune urticaria with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122: 569-573.
- [35] MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol.* 1997; 158: 1438-1445.
- [36] Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, Winkelmann PK, Greaves MW, Barr. Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1001-1006.
- [37] Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest.* 1998; 101: 243-251.
- [38] Konstantinou GN, Asero R, Ferrer M, Knol EF, Maurer M, Raap U, et al. EAACI taskforce position paper: evidence for autoimmune urticaria and proposal for defining diagnostic criteria. *Allergy.* 2013; 68: 27-36.
- [39] Altrichter S, Zampeli V, Ellrich A, Zhang K, Church MK, Maurer M. IgM and IgA in addition to IgG autoantibodies against FcepsilonRIalpha are frequent and associated with disease markers of chronic spontaneous urticaria. *Allergy.* 2020; 75: 3208-3215.
- [40] PerkinElmer. User's Guide to Alpha Assays Protein:Protein Interactions.  
[https://www.blossombio.com/pdf/products/UG\\_Alphatech.pdf](https://www.blossombio.com/pdf/products/UG_Alphatech.pdf)
- [41] Mio M, Akahori H, Sugimoto Y, Akagi M, Tasaka K. Influence of aging on the histamine release

and membrane fluidity of rat peritoneal mast cells. *Pharmacology*. 1989; 38: 191-200.

- [42] V Seagroatt, S G Anderson. The second international reference preparation for human serum immunoglobulin E and the first British standard for human serum immunoglobulin E. *J Biol Stand*. 1981; 9: 431-437.
- [43] U Fagiolo, F Kricek, C Ruf, A Peserico, A Amadori, M Cancian. Effects of complement inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 567-572.
- [44] Bossi F, Frossi B, Radillo O, Cugno M, Tedeschi A, Riboldi P, Asero R, Tedesco F, Pucillo C. Mast cells are critically involved in serum-mediated vascular leakage in chronic urticaria beyond high-affinity IgE receptor stimulation. *Allergy*. 2011; 66: 1538-1545.
- [45] Zheng W, Wang J, Zhu W, Xu C, He S. Upregulated expression of substance P in basophils of the patients with chronic spontaneous urticaria: induction of histamine release and basophil accumulation by substance P. *Cell Biol Toxicol*. 2016; 32: 217-228
- [46] Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, et al. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134: 622-633.
- [47] Levick SP, Brower GL, Janicki JS. Substance P-mediated cardiac mast cell activation: An in vitro study. *Neuropeptides*. 2019; 74: 52-59.
- [48] Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, et al. Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *J Invest Dermatol*. 2014; 134: 2833-2836.
- [49] Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117: 1113-1117.
- [50] Ferrer M, Nakazawa K, Kaplan AP. Complement dependence of histamine release in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 169-172.
- [51] Platzer MH, Grattan CE, Poulsen LK, Skov PS. Validation of basophil histamine release against the



autologous serum skin test and outcome of serum-induced basophil histamine release studies in a large population of chronic urticaria patients. *Allergy*. 2005; 60: 1152-1156.

- [52] Baioumy SA, Esawy MM, Shabana MA. Assessment of circulating FcεRIα in chronic spontaneous urticaria patients and its correlation with clinical and immunological variables. *Immunobiology*. 2018; 223: 807-811.
- [53] Ulambayar B, Chen YH, Ban GY, Lee JH, Jung CG, Yang EM, et al. Detection of circulating IgG autoantibody to FcεRIα in sera from chronic spontaneous urticaria patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017; 53: 141-147.
- [54] Takahagi S, Mihara S, Iwamoto K, Morioke S, Okabe T, Kameyoshi Y, et al. Coagulation/fibrinolysis and inflammation markers are associated with disease activity in patients with chronic urticaria. *Allergy*. 2010; 65: 649-656.
- [55] Matsuo H, Yokooji T, Morita H, Ooi M, Urata K, Ishii K, et al. Aspirin augments IgE-mediated histamine release from human peripheral basophils via Syk kinase activation. *Allergol Int*. 2013; 62: 503-511.

## 謝辞

本論文の執筆にあたり、研究の着想から、実験指導、論文執筆まで終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学病院薬剤部 松尾 裕彰 教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導を頂き、学位論文の作成においては有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学大学院医系科学研究科 横大路 智治 准教授、広島大学病院薬剤部 埴越 崇範 助教に深謝致します。

論文の作成にあたり、有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学大学院医系科学研究科 森川 則文 教授、同研究科 小池 透 教授、同研究科 高野 幹久 教授、同研究科 柳瀬 雄輝 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の実施に際して、多大なる御協力を頂きました病院薬剤学研究室の先輩方、同級生、後輩の皆様に心より感謝いたします。

最後に、これまでの学生生活において、お世話になった皆様に心より御礼申し上げますと共に、研究成果における哀歓を共にし、支え励ましてくださった妻や息子、また両親に心より深謝いたします。

令和4年3月

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

病院薬剤学研究室

古賀 祐基