

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08774

研究課題名(和文) IgE受容体架橋形成の定量的測定によるI型アレルギー検査法の開発

研究課題名(英文) Development of new Type I allergy test based on the detection of IgE receptor cross-linking by the allergen

研究代表者

松尾 裕彰 (Matsuo, Hiroaki)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：60346385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：I型アレルギーの検査として、抗原特異IgE抗体の測定が広く行われている。しかし、症状誘発に必須である高親和性IgE受容体の架橋を形成することができないIgE抗体が検出されることから偽陽性が認められる。本研究では、Amplified luminescence proximity homogeneous assay法を利用して、IgE受容体の架橋に基づく精度の高い新しい抗原特異IgE抗体検出方法の開発を試みた。I型アレルギーの模擬患者血清および抗原を用いて至適条件を検討した結果、ヒト血清中の100 ng/mLの抗原特異IgE抗体を検出できる方法を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臨床で実施されているI型アレルギーの抗原特異IgE検査は、抗原に結合するIgE抗体を検出していることから偽陽性が認められる問題がある。抗原が肥満細胞表面のIgE受容体上のIgE抗体に結合し、2分子以上のIgE受容体が架橋されるとアレルギー症状の原因物質であるヒスタミンが遊離することから、本研究ではIgE受容体の架橋形成を検出する方法を新たに開発した。この新しい方法を臨床応用することにより、患者血清を用いて原因アレルゲンの迅速特定が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)： Measurement of antigen-specific IgE antibodies is widely used as a test for Type-I allergy. However, false positive results are observed because IgE antibodies that are unable to form cross-linking of high-affinity IgE receptors, which are essential for allergic symptom induction, are detected. In this study, we tried to develop a new, highly accurate antigen-specific IgE antibody detection method based on cross-linking of IgE receptors using the Amplified luminescence proximity homogeneous assay (ALPHA) method. As a result, we have developed the ALPHA method to detect 100 ng/mL of antigen-specific IgE antibodies in human serum.

研究分野：食物アレルギー

キーワード：抗原特異IgE IgE受容体 架橋 定量法

1. 研究開始当初の背景

花粉症やダニアレルギーについては、根治療法として抗原特異舌下免疫療法が確立され、治療用抗原が医薬品として市販されている。さらに、ピーナツアレルギーについても、経口免疫寛容を誘導する抗原特異免疫療法の有効性が臨床試験で示され、医薬品として開発が進められている。また、原因抗原の投与量を短期間で上昇させる急速経口免疫療法の有効性も示されている。しかし、食物アレルギーの原因は多岐に渡り、それぞれ個別の原因食物に対する根治療法が確立されるまでには、かなりの時間を要すると推測される。したがって、食物アレルギー治療として必要最小限の除去食療法が選択されることが多い。小児患者においては、過度な食物除去は発育障害やQOLの低下を招くため、とりわけ正確に診断することが重要である。我々はこれまでに、小麦による食物依存性運動誘発アナフィラキシーの原因抗原を明らかにし、各精製抗原を利用した特異 IgE 検査により、血清学的小麦アレルギーの検査精度が上昇することを明らかにした^{1, 2)}。しかしながら、抗原特異 IgE 検査の限界として、抗原に結合するがアレルギー症状を誘発しない IgE 抗体を検出している点が挙げられる。肥満細胞が活性化され、ケミカルメディエーターの遊離が起こり、アレルギー症状が誘発されるためには、抗原に対して2分子以上の IgE が結合し、IgE 受容体を架橋する必要がある。抗原特異 IgE が存在したとしても、架橋を形成できる2つ目の IgE が存在しない場合や構造的な障害により2分子の IgE が結合できない場合は、肥満細胞は活性化されずアレルギー反応は誘発されない。現行の抗原特異 IgE 検査では、抗原に結合する IgE 抗体を検出するため、架橋による肥満細胞の活性化を誘引できない IgE 抗体も陽性となる。この偽陽性を排除するために、好塩基球活性化試験 (BAT: Basophil Activation Test) や好塩基球ヒスタミン遊離試験 (HRT: Histamine Release Test) が実施される。これらの試験は、新鮮な患者好塩基球を必要とするため、検査のたびに採血が必要であり、また検査項目が増えると採血量も増えるため患者の負担となる。このような背景から、患者負担が少なく、かつ検査精度の高い IgE 依存性アレルギーの新規検査法の開発が求められている。

2. 研究の目的

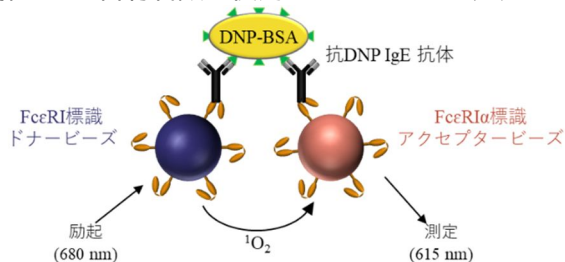
本研究では IgE 受容体の架橋状態の検出を基盤とした新規抗原特異 IgE 抗体定量法を確立することを目的とし、肥満細胞表面上で実際に起きている IgE 受容体架橋反応を *in vitro* で再現し、200 nm 程度の分子の近接を検出することができる Amplified luminescence proximity homogeneous assay (ALPHA)法³⁾を利用した抗原特異 IgE 検出法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1)加水分解コムギ (グルパール 19S) による小麦依存性運動誘発アナフィラキシー患者血清を用いた ALPHA 法による抗原特異 IgE の検出

リコンビナントヒト Fc RI 受容体 鎖を ALPHA ドナービーズおよびアクセプタービーズ (PerkinElmer 社) に標識し、両ビーズと加水分解コムギ含有石鹼の使用により WDEIA を発症した患者血清を混合した。その後、終濃度 1 μg/mL の抗ヒト IgE 抗体 (Dako 社) を添加し、6 時間インキュベート後にプレートリーダー (EnspireTM, PerkinElmer 社) を用いて 680 nm の励起光を照射し 615 nm の発光を測定した。

グルパール 19S を抗原として用いて同様の解析を実施した。ウェル内で Fc RI 鎖標識 ALPHA ドナービーズ、アクセプタービーズおよび患者血清を混合した後、グルパール 19S (終濃度 0.001-1 μg/mL) を添加した。室温でインキュベーションした後、発光をプレートリーダーにて測定した。



(2)模擬 I 型アレルギー患者血清および抗原を用いた ALPHA 法による抗原特異 IgE の検出

図1 ALPHA 法による架橋の検出

2,4-ジニトロフェノール標識牛血清アルブミン (DNP-BSA) を抗原に、抗 DNP IgE 抗体を抗原特異 IgE 抗体として用いた。(1)の方法と同様の操作により、混合するビーズの比率、血清濃度、インキュベーション時間を検討した。

4. 研究成果

(1)加水分解コムギ (グルパール 19S) による小麦依存性運動誘発アナフィラキシー患者血清を用いた ALPHA 法による抗原特異 IgE の検出

Fc RI 受容体 鎖を標識した ALPHA ドナービーズとアクセプタービーズに患者血清を添加し、各ビーズに IgE を結合させた後、抗ヒト IgE 抗体を添加すると、架橋により各ビーズが近接し ALPHA シグナルが得られた。この結果より、ALPHA 法によりヒト IgE と抗ヒト IgE 抗体による Fc RI 受容体の架橋形成が検出できることが示された。次に、グルパール 19S 抗原溶液（終濃度 0.001-1 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加して IgE 抗体の架橋形成反応を行ったが、ALPHA シグナルは検出されなかった。患者血清中のグルパール 19S 特異 IgE 抗体量が少なく、架橋数が少なかったことが、シグナルが検出されない理由と考えられたため、模擬抗原と模擬患者血清を用いて条件検討することとした。

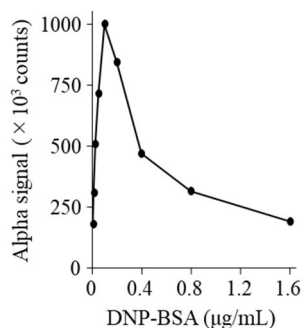
(2) 模擬 I 型アレルギー患者血清および抗原を用いた ALPHA 法による特異 IgE の検出

2,4-ジニトロフェノール標識牛血清アルブミン (DNP-BSA) を抗原に、抗 DNP-IgE 抗体を抗原特異 IgE 抗体として用いた。抗 DNP-IgE 抗体はマウスで作成されたものであるため、初めにヒト Fc RI 受容体 鎖へ結合することを確認した。

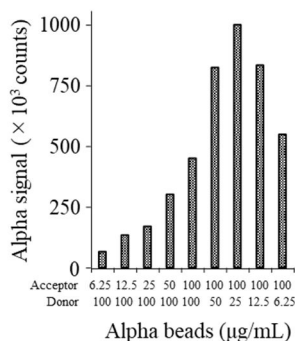
次に、ALPHA 法による抗 DNP IgE の検出を最適化するために、DNP-BSA 抗原濃度、ドナーおよびアクセプタービーズ量、およびインキュベーション時間を評価した。緩衝液に溶解した 0.00625 ~ 1.6 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の DNP-BSA 抗原と抗 DNP IgE 抗体 (0.2 $\mu\text{g/mL}$) を 96 穴プレートに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その溶液に、10 μL のビーズ混合物 (アクセプタービーズ 100 $\mu\text{g/mL}$, ドナービーズ 25 $\mu\text{g/mL}$) を加え、24 時間インキュベートした。その結果、ALPHA シグナルは 0.1 $\mu\text{g/mL}$ で最も高い値を示し、さらに高濃度になると低下した。これは、抗原濃度が高いと、個々の IgE に結合し架橋形成数が減少する為であると考えられる。

ビーズの濃度を検討するために、DNP-BSA (0.1 $\mu\text{g/mL}$) と抗 DNP IgE (0.2 $\mu\text{g/mL}$) 濃度を固定し、アクセプタービーズ:ドナービーズを 1:5 ~ 5:1 に変化させたときのシグナル値を測定した。その結果、4:1 (100:25 $\mu\text{g/mL}$) で混合した時に最も高いシグナル値が得られた。インキュベーション時間については、DNP-BSA (0.1 $\mu\text{g/mL}$) と抗 DNP IgE (0.2 $\mu\text{g/mL}$) ビーズ混合物 (アクセプター100 $\mu\text{g/mL}$, ドナー25 $\mu\text{g/mL}$) として、1-48 時間インキュベートした。シグナル値は 24 時間インキュベーションまで時間と共に徐々に増え、その後プラトーに達したことから、24 時間が至適インキュベーション時間であることが分かった。今回決定した条件で、緩衝液中の抗 DNP-

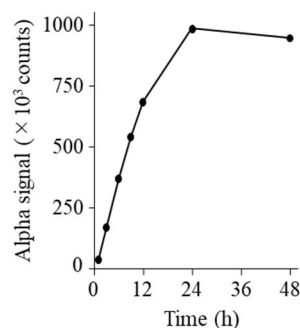
A. アレルゲン濃度)



B. ビーズ濃度)



C. インキュベーション時間



IgE を測定した結果、0.1

$\mu\text{g/mL}$ の抗原特異 IgE を検出できることが分かった。

図2 緩衝液中の抗 DNP-IgE の検出条件検討結果

次に、決定した条件を用いてヒト血清中の抗原特異 IgE の検出を試みた。本実験では、市販のヒト血清に抗 DNP IgE 抗体を添加し、I 型アレルギー患者の模擬血清サンプルとした。前述した条件検討で定めた条件で、抗 DNP IgE (0.1 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$) を含むヒト血清を測定した結果、血清存在下においても、濃度依存的にシグナル数が増加したが、同じ抗 DNP IgE 濃度での緩衝液中のシグナル数の 1% 未満であった。今回、ヒト血清存在下での抗 DNP IgE の検出限界は、0.1 $\mu\text{g/mL}$

と見積もられた。この感度では臨床的にⅠ型アレルギーを評価することは困難であるため、今後血清中の干渉成分を除去するなど検出感度の上昇を試みる必要がある。

<引用文献>

- 1) Morita E, Matsuo H, Chinuki Y et al. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis -importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis-. *Allergol Int.* 2009;58(4):493-8.
- 2) Yokooji T, Okamura Y, Chinuki Y et al. Prevalences of specific IgE to wheat gliadin components in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergol Int.* 2015;64(2):206-8.
- 3) Burlein C, Bahnck C, Bhatt T et al. Development of a sensitive amplified luminescent proximity homogeneous assay to monitor the interactions between pTEFb and Tat. *Anal Biochem.* 2014;465:164-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koga Yuki, Yokooji Tomoharu, Ogino Ryohei, Taogoshi Takanori, Takahagi Shunsuke, Ishii Kaori, Chinuki Yuko, Morita Eishin, Hide Michihiro, Matsuo Hiroaki	4. 巻 71
2. 論文標題 A novel detection method for cross-linking of IgE-receptors by autoantibodies in chronic spontaneous urticaria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 94 ~ 102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2021.08.007	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 -

1. 著者名 Morita Eishin, Matsuo Hiroaki, Kohno Kunie, Yokooji Tomoharu, Yano Hiroyuki, Endo Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 A Narrative Mini Review on Current Status of Hypoallergenic Wheat Development for IgE-Mediated Wheat Allergy, Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 954 ~ 954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods12050954	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 0件）

1. 発表者名 古賀祐基, 横大路智治, 荻野龍平, 埜越崇範, 高萩俊輔, 石井香, 千貫祐子, 森田栄伸, 秀道広, 松尾裕彰
2. 発表標題 高親和性IgE受容体の架橋検出による自己免疫性蕁麻疹の新規検査法の有用性
3. 学会等名 第23回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀祐基, 内藤瑞季, 石井聡一郎, 横大路智治, 荻野龍平, 埜越崇範, 松尾裕彰
2. 発表標題 高親和性IgE受容体を架橋する抗原特異的IgE抗体の新規検出法の構築
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	埜越 崇範 (Takanori Taogoshi) (00457235)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	

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
---------	---------