

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16540

研究課題名（和文）好塩基球活性化に着目したアナフィラキシーの病態解明と新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms and development of novel therapeutic strategies of anaphylaxis focused on basophil activation

研究代表者

山賀 聡之（Yamaga, Satoshi）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30526223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：アナフィラキシー患者の末梢血中の好塩基球数は、健常者と比較し有意に低値であった。また、アナフィラキシー患者における末梢血中の好塩基球は全例で活性化を認めず、活性化能を示す症例は一部のみであった。さらに、好塩基球減少はアナフィラキシーの重症度や凝固障害との関連も示唆された。アナフィラキシーでは、活性化した好塩基球は血液中から組織に移行し、重症な病態形成と凝固障害に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アナフィラキシーの発症は非常に急速であり、発症を予測することが困難な場合が多いため、ヒトを対象とした研究はあまり行われておらず、未解明な問題が多く残されている。また、アナフィラキシーには免疫機構（I型アレルギー）によるものと非免疫機構によるものがあり、好塩基球が病態形成にどのような影響を及ぼしているかは不明であった。今回の研究から、I型アレルギーの関与にかかわらず、アナフィラキシーの病態形成に好塩基球が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Basophil counts in peripheral blood in patients with anaphylaxis decreased compared with controls. No patients with anaphylaxis demonstrated basophil activation in the peripheral blood. Additionally, only a few patients showed the potential for basophil activation in response to anti-IgE stimulation. The activated basophils possibly migrate out of the peripheral blood into the tissue. Moreover, basopenia might be correlated with the severity and coagulopathy of anaphylaxis.

研究分野：アナフィラキシー

キーワード：アナフィラキシー 好塩基球 ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシーとは急激発症し生命を脅かす全身性重症アレルギー反応である。アナフィラキシーの発症に関与するヒスタミンは、組織中の肥満細胞に加えて、血液中の好塩基球活性化により放出される。好塩基球は高親和性 IgE 受容体(Fc RI)を細胞表面に発現しており、抗原が IgE と結合し Fc RI の架橋がおこると好塩基球の活性化が起こる。しかし、アナフィラキシーにおける好塩基球活性化と細胞機能および病態形成メカニズムについてはいまだ明らかにされていない。

活性化した好塩基球では、好塩基球に特異的な細胞表面マーカーである CD203c の発現強度が増強する。CD203c の発現はフローサイトメトリーによって検出することが可能であり、近年、抗原刺激に対する発現強度の増強を調べることでより食物アレルギーの診断などが可能となっている。

申請者らは、アナフィラキシー発症患者の血球内ヒスタミン濃度が健常者と比べ有意に低下すること、さらに、血球内ヒスタミン濃度が低値であるほど、アナフィラキシーに伴う全身性反応が強いことを報告した。好塩基球の半減期は2~3日であり、血中に残存した好塩基球の血球内ヒスタミン濃度は、好塩基球の脱顆粒を反映している可能性があることから、好塩基球活性化がアナフィラキシーの病態形成に強く関与している可能性が考えられる。

本研究では、好塩基球活性化に着眼した分子学的観点におけるアナフィラキシーの病態解明、新規治療法確立に向けた基礎的検討を行う。

2. 研究の目的

(1) 好塩基球に着眼したアナフィラキシーの病態形成の解明：アナフィラキシー患者における末梢血中の好塩基球活性化、活性化能および好塩基球数を解析し、アナフィラキシー病態形成における好塩基球の役割を解明する。

(2) 好塩基球と臨床データとの関連：好塩基球活性化、好塩基球数とアナフィラキシー重症度の関連を検証する。

(3) 好塩基球活性化制御の検討：アナフィラキシー既往患者の健常時の末梢血を用いて、既知の抗原による好塩基球活性化の評価、および制御可能な化合物の検索を行う。

3. 研究の方法

(1) 当院高度救命救急センター、集中治療室に入院したアナフィラキシー患者を対象とし、アナフィラキシーの原因、病歴、臨床症状、重症度、血液検査、投薬、転帰などの患者情報を収集した。また、入院時および翌日に末梢血を用いて、フローサイトメトリーにより好塩基球数を測定した。フローサイトメトリーでは CD3 陰性かつ CRTH2、CD203c ダブルポジティブの細胞を好塩基球として同定した。好塩基球活性化の有無は、好塩基球活性化マーカーである CD203c の発現強度から評価した。好塩基球数の活性化能は、抗 IgE 抗体の添加による CD203c の発現強度増強の有無から判断した。血漿、全血ヒスタミン濃度は高速液体クロマトグラフィーにより測定し、血球内ヒスタミン濃度は全血と血漿ヒスタミン濃度の差とした。血漿および全血ヒスタミンの測定とフローサイトメトリー解析は、入院時および入院翌日に実施した。年齢と性別を一致させた非アナフィラキシー患者または健常人ボランティアから対照群として末梢血を採取し、同様に血漿、全血ヒスタミン濃度の測定およびフローサイトメトリーによる好塩基球の解析を行った。

(2) 上記で得られた情報をもとに、アナフィラキシー患者における好塩基球数、好塩基球活性化の状態とアナフィラキシーの臨床症状、血液検査、重症度、原因との関連を調べた。また、アナフィラキシー重症化因子の検討の一環として、広島市消防局の病院前データ(救急車搬送症例)に基づいた後方視的コホート研究を行った。

(3) アナフィラキシーで当院に入院歴があり、アレルゲンが判明かつ当院に定期的に来院受診している患者を対象とし、定期外来受診時(非アナフィラキシー時)の末梢血を用い、アレルゲンに対する好塩基球活性化の評価を行った。対象を造影剤によるアナフィラキシー既往のある患者とし、患者群と対照群(健常人)の末梢血を用いて、既知の抗原を含めた造影剤に対する好塩基球活性化試験をフローサイトメトリーを用いた CD203c の発現強度の解析により行った。

4. 研究成果

(1) 好塩基球に着眼したアナフィラキシーの病態形成の解明

まず、アナフィラキシー患者における末梢血中の好塩基球数、活性化の評価を行った。患者群の入院時の好塩基球数は、対照群と比較し有意に低値であった。また、末梢血中の好塩基球は全例で活性化を認めず、抗 IgE 抗体による刺激によって活性化を示した例は一部の症例のみであった。アナフィラキシー発症翌日には好塩基球数はさらに減少し、同様に対照群と比較し低値を示した。入院時に抗 IgE 抗体による刺激により活性化を示さなかった症例のうち、翌日には一部の症例で活性化能が回復した。

アナフィラキシー患者の入院時における血球内ヒスタミン濃度は、対照群と比較して有意に低値であった。発症翌日においても同様に対照群と比較して有意に低い値を示した。一方、アナフィラキシー患者における一血球あたりの血球内ヒスタミン濃度は、対照群と比べて有意差はなかった。また、入院翌日に抗 IgE 抗体に対する好塩基球の活性化能が回復した症例では、一血球あたりの血球内ヒスタミン濃度は増加したが、回復しなかった症例では低値のままであった。これらの結果から、アナフィラキシーでは、活性化した好塩基球は血液中から組織に移行し、血液中には活性化能のない未熟な好塩基球が残存している可能性が示唆された。翌日には、一部の症例で骨髄から成熟した好塩基球が動員され、活性化能を示す例が増加した可能性が考えられた。

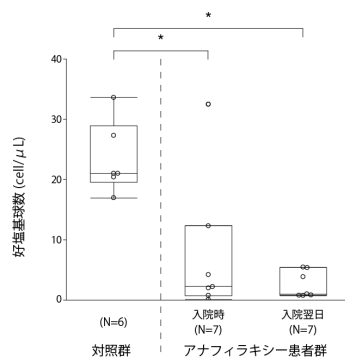


図1 好塩基球数

アナフィラキシー患者（入院時、入院翌日）および対照群の末梢血中の好塩基球数

(2) 好塩基球と臨床データとの関連

次に、アナフィラキシー患者の臨床データと好塩基球数、血球内ヒスタミン濃度との比較を行った。意識障害、難治性ショックなどの重症な全身症状を呈する患者群で好塩基球数が低い傾向があり、血球内ヒスタミン値と負の相関を示した。また、血清 FDP、D-dimer が高値であるほど血球内ヒスタミン値は低い傾向にあり、重症な全身症状を呈する患者では血清 FDP、D-dimer が有意に高値であることが明らかになった。

海外からの報告では、慢性特発性じんま疹において、末梢血中の好塩基球数が減少することが示されている。また、好塩基球数とじんま疹の活動性の間には負の相関があることも報告されている。しかし、アナフィラキシーにおける末梢血好塩基球の動態を検討した研究はない。アナフィラキシーにおける凝固障害には好塩基球の脱顆粒が関与し、さらに重症な全身症状とも関連している可能性が示唆された。

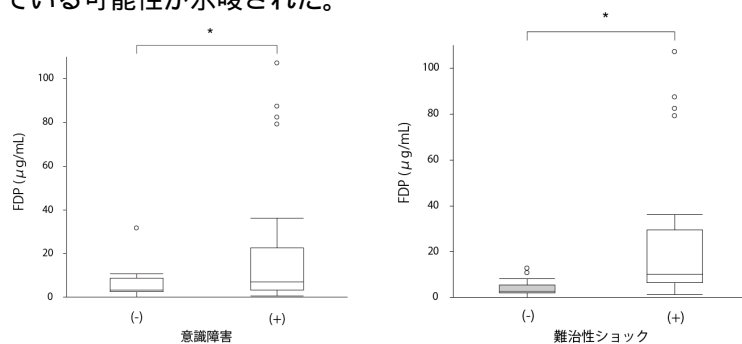


図2 凝固異常と臨床症状

アナフィラキシー患者における FDP 値と臨床症状

アナフィラキシー重症化因子の検討の一環として行った広島市消防局の病院前データ（救急車搬送症例）に基づいた後方視的コホート研究では、5年間の期間で624症例の患者を検証した。その結果、昆虫刺傷によるアナフィラキシーは、食物や薬剤と比較し、有意に重症な症状（低酸素血症、血圧低下）が多く入院率が高いことが示された。多変量解析による調整後も結果は同様であり、院外発症アナフィラキシーの原因において昆虫刺傷は重症化のリスク因子であること

が明らかとなった。

(3) 好塩基球活性化制御の検討

アナフィラキシー既往のある患者、健常者の末梢血を用いた好塩基球活性化試験では、患者群、対照群のいずれにおいても、造影剤の種類によらず CD203c の発現強度の増強は認められなかった。なお、いずれも陽性コントロールとしての抗 IgE 抗体に対する CD203c の発現強度の増強は認められ、non-responder ではなかった。さらに、同患者群の末梢血を用いて造影剤に対するヒスタミン遊離試験を実施した。いずれも抗 IgE 抗体に対するヒスタミン遊離は認められたが (responder) 造影剤に対するヒスタミン遊離の有意な変化も確認できなかった。以上、好塩基球活性化を細胞レベルで確認することができず、アレルギーに対する好塩基球活性化を制御可能な化合物の検索は実施できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaga Satoshi, Yanase Yuhki, Ishii Kaori, Ohshimo Shinichiro, Shime Nobuaki, Hide Michihiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Decreased intracellular histamine concentration and basophil activation in anaphylaxis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 78～83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoshi Yamaga, Yuhki Yanase, Kaori Ishii, Koji Hosokawa, Shinichiro Ohshimo, Nobuaki Shime, Michihiro Hide
2. 発表標題 Association between severity and coagulopathy in patients with anaphylaxis
3. 学会等名 40th International Symposium on Intensive Care & Emergency Medicine（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山賀聡之, 細川康二, 太田浩平, 村尾正樹, 三好磨耶, 久保富嗣, 大下慎一郎, 志馬伸朗, 廣橋伸之
2. 発表標題 アナフィラキシーにおける原因別の重症度, 転帰の検討 - 広島市消防局の検証データに基づいた後方視的コホート研究 -
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------