

**慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者と健常人における抗 IgE 自己抗体濃度と  
抗 IgE 自己抗体による高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) 架橋能の差異**  
**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**

伊崎聡志<sup>1), 2), 3)</sup>、豊島翔太<sup>1), 2), 4)</sup>、遠藤嵩大<sup>1), 2), 3)</sup>、柏倉淳一<sup>5)</sup>、布村 聡<sup>6)</sup>、中村亮介<sup>7)</sup>、秋山晴代<sup>8)</sup>、葉山惟大<sup>1), 2), 3)</sup>、鐘ヶ江加寿子<sup>1), 2), 4)</sup>、藤澤大輔<sup>1), 2), 3)</sup>、畠田優子<sup>1), 2), 3)</sup>、藤田英樹<sup>1), 2), 3)</sup>、照井 正<sup>1), 2), 3)</sup>、岡山吉道<sup>1), 2), 4)</sup>

Satoshi IZAKI<sup>1), 2), 3)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1), 2), 4)</sup>, Takahiro ENDO<sup>1), 2), 3)</sup>, Jun-ichi KASHIWAKURA<sup>5)</sup>, Satoshi NUNOMURA<sup>6)</sup>, Ryoussuke NAKAMURA<sup>7)</sup>, Haruyo AKIYAMA<sup>8)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1), 2), 3)</sup>, Kazuko KANEGAE<sup>1), 2), 4)</sup>, Daisuke FUJISAWA<sup>1), 2), 3)</sup>, Yuko HATADA<sup>1), 2), 3)</sup>, Hideki FUJITA<sup>1), 2), 3)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1), 2), 3)</sup>, Yoshimichi OKAYAMA<sup>1), 3), 4)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、<sup>2)</sup>日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、<sup>3)</sup>日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、<sup>4)</sup>日本大学医学部 医学教育センター、<sup>5)</sup>北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学研究室、<sup>6)</sup>佐賀大学医学部 分子医化学分野、<sup>7)</sup>国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部、<sup>8)</sup>帝京平成大学薬学部 薬学科

**[要旨]**

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者血清中の抗 IgE 抗体濃度は健常人に比較して統計学的に有意に高かった ( $p$  値  $< 0.0001$ )。抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能も CSU 患者群の方が NC 群よりも架橋能が統計学的に有意に高かった ( $p$  値  $= 0.0106$ )。従って日本人の CSU の病態には抗 IgE 抗体が関与していると考えられる。

**[背景]**

慢性特発性蕁麻疹(chronic spontaneous urticarial, CSU)は、原因が不明な 6 週間以上持続する蕁麻疹であり、マスト細胞の活性化が病態の本態であるが、マスト細胞の活性化機構は解明されていない。私達は、CSU に関しては、substance P の新規受容体 MrgX2 が重症 CSU 患者のマスト細胞に高発現していることおよび substance P のみならず好酸球顆粒タンパクが皮膚マスト細胞上の MrgX2 を介して活性化することを報告した。<sup>1)</sup> 一方、CSU 患者血清の 5~10%に IgE に対する自己抗体(抗 IgE 抗体)、30~45%に高親和性 IgE 受容体(FcεRI)α 鎖に対する自己抗体(抗 α 鎖抗体)が存在することが報告されているが、<sup>2)</sup> これら自己抗体によるマスト細胞活性化能は明らかにされてい

ない。さらにこれら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。

### [目的]

CSU 患者の抗 IgE 抗体、抗  $\alpha$  鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを第一の目的とした。

### [対象及び方法]

#### (1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

#### (2) 対象

CSU 患者 108 人、健常者コントロール(NC) 56 人の血清から IgG 分画を精製した。

#### (3) 抗 IgE 自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EX を用いて、患者の血清から IgG 分画を精製した。maxisorp plate に 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のヒト IgE、myeloma を 100  $\mu\text{L}$  添加し、4°Cで一晩静置して固相化した。洗浄液 (Tween 20 を 0.1% になるように加えた TBS) でプレートを 4 回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100  $\mu\text{L}$  のブロッキング液 (FBS を PBS に溶解し 10% FBS とした) を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した。PBS で 10 倍に希釈した精製 IgG 分画を 100  $\mu\text{L}$  加え、室温で 2 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、PBS で 1 万倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100  $\mu\text{L}$  加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した後、3、3'、5、5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate system を用い発色させた。2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectrometer を用いて 450 nm の吸光度を測定した。また定量的に行うためにヒト IgG を倍々希釈し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を ELISA で測定した。プレート間の補正のためこの基準となる精製 IgG の抗 IgE 抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を算出した。

#### (4) 抗 $\alpha$ 鎖自己抗体濃度の測定

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1  $\mu$ g/mL のリコンビナント可溶性  $\alpha$  鎖を 100  $\mu$ L 加え、4°Cで一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  抗体 (clone CRA2)を用いて作成した。

#### (5) 抗 $\alpha$ 鎖抗体および抗 IgE 抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能の測定

IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法を用い、CSU 患者群と NC 群の抗  $\alpha$  鎖抗体および抗 IgE 抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能(マスト細胞活性化能)を測定し、それぞれを比較した。図 1 は、改良型 EXiLE 法の原理である。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性 IgE 受容体 Fc $\epsilon$ RI と NF-AT-responsive ルシフェラーゼ reporter 遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗 Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  鎖自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗 IgE 自己抗体の場合、IgE で感作した後、患者の精製 IgG を添加する。

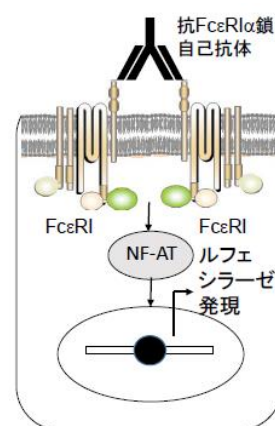


図 1

#### (6) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney *U* test、非連続変数は 2-sided Fisher's exact test を行った。*p* 値は、0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

#### [結果]

抗 IgE 抗体濃度は、CSU 患者群の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値だった ( $p < 0.0001$ , cutoff value: 0.558  $\mu$ g/mL)。抗 IgE 抗体濃度の cutoff 値以上と未満の CSU 患者の臨床的特徴を比較すると、cutoff 値以上の患者で罹病期間が有意に長かった。抗  $\alpha$  鎖抗体濃度は両者間に統計学的な有意差はなかった。EXiLE 法によるマスト細胞活性化能は CSU 患者群の抗 IgE 抗体の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値であった ( $p = 0.0106$ 、図 2)。

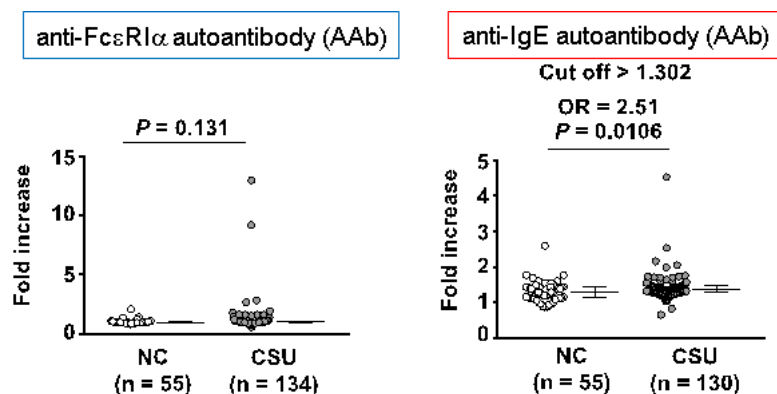


図2 抗 $\alpha$ 鎖抗体と抗IgE抗体によるマスト細胞活性化能  
CSU患者の抗IgE自己抗体によるFcεRIの架橋能がNC群に比較して有意に高いことが判明した(B)。非刺激のfold increaseを1とした。

#### [考察]

CSU患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC群と比較して有意に高値であったことから、CSU患者群の抗IgE抗体は、NC群と何か質的な違いがあることが示唆された。CSU患者において抗IgE抗体濃度と抗IgE鎖抗体によるマスト細胞活性化能には相関がなかったことから抗IgE抗体の一部がマスト細胞活性化能を有していることが示唆された。マスト細胞活性化能の機序としては、抗IgE抗体のエピトープの違い、avidityの違いやアイソタイプの違いなど様々な要因の結果である。

#### [結論]

CSU患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC群と比較して有意に高値であり、CSUの病態に関与していることが示唆された。

#### [参考文献]

- 1) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, Nunomura S, Hayama K, Terui T, Ra C, Okayama Y: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticarial. J Allergy Clin Immunol. 2014; 134: 622-633.
- 2) 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. 2016; 139: 1772-1781.
- 3) Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, Teshima R: A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. Allergy. 2010; 65: 1266-1273.

<sup>4)</sup> Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Terui T, Okayama Y: 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(3): 342-351.