

平成 22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790691
 研究課題名（和文） ハチアレルギーにおける重症度マーカーの解析と IgE をターゲットとした治療の研究
 研究課題名（英文） Analysis of markers on the severity in patients with Hymenoptera allergy, and investigation of the treatment targeted IgE
 研究代表者
 平田 博国 (HIRATA HIROKUNI)
 獨協医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60326890

研究成果の概要（和文）：ハチアレルギー患者における重症度マーカーを解析するために、末梢血好塩基球からのLTC4、Histamine、PGD2の分泌を測定した。その結果、ハチアレルギー患者は健常人に比べ、ハチ毒特異的にLTC4及びHistamineの分泌亢進が認められたが、重症度との相関は得られなかった。

一方、ハチアレルギーマウスモデルによる抗IgE抗体の有効性について解析した結果、抗IgE抗体はハチ毒によって産生された血清総IgE値を減少させ、その効果持続期間は2～3週間以内であった。また、抗IgE抗体はアナフィラキシー症状の出現を抑え、脾細胞からのLTC4分泌やTh2型サイトカイン産生を抑制し、Th1型サイトカイン産生を誘導した。この結果、抗IgE抗体はアナフィラキシーの発症予防に有効である可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：ハチアレルギー、アナフィラキシー、抗IgE抗体、マウスモデル、ロイコトリエンC4、ヒスタミン、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトにおいて、ハチ再刺傷における全身アナフィラキシー反応の重症度を予測できるマーカーについて未だ報告がない。

(2) ハチアレルギー患者におけるハチ毒エキスをを用いた免疫療法の安全性および有効性

について、既に多数報告されている。しかし、より安全、簡便かつ経済的な治療に繋がる報告は未だない。

2. 研究の目的

(1) ハチアレルギー患者の検体を用いて、重症度の指標となりえるマーカーを網羅的に

解析することで、ハチ再刺傷における全身症状の出現状況を予測する。

(2) ハチアレルギーマウスモデルを作成し、IgE をターゲットとした新薬開発へ繋げるための研究を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト

ハチアレルギー患者における重症度を予測するマーカーを解析するために、スズメバチまたは、アシナガバチに刺され、血清ハチ特異的 IgE 抗体陽性 (RAST 法で class2 以上) の 12 例 {全身皮膚症状のみ (軽症) 3 例、呼吸器症状を呈した (中等症) 2 例、アナフィラキシーショック (重症) 7 例} の患者から末梢血好塩基球、及び単核球を採取した。これらの細胞に対しハチ毒エキス、または PMA + ionomycin で刺激し、1 時間後の好塩基球培養上清中のロイコトリエン C4、ヒスタミンとプロスタグランディン D2 濃度を EIA 法で、ハチ毒エキス刺激 24 時間後の好塩基球、及び単核球培養上清中の IL-4、IL-13 の濃度を ELISA 法で解析した。

(2) マウス

① ハチアレルギーマウスモデルを作成し、ハチ毒のアナフィラキシー反応における抗 IgE 抗体の有効性についての基礎的研究を行った。ハチアレルギーマウスモデルの作成において、8 周令の Balb/c マウス (雌) にハチ毒エキス (honey bee 10 μ g/ml) 0.25ml を腹腔内注射 (Day0) した。2 週間後採血し、血清総 IgE 値および honey bee 特異的 IgE 値を EIA または ELISA 法で測定した。また、同時に (honey bee; 10 μ g/ml) 0.25ml 腹腔内再投与し、30 分後の血清 LTC4 濃度について EIA 法で測定した。

次に、ハチアレルギーマウスモデルにおける抗 IgE 抗体の血清 IgE 値に与える影響について研究を行った。予め、Balb/c マウスに抗

IgE 抗体 20 μ g/ml 0.5ml を腹腔内投与し、1 週間後にハチ毒エキス (honey bee; 10 μ g/ml) 0.25ml を腹腔内注射 (Day0) した。Day7, 14, 21, 28 に採血を施行し、経時的に血清総 IgE 値を測定した。

② 更に、ハチ毒 (wasp) のアナフィラキシー反応における抗 IgE 抗体の有効性について、in vivo および in vitro に大別して解析した。

In vivo; ハチアレルギーマウスモデル (wasp) の作成において、8 周令の Balb/c マウス (雌) にハチ毒エキス (wasp; 10 μ g/ml) 0.25ml を Day0 および Day14 に腹腔内注射 (感作) し、Day27 に抗 IgE 抗体 10 μ g/匹、または対照として抗 IgG 抗体 10 μ g/匹を腹腔内投与した。そして、Day28 に wasp; 10 μ g/ml 0.25ml 腹腔内投与前および投与 30 分後に体温測定と、血清の LTC4 濃度を測定 (EIA 法) するために採血を行った。

In Vitro; wasp で感作された抗 IgG 抗体または抗 IgE 抗体処置マウス脾細胞 (1×10^6 個/ml) において、wasp (10 μ g/ml) で刺激・培養した。そして、48 時間後に培養上清中のサイトカイン (IL-4, IL-13, IFN- γ) 産生量について ELISA 法で解析した。

4. 研究成果

(1) 6 例 (軽症 2 例、中等症 1 例、重症 3 例) の患者において、抗原 (ハチ毒エキス) 特異的にロイコトリエン C4、及びヒスタミン濃度の著名な産生増加が認められたが、重症度と相関が認められなかった。また、抗原刺激による単核球からのサイトカイン産生は、全てのハチアレルギー患者において認められなかった。一方、残り 6 例の患者ではロイコトリエン C4 とヒスタミン産生亢進が認められなかった。その理由として、検査時においてハチ刺傷 1 か月以内もしくは 2 週間以内にステロ

イド投与されていることが考えられた。ハチアレルギーの診断における好塩基球からのロイコトリエンC4やヒスタミン値を測定することは、ハチアレルギーの補助的診断の一つの方法として重要であると考えられた。しかし、重症度マーカーとして将来的に使用できるかどうかを明らかにすることはできなかった。今後、症例数を増やすことと共に、上記化学伝達物質以外にトリプターゼや血小板活性化因子 (PAF) の測定や、各種サイトカイン産生においてもメッセージレベルで詳細に解析する必要があると考えられた。

(2)①ハチアレルギーマウスモデルでは、対照群 (生理食塩水) と比較し、総IgE値とhoney bee 特異的IgE値は高値を示した。また、マウスモデルでは、対照群 (生理食塩水投与) と比較し、honey bee再投与30分後の血清ロイコトリエンC4濃度の有意 ($p < 0.05$) な亢進 (281.4 pg/ml vs 55.9 pg/ml) が認められた。更に、抗IgE抗体の体内動態について解析した結果、抗IgE抗体非前処置群では総IgE値 107.7 pg/ml に対し、前処置群では 54.6 pg/ml と有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。また、前処置群において血清総IgE値がDay14では 62.4 pg/ml 、Day21では 127.4 pg/ml に改善した。これらの結果より、抗IgE抗体はハチ毒によって産生された血清総IgE値を減少させ、その持効果持続期間は2~3週間と考えられた。

②In vivo; 抗IgG抗体処置群ではwasp投与後の体温は投与前と比較し、有意 ($p < 0.05$) な低下 (37.7 ± 0.23 vs $37.2 \pm 0.36^\circ\text{C}$) を認めた。一方、抗IgE抗体処置群では、wasp投与前および投与後の体温に変化 (37.8 ± 0.33 vs $37.8 \pm 0.23^\circ\text{C}$) は認められなかった。また、wasp投与30分後の血清LTC4値は、抗IgG抗体処置群

に比べ抗IgE抗体処置群で、有意 ($p < 0.05$) に抑制 (180.7 ± 10.5 vs $28.1 \pm 14.3 \text{ pg/ml}$) された。

In Vitro; 抗IgE抗体処置群では抗IgG抗体処置群に比較し、脾細胞からのIL-13産生の有意 ($p < 0.05$) な抑制 (8.4 ± 2.5 vs $18.2 \pm 4.8 \text{ pg/ml}$) およびIFN- γ 産生の有意 ($p < 0.05$) な促進 (13.5 ± 2.3 vs $6.5 \pm 3.8 \text{ pg/ml}$) が認められた。一方、IL-4産生において、これらの抗体処置群間で有意な違いは認められなかった。

これらの結果から、抗IgE抗体はハチアレルギーにおける全身アナフィラキシー反応の出現を抑え、更にLTC4分泌やTh2型サイトカイン産生を抑制し、Th1型サイトカイン産生を誘導することが考えられた。以上より、抗IgE抗体はハチアレルギーのアナフィラキシーの発症予防に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1 ; Fukushima Y, Hirata H, Maezawa R, Yoshida N, Hayashi Y, Arai R, Fukushima F, Sugiyama K, Kurasawa K, Ishii Y, Fukuda T. A case of pulmonary benign metastasizing leiomyoma occurring after uterine myomectomy Dokkyo Journal of Medical Sciences. 37;2010. in press (査読有)

2 ; Fukushima Y, Kamiya K, Tatewaki M, Fukushima F, Hirata H, Ishii Y, Fukuda T. A patient with bronchial asthma in whom eosinophilic bronchitis and bronchiolitis

developed during treatment. Allergology International. 159 ; 87-91, 2010 (査読有)

3 ; Tatewaki M, Hirata H, Fukushima F, Kamiya K, Hayashi Y, Arai R, Anzai M, Maezawa R, Sugiyama K, Fukushima Y, Kurawara K, Honnma K, Ishii Y, Fukuda T. A case of inflammatory lung disease and retroperitoneal fibrosis attributed to systemic IgG4-related disease. Dokkyo Journal of Medical Sciences. 37 ; 31-34, 2010 (査読有)

4 ; Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Tokuhisa T, Fukuda T. Effects of Th2 pulmonary inflammation in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Respirology. 13:788-798, 2008. (査読有)

5 ; 平田博国、福田健: アレルゲン免疫療法の意義と施行法 : ハチ・アレルギー. アレルギー, 57 巻 5 号 P491-8, 2008. (査読無)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 博国 (HIRATA HIROKUNI)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 6 0 3 2 6 8 9 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :