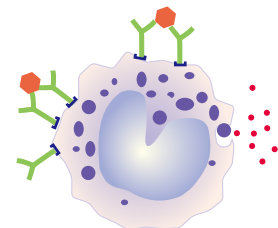


フローサイトメトリーで見る アレルギー反応

- Allergenicity Kitを用いたヒト全血での評価 -



- ◎ アレルゲン反応性を、好塩基球のCD203cの発現量変化で評価
- ◎ 抗原特異的IgE測定やヒスタミン遊離試験に比べ、臨床症状と高い相関性
- ◎ 全血を用いた試験のため、生理条件に近い評価が可能
- ◎ アレルゲンが水溶性ならば、いずれの物質も評価可能
- ◎ EDTA全血、ヘパリン全血のどちらでも100μL/sampleで測定可能

アレルギー検査において、抗原特異的IgEの検査は頻用されるものの、症状と必ずしも一致しない場合があります。また特異度が高いアレルギー評価法の一つにプリックテストや経口負荷試験がありますが、アナフィラキシーショックをおこす可能性があり、安全性の問題を否定できません。

Allergenicity Kitは、全血にアレルゲンを添加して好塩基球を *in vitro* で活性化し、好塩基球の活性化マーカーであるCD203cの発現量の変化をフローサイトメトリーにて測定する試薬です(図1)。

アレルギー反応の検出において、フローサイトメトリーを用いた好塩基球の活性化の検出は、抗原特異的IgE測定やヒスタミン遊離試験(HRT)より高感度・高特異度との報告があります¹⁾(図2)。なお、HRTでは分離した好塩基球を用いて測定するため、体内環境を反映していない可能性が指摘されています。

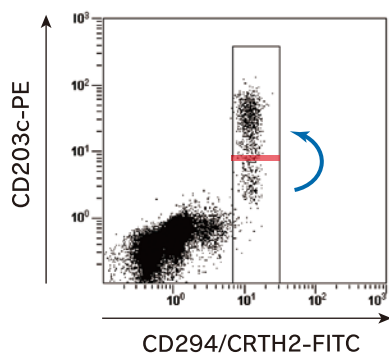


図1：好塩基球の活性化とCD203cの発現
抗原刺激を行う事で、好塩基球のCD203cの発現量が上昇します。

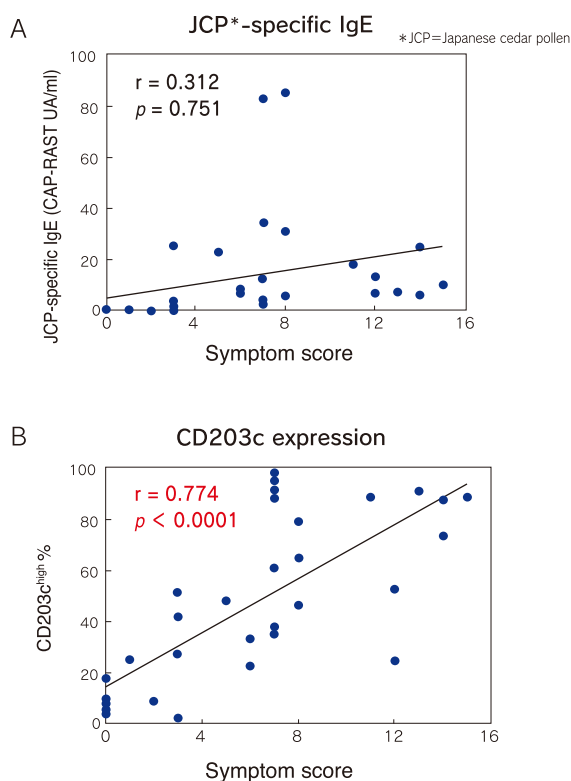


図2：アレルギー症状と各評価値との相関

スギ花粉エキスによる好塩基球表面上のCD203cの発現量変化(B)は、抗原特異的IgE量(A)に比べて症状との相関性が高い事が示されました。

*データは国立病院機構三重病院 藤澤隆夫 先生、ならびに株式会社ビー・エム・エル様よりご提供頂きました。

アレルギーとは？

アレルギーで最も良く知られているのは、IgEが関与するI型過敏症(即時型過敏症)です。現在では、花粉症、食物アレルギー、アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患を有する患者が人口の3割以上いると云われています。

外部から取り込まれたアレルゲンは、まず抗原提示細胞(APC)により分解・提示され、T細胞を活性化します。活性化T細胞はB細胞を活性化し、抗体産生を誘導します。液性免疫の誘導にかかわ

るTh2細胞が産生するIL-4は、IgE産生に必須です。IgEはアレルゲンと反応し、好塩基球 (Basophil) や肥満細胞 (Mast cell) の細胞表面に結合します。IgEとアレルゲンの複合体は好塩基球や肥満細胞のIgE受容体のクラスターリングを促進し、細胞を活性化することでヒスタミンやロイコトリエンC4などの炎症メディエーターの放出を誘導し、即時型のアレルギー症状を引き起こします^{2) 3)} (図3)。

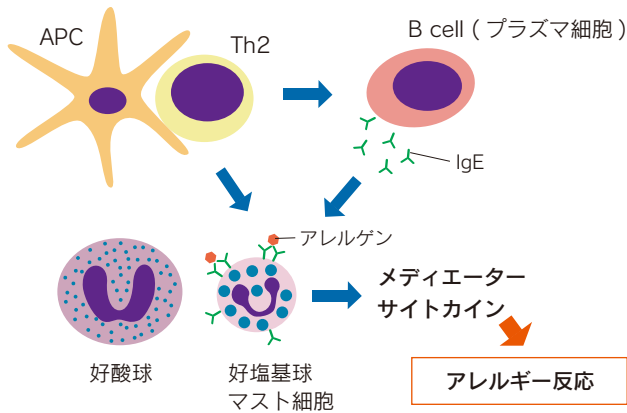


図3：アレルギー反応に関わる白血球

アレルギーの検査について

血清IgE量の測定はアレルギーの診断に多用されますが、アレルギー性症状と必ずしも一致しないと考えられています。一方、特異度の高いアレルギーの検査方法としてプリックテストや経口負荷試験が挙げられますが、時にアナフィラキシーを惹起する場合があります、安全な方法とは言えません。これらの事より、安全かつ正確なアレルギーの検査方法が求められています。

好塩基球は末梢血白血球に1%弱存在し、末梢組織においてアレルギー反応に関わるマスト細胞と似た性質を有します。IgEの受容体 (FcεRI) の発現、活性化に伴うヒスタミンなど炎症メディエーターの放出、Th2型サイトカイン (IL-4, IL-13) を産生することから、血中のマスト細胞と言われています。

アレルゲン-IgE複合体は好塩基球のFcεRIのクラスターリングを誘導し、好塩基球を活性化します。活性化した好塩基球では、細胞表面上のCD63やCD203cの発現が直ちに上昇する事が報告されています。CD203cは好塩基球の定常状態において低レベルで発現しており、活性化に伴いその細胞表面上の発現量が増えます⁴⁾。一方、CD63は抗体の反応性が二様性になる事が有るため、結果の解釈が難しい場合があります。よってCD203cの方が、好塩基球活性化の評価に適すると考えられています。

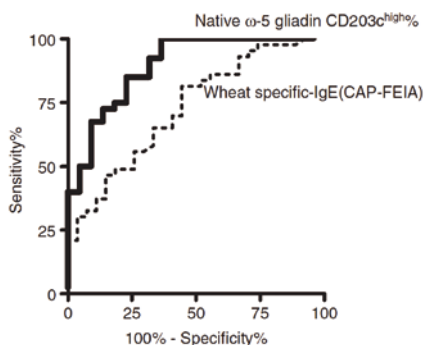


図4：ROC curve

小麦アレルギー患児のアレルギー評価における抗原特異的 IgE量 (破線) と好塩基球上の CD203c の発現量 (実線) との比較

* 図4, 5は国立病院機構三重病院 藤澤隆夫先生、ならびに株式会社ビー・エム・エル様よりご提供頂きました。

アレルギー反応の評価における好塩基球CD203cの測定

種々のアレルギー反応の評価において、*in vitro* でアレルゲンにより活性化した好塩基球 CD203c の発現変化測定の有用性について Allergenicity Kit を用いた検討が行われています。

小麦アレルギーを発症した患児のアレルギー反応の評価について、血清中総 IgE、小麦特異的 IgE、そして Allergenicity Kit による好塩基球の CD203c の発現状態について比較検討が行われました。その結果、総 IgE の検出はアレルギー症状と関連しませんでした。小麦特異的 IgE と好塩基球の CD203c の発現上昇はアレルギー反応の有意な評価方法である事が示されました。またこのとき、好塩基球の CD203c の発現評価は抗原特異的 IgE の検出に比べ感度、特異度共に優れていることが示されました⁵⁾ (図4)。

スギ花粉症患者を対象に抗原特異的 IgE 力価を測定したところ、アレルギー症状 (JRQLQ No. 1 スコア) との相関がほとんどないことが示されました ($r = 0.312, p = 0.751$)。一方、好塩基球における CD203c の発現変化による評価では、アレルギー症状と高い相関が示されました ($r = 0.774, p < 0.0001$) (図2)。また、アレルギー治療過程における抗原特異的 IgE、好塩基球のヒスタミン遊離試験、CD203c の発現を比較した結果、抗原特異的 IgE や好塩基球のヒスタミンの遊離は治療前に比べて低下が見られなかったものの、CD203c の発現は減少しました¹⁾⁶⁾ (図5)。また卵アレルギー、牛乳アレルギー患児においても、CD203c の発現量は IgE の測定に比べ疾患との相関が高いことが示されています⁷⁾。

これらの報告より、種々のアレルゲンに対するアレルギー反応の評価として好塩基球の CD203c の発現変化を測定する事は、既存の IgE 測定法に比べて有用であり、さらには、アレルギーの治療効果の判断にも寄与する可能性が示されました。なお、Allergenicity Kit は欧州では臨床診断薬として承認されています。

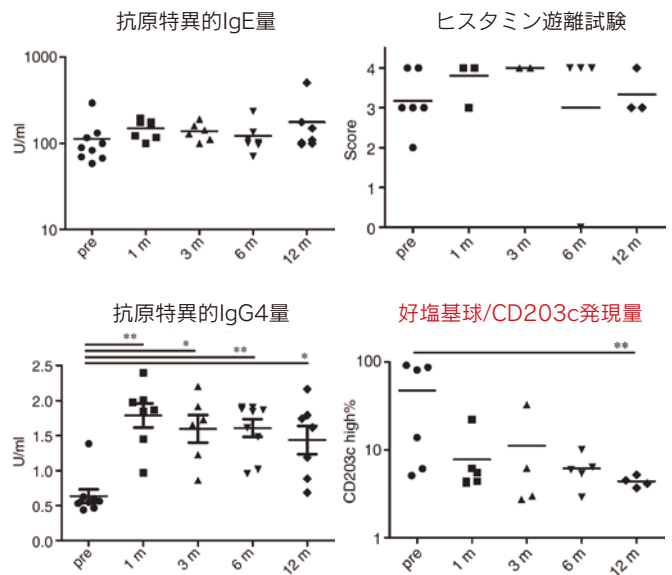


図5：スギ花粉症の治療期間と各種マーカーの比較

参考文献

1. Fujisawa, T., et al., Allergol. Int. 58, 163, 2009, PMID: 19390237
2. Stone, K. D., et al., J.Allergy Clin. Immunol. 125 Suppl. 2, S73, 2010, PMID: 20176269
3. Schneider, E., et al., Eur. Cytokine Netw. 21, 142, 2010, PMID: 20837449
4. Bühring, H.J., et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 133, 317, 2004, PMID: 15031605
5. Tokuda, R., et al., Allergol. Int. 58, 193, 2009, PMID: 19240377
6. Nagao, M., et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 146 Suppl. 1, 47, 2008, PMID 18504407
7. Sato, S., et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 152 Suppl. 1, 54, 2010, PMID 20523064

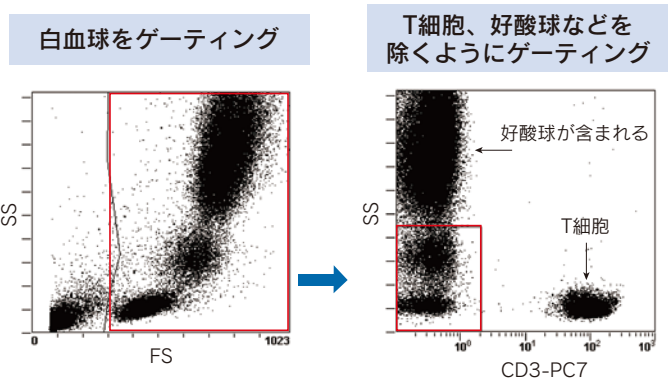
Allergenicity Kit による測定例

キット構成

- フローサイトメトリー用抗体： CD294/CRTH2-FITC, CD203c-PE, CD3-PC7
- サンプル処理バッファー： 活性化バッファー (EDTA血用), 反応停止液、溶血液、固定液
- ポジティブコントロール： 抗IgE抗体

好塩基球は白血球の1%弱ほどしかなく、また散乱光特性がリンパ球や単球に近いため、CD203cの発現変化だけでは好塩基球の活性化を正確に評価する事が困難です。正確な活性化測定には、好塩基球を区別する必要があります。

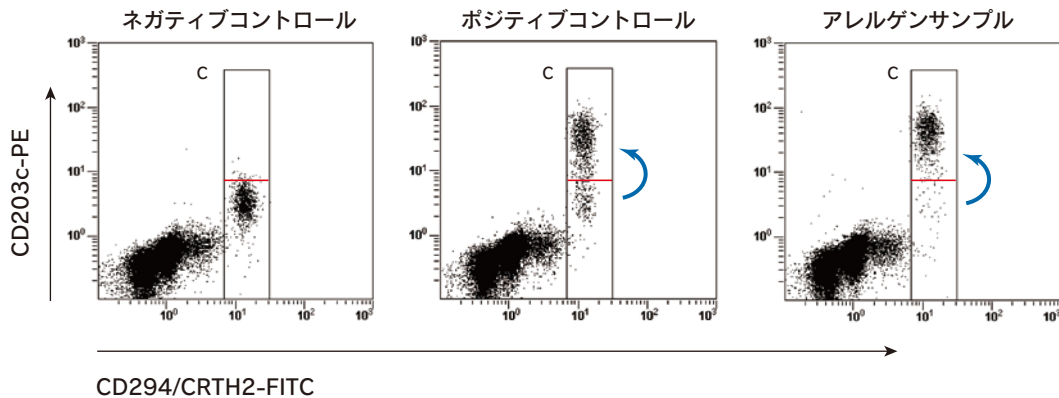
CD294/CRTH2は好塩基球、好酸球、T細胞サブセットに発現します。好酸球は散乱光特性で区別でき、T細胞サブセットはCD3で除く事が可能です。Allergenicity KitにはCD3、CD294/CRTH2が同梱されており、簡便に好塩基球をゲーティングできます。



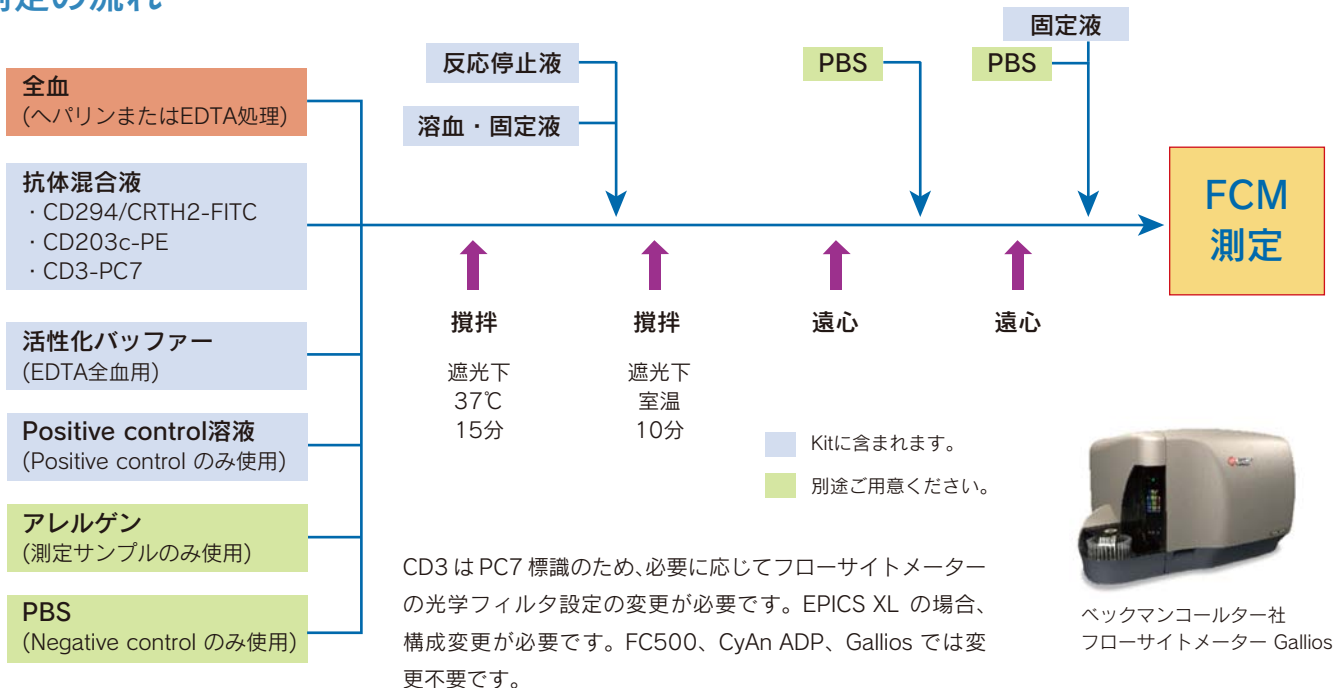
好塩基球(ゲートC)のCD203cの発現量の変化を測定

ネガティブコントロールでは定常的なCD203cの発現を検出します。一方、ポジティブコントロールやアレルゲンサンプルの刺激により好塩基球のCD203cの発現量が増加しました。

好塩基球活性化と蛍光標識抗体による染色



測定の流れ



関連製品

ヒスタミンELISA「イムノテック」

ヒスタミンはアレルギー反応の主な伝達物質で、血漿ヒスタミンの測定は即時型アレルギーの確認に有用です。また、種々のアレルギーで刺激した後、放出されるヒスタミンを測定する事で、アレルギーを同定する事も可能です。

ヒスタミンELISA「イムノテック」は、競合法を原理としたELISA法により、検体中のヒスタミンを測定します。

EDN ELISA Kit

好酸球の遊走と活性化は、アレルギー性疾患における組織障害に重要な役割を担う事が示唆されています。好酸球は活性化に伴いMBP、EDN、ECPなどの炎症メディエーターを放出します。EDNはECPとの相同性が高いですが、細胞毒性はありません。EDNは好酸球の活性化及び脱顆粒の指標になると考えられています。

EDN ELISA KitはELISA法により、特異的かつ高感度にヒトEDNを測定する試薬です。

MESACUP® ECPテスト

好酸球から放出される炎症メディエーターであるECPは、強い細胞毒性を示します。ECPは気管支喘息発作時に活性化された好酸球から放出されると気道上皮細胞を傷害することが知られており、血清ECP濃度の測定は気管支喘息と他の呼吸器疾患の鑑別に利用できます。

MESACUP® ECPテストはELISA法により、特異的かつ高感度にヒトECPを測定する試薬です。

製品リスト

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格 (税別)	
A17116	Allergenicity Kit	100 tests	¥99,800	
IM-2562	ヒスタミンELISAキット「イムノテック」	96 wells	¥108,000	体外診断用医薬品
7630	EDN ELISA Kit	96 wells	¥98,000	
7618	MESACUP® ECPテスト	96 wells	¥98,000	体外診断用医薬品

コードNo.	製品名	クローン	標識	使用法	容量	希望納入価格 (税別)
IM-3575	CD203c	97A6	PE	FCM	100 tests	¥69,000
A07413	CD294/CRTH2	BM16	PE	FCM	100 tests	¥63,000
6607100	CD3*	UCHT1	PC7	FCM	100 tests	¥69,000
M022-3	anti-EDN	3H8	Unlabeled	WB	100 µg	¥48,000
IM-1165	CD63*	CLBGran/12	FITC	FCM	100 tests	¥64,000

FCM: Flow cytometry, WB: Western Blotting *その他標識の抗体もあります。

