

柑橘アレルギー患者における好塩基球活性化マーカー CD63及びCD203c発現に関する検討

高松伸枝¹⁾ 近藤康人²⁾ 拓植郁哉³⁾

¹⁾ 別府大学大学院食物栄養科学研究科

²⁾ 藤田医科大学ばんだね病院小児科・総合アレルギーセンター

³⁾ 社会医療法人財団親和会 八千代病院

【要 旨】

好塩基球活性化試験 (BAT) は食物アレルギーの他、慢性蕁麻疹や薬剤アレルギーの評価等として用いられている。検体の保存ができず現時点で保険適用がないことから研究的に用いられている。症状が明確でなく患者への食事指導に難渋する場合の判断基準として検討の一助となることが示唆された。

【キーワード】

食物アレルギー 好塩基球活性化試験 (BAT) 柑橘類アレルギー 食事指導

1. 目的

学童期前後の食物アレルギーの頻度が高くなる食物に果物があげられる。果物アレルギーの症状は、即時型もあるが、多くは臨床型分類の特殊型に属する口腔アレルギー症候群 (oral allergy syndrome : OAS) と診断されることが多い。OAS は口腔周囲に限定され、比較的軽い症状をもつことが特徴である。蕁麻疹や紅斑などの客観的症狀が認められない場合があり、「耳の奥がかゆい」「喉がイガイガする」などを訴えて確定診断や食事指導が困難なことがある¹⁾。一方、検査方法には血液検査 (抗原特異的 IgE 抗体価、allergen components 等) や皮膚試験 (skin prick test : SPT)、食物経口負荷試験等があるが、抗原が多種にわたり特定に限度があること、皮膚試験中の感作や経口負荷試験中に重篤な症状を来すこともあることから、負担の少ない検査・診断の検討がなされている。今回、柑橘類アレルギー患者を対象に好塩基球活性化試験 (basophil activation test : BAT) を試みた。その有用性について検討を行ったので報告する。

2. 方法

愛知県、大阪府、愛媛県の専門医の常駐する病院に受診した柑橘類に明らかなアレルギーの既往のある患者 11 名及び対照 1 名を対象とした。本対象の他に high responder (negative が常に高活性を維持) が 1 名存在したが、今回の試験から除外した。各患者に対して詳細な問診を行

うとともに SPT は新鮮な果汁を用いる prick-to-prick test とし、抗原特異的 IgE 抗体価は CAP-FEIA 法 (Phadia, Thermo Fisher Scientific Inc.) にて測定した。

BAT では、抗原として新鮮なオレンジ、温州ミカン、グレープフルーツの砂じょう部分 (果肉) を用いた。果肉を分地・粉碎後、2M sucrose buffer にて溶解し、4°C over night で抽出した。遠心分離の後濾過し上清を allergen sample とした。測定 sample は、Beckman Coulter 社の Allergenicity kit (CRTH2-FITC, CD203c-PE, CD3-PC7) に CD63-APC 抗体を加えて行った。すなわち EDTA 加全血に negative control (PBS)、positive control (抗 IgE)、あるいは allergen sample buffer を加え、37°C 15 分間反応させた。反応停止後に溶血固定液を加えて攪拌、遮光室温で 10 分間反応の後上清を除去した。PBS を加え遠心分離し上清除去の後、ホルムアルデヒド添加 PBS に再浮遊させたのち CD203c と CD63 を同時に測定した。測定は BD 社製 Biosciences FACS Calibur Flow Cytometer を用いた。BAT では、好塩基球表面に発現される活性化抗原 CD230c あるいは CD63 の量が蛍光強度に反映される。negative control が 5% の陽性率を示すように基準レベル (活性%) を設定し、測定結果 10% 以上を陽性とした。

倫理的配慮

本研究は、藤田医科大学医学研究倫理審査委員会にて承認を受けた (HM19-394)。本研究の目的と意義については事前に文書で保護者及び本人に説明し同意を得た。

3. 結果

表 1 に患者背景を記した。年齢は 5 歳から 32 歳、女性 9 名男性 1 名、OAS 5 名、皮膚症状が 3 名、全身症状が 2 名であった。柑橘類のうち、症状の誘発原因となった柑橘類はオレンジや温州ミカンが最も多く、グレープフルーツやレモンも原因となっていた。加工品では、オレンジジュース、ミカン缶詰、オレンジゼリーに誘発がみられた。オレンジ特異的 IgE 抗体価は 0.40 - 3.22 UA/ml で、3 名は 0.35 UA/ml 未満であった。グレープフルーツ特異的 IgE 抗体価は 0.66 - 24.5 UA/ml、0.35 UA/ml 未満は 4 名であった。オレンジ、グレープフルーツともに陰性だった患者が 3 名存在した。SPT では、1 名を除き検査を行った柑橘類に陽性を示した。陰性であった患者 2 は IgE 抗体価も 0.35 UA/ml 未満であった。

図 1 に BAT にて濃度依存的に抗原刺激した CD203c 及び CD63 発現量の変化を示した。患者 2 名を除いた 8 名は重症度にかかわらずすべて 20% を超える活性となった。多くは抗原濃度に従って上昇傾向を示し、一部は抗原濃度 1mg/ml がピークであった。また、オレンジの活性% は CD203c 8.9 - 74.0、CD63 16.8 - 78.2、温州ミカンの活性% は CD203c 10.4 - 72.8、CD63 24.1 - 88.9、グレープフルーツは CD203c 10.8 - 81.7、CD63 14.6 - 91.0 の範囲にあった。特に患者 8 は CD203c がほぼ陰性であったにもかかわらず、CD63 で柑橘 3 種ともに最大活性が 70% を超えていた。一方、特異的 IgE 抗体価が陰性であった 3 名のうち 2 名 (患者 2・5) は CD203c、CD63 ともに 40 ~ 80% の活性を示したが、1 名 (患者 6) は 10% 程度の活性にとどまった。

4. 考察

好塩基球はマスト細胞とともに即時型アレルギー反応において重要な役割をする細胞である。これらは膜結合型の高親和性 IgE 受容体を発現し同レセプター上の IgE にアレルゲンが結合する、あるいはアレルゲンによる直接刺激によって活性化し、脱顆粒によってヒスタミンなど炎症

表1 患者背景

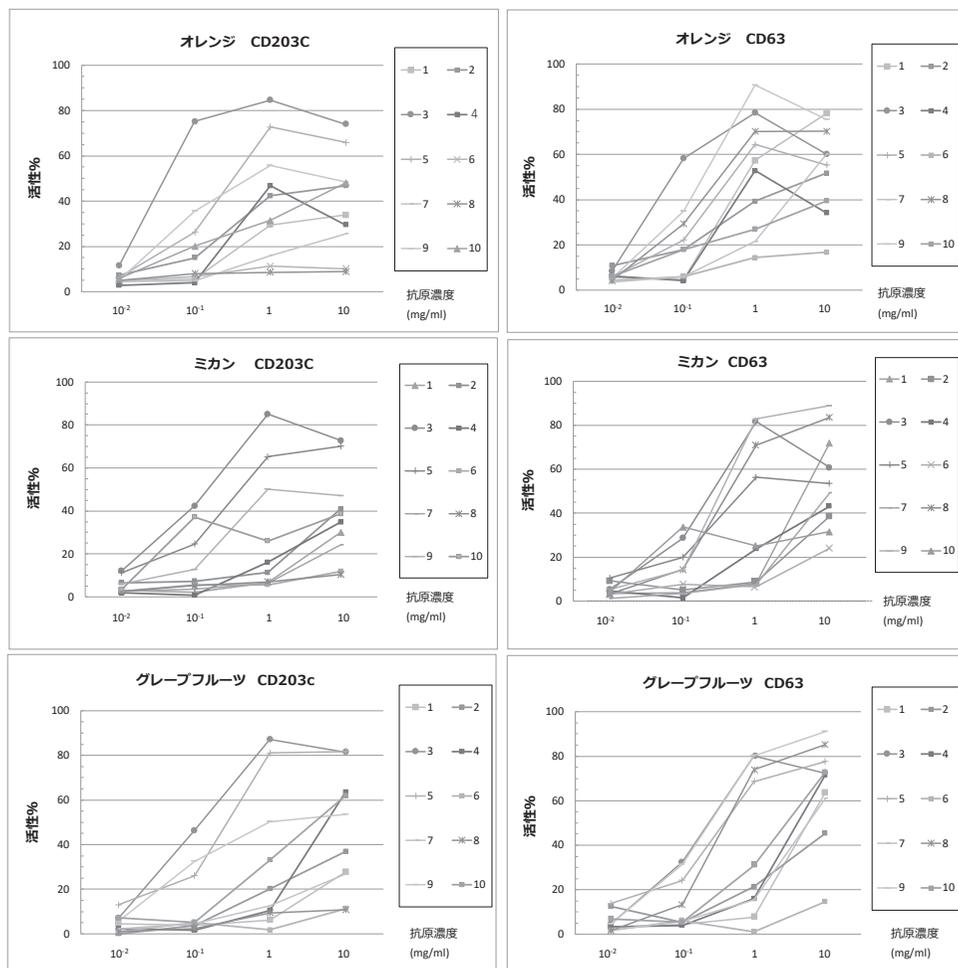
患者番号	年齢	性別	症状	主な原因柑橘類	オレンジ特異的IgE抗体価 (UA/ml)	グレープフルーツ特異的IgE抗体価 (UA/ml)	オレンジSPT	温州ミカンSPT	グレープフルーツSPT
1	6	M	OAS	オレンジ・ジュース・オレンジゼリー	3.22	4.65	2+	1+	2+
2	7	F	OAS	オレンジ・温州ミカン・グレープフルーツ・オレンジジュース	<0.35	<0.35	(-)	(-)	(-)
3	12	F	OAS	オレンジ・温州ミカン	7.30	24.5	2+	3+	2+
4	21	F	OAS	オレンジ・温州ミカン・オレンジジュース	0.40	0.66	3+	3+	3+
5	32	F	OAS	オレンジ	<0.35	<0.35	2+	(-)	1+
6	5	F	蕁麻疹	温州ミカン	<0.35	<0.35	1+	2+	1+
7	11	F	蕁麻疹	オレンジ・温州ミカン・オレンジジュース・レモン	2.79	3.59	2+	2+	2+
8	11	F	蕁麻疹	オレンジ・温州ミカン	2.59	9.72	2+	2+	2+
9	9	F	下痢など	オレンジ・温州ミカン・オレンジジュース	0.70	1.53	2+	2+	2+
10	10	F	FDEIA	オレンジ・温州ミカン・ミカン缶詰	0.85	<0.35	2+	3+	3+

FDEIA: food-dependent exercise-induced anaphylaxis 食物依存性運動誘発アナフィラキシー

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。マスト細胞が組織に存在するのに対して、好塩基球は末梢血中 (末梢血白血球に1%弱) に存在するため、好塩基球活性化試験 (BAT) が食物アレルギー診断に応用されている²⁾⁻⁴⁾。脱顆粒の過程では、好塩基球活性化マーカーであるCD63とCD203cの細胞表面での発現も上昇する。BATではこれら活性化マーカーの発現上昇を指標にして好塩基球の活性化を評価している。

CD63はヒスタミンと同じ分泌リソソームに局在する膜タンパク質で、LAMP3 (lysosomal-associated membrane protein3) とも呼ばれ、テトラスパンスーパーファミリーに属する。休止期の顆粒球やT細胞、B細胞等にも弱く発現することが知られており⁵⁾、議論はあるものの発現上昇とヒスタミン放出量には関連があることが報告されている⁶⁾。一方、CD203c抗原は、E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) ファミリーに属するII型膜貫通型タンパクでE-NRP3と呼ばれている。細胞外のオリゴヌクレオチドやヌクレオチドリン酸、NADなどを分解する膜型酵素で好塩基球とマスト細胞の細胞膜上に存在する。好塩基球の定常状態において低レベルで発現し、その発現は活性化後に急速にアップレギュレートされる。活性化は一過性であり、CD63の発現よりも迅速で顕著であるという報告がある⁷⁾⁻⁹⁾。

BATと血清IgEの測定との関連については、多くの先行研究がなされている。小麦アレルギーにおいては、抗原特異的IgEの検出に比べ感度・特異度ともに優れているとされ¹⁰⁾、卵アレルギーや牛乳アレルギー患児においても、CD203cの発現量は血清IgEの測定に比べ疾患との相関が高



最大活性%		患者1	患者2	患者3	患者4	患者5	患者6	患者7	患者8	患者9	患者10
オレンジ	CD203c	33.9	46.8	84.6	29.5	72.8	10.1	25.5	8.9	55.8	48.0
	CD63	78.2	51.8	78.4	34.2	64.4	16.8	60.2	70.3	90.7	39.5
温州ミカン	CD203c	30.1	41.0	85.1	34.8	70.1	11.8	24.2	10.4	50.1	38.7
	CD63	72.0	38.6	81.7	43.2	53.6	24.1	49.2	83.6	88.9	31.6
グレープフルーツ	CD203c	27.8	36.9	87.2	63.6	81.7	11.2	26.9	10.8	53.6	62.0
	CD63	63.6	45.3	80.1	71.5	77.5	14.6	60.9	85.2	91.0	72.8

図1 抗原（オレンジ、温州ミカン、グレープフルーツ）別の好塩基球活性化試験（BAT）によるCD203c及びCD63発現量の変化

いことが示されている¹¹⁾。今回の結果においては、患者2は特異的Ig及びSPT陰性であったが、オレンジCD63の最大陽性は51.8%を示していた。抗原は異なるものの、これらを反映されたものであることが示唆された。しかし患者6は、症状を訴えていたにもかかわらず両マーカーとも低い発現量であった。当該患者の特異的IgE抗体価も陰性であったことから、試験に使用した抗原 sample 抽出や調製の問題、low responderやIgE非依存的な反応を考慮に入れる必要があ

るのかも知れない。また、CD63のみ発現量が多い患者については、前述のように両マーカーは発現メカニズムに相違があるとされていること、CD203cのアップレギュレーションと反応時間の違いが異なる反応性を示している可能性が考えられた。これまで、好塩基球を用いたヒスタミン遊離試験においても low responder の存在が知られている。Low responder を起こしやすい条件として採血から検査実施までの時間が長くなること、抗ヒスタミン薬などの薬物の影響、低年齢児に多いことや¹²⁾、寛解するに伴い low responder 化していくとされている¹³⁾が、免疫学的な機序は不明であり今後の検討が必要である。

今回の検討では、食物アレルギーで一般的に行われる抗原特異的 IgE 抗体価で陰性であっても BAT での反応性が証明され、CD203c の発現が低い場合でも CD63 で発現が認められたことで CD63 を加えた BAT の有用性が明らかとなった。BAT は食物アレルギーの他、慢性蕁麻疹や薬剤アレルギーの評価等として用いられているが、検体の保存ができず現時点で保険適用がないこと、low responder の解釈が課題である。しかし、客観的症候が明確でない場合でも試験を施行することで体内反応の有無が確認でき、患者への食事指導に難渋する場合の判断基準の一助となると示唆された。

利益相反 (conflict of interest) に関する開示：著者全員は、本論文の研究内容について他者の利害関係を有しません。

本研究をご指導ご鞭撻頂きました宇理須厚雄先生に御礼を申し上げます。本研究費の一部は、JSPS 科研費 (課題番号 20K13831) の助成を受けたものです。重ねて深謝申し上げます。

参考文献

- 1) Takamatsu N, Kondo Y, Tsuge I, et al. : A study of cross-reactivity between citrus fruit and pollen allergens in oral allergy syndrome and food-dependent exercise-induced anaphylaxis in Japan. *FMJ*, 2, 1: 6-11, 2016.
- 2) McGowan EC, Saini S: Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep*, 13: 101-109, 2013.
- 3) MacGlashan D.W. Jr: Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunology*, 132: 777-787, 2013.
- 4) Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, et al. : The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 70: 1393-1405, 2015.
- 5) Knol EF, Mul FP, Jansen H, et al: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*, 88: 328—338, 1991.
- 6) Blumchen K, Beder A, Beschoner J, et al. : Modified oral food challenge used with sensitization biomarkers provides more real-life clinical thresholds for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 134, 2: 390-398, 2014.
- 7) MacGlashan D Jr : Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy*, 40: 1365-1377, 2010.
- 8) Bühring H.J, Bühring H.-J, Strebler A. et al. : The Basophil-Specific Ecto-enzyme E-NPP3 (CD203c) as a Marker for Cell Activation and Allergy Diagnosis. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 133, 317, 2004. PMID: 15031605
- 9) Löttsch B, Dölle, S, Vieths, S. et al. : Exploratory analysis of CD63 and CD203c expression in basophils from hazelnut sensitized and allergic individuals. *Clin Transl Allergy*, 6, 45, 2016. PMID: 27999658
- 10) Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y. et al. : Antigen-Induced Expression of CD203c on Basophils Predicts IgE-mediated Wheat Allergy. *Allergol. Int.* 58, 193, 2009. PMID: 19240377
- 11) Sato, S, Hiroshi Tachimoto H, Shukuya A. et al. : Basophil activation marker CD203c is useful in the

diagnosis of hen's egg and cow's milk allergies in children. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 152 Suppl. 1, 54, 2010.
PMID: 20523064

12) 伊藤節子：ヒスタミン遊離試験の有用性と問題点, *アレルギー科* 19 : 456 - 462, 2005.

13) 大谷智子, 杉原茂孝：ヒスタミン遊離試験における low-responder 症例の経時的検討. *東女医大誌* 77 : E26 - E31, 2007.