

慢性特発性蕁麻疹患者に対する  
シクロスポリンの治療効果を  
評価するバイオマーカーの同定

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系皮膚科学専攻

遠藤 嵩大

修了年 2019 年

指導教員 照井 正

# 目次

概要	・・・・・・・・・・	1
緒言	・・・・・・・・・・	4
1. 蕁麻疹	・・・・・・・・・・	4
2. 慢性特発性蕁麻疹	・・・・・・・・・・	4
3. 慢性特発性蕁麻疹とマスト細胞	・・・・・・・・・・	5
4. 慢性特発性蕁麻疹と好塩基球	・・・・・・・・・・	5
5. 慢性特発性蕁麻疹の治療	・・・・・・・・・・	6
6. 慢性特発性蕁麻疹と自己抗体	・・・・・・・・・・	6
7. 自己血清皮内テスト (autologous serum skin test, ASST)	・・・・・・・・・・	7
8. 慢性特発性蕁麻疹の治療のバイオマーカー	・・・・・・・・・・	7
研究の目的	・・・・・・・・・・	9
期待される成果	・・・・・・・・・・	9
対象・使用試薬	・・・・・・・・・・	10
(1) 倫理的考慮	・・・・・・・・・・	10
(2) 対象	・・・・・・・・・・	10
(3)使用試薬	・・・・・・・・・・	11
方法	・・・・・・・・・・	13
1. 検体血清からの IgG の精製	・・・・・・・・・・	13

2. 抗 IgE 抗体濃度測定	・ ・ ・ ・ ・ 14
3. 抗 $\alpha$ 鎖抗体濃度測定	・ ・ ・ ・ ・ 14
4. IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法	・ ・ ・ ・ ・ 15
5. 改良型 EXiLE 法：抗 $\alpha$ 鎖自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能の測定	・ ・ ・ ・ ・ 15
6. 改良型 EXiLE 法：抗 IgE 自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能の測定	・ ・ ・ ・ ・ 16
7. 自己血清皮内テスト(ASST)	・ ・ ・ ・ ・ 18
8. 患者背景との比較	・ ・ ・ ・ ・ 18
9. 統計解析	・ ・ ・ ・ ・ 19
<b>結果</b>	・ ・ ・ ・ ・ 20
1. 治療にシクロスポリンを用いた ASST 陽性群と ASST 陰性群の患者背景の比較	・ ・ ・ ・ ・ 20
2. シクロスポリンの治療による UAS7 の推移	・ ・ ・ ・ ・ 20
3. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群の患者背景の比較	・ ・ ・ ・ ・ 21
4. シクロスポリンの治療と血清 IgE 値の関係	・ ・ ・ ・ ・ 21
5. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体の濃度の比較	・ ・ ・ ・ ・ 21
6. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体による Fc $\epsilon$ RI 架橋能との関係	・ ・ ・ ・ ・ 21

7. ASST 陰性群, ASST 陽性群の血清 IgE カットオフ値でのシクロスポリンの治 療効果の比較	・ ・ ・ ・ ・ 22
8. ASST 陽性群における血清 IgE カットオフ値でのシクロスポリンの治療効果の 比較	・ ・ ・ ・ ・ 22
考察	・ ・ ・ ・ ・ 24
まとめ	・ ・ ・ ・ ・ 28
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 29
図表	・ ・ ・ ・ ・ 30
図説	・ ・ ・ ・ ・ 45
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 47
研究業績録	・ ・ ・ ・ ・ 53

## 略語

ASST : autologous serum skin test : 自己血清皮内テスト

AUC : area under the curve

CSU : chronic spontaneous urticaria : 特発性慢性蕁麻疹

EAACI : European Academy of Allergy and Clinical Immunology

FDF : European Dermatology Forum

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫測定法

EXiLE : IgE crosslinking-induced luciferase expression

FBS : fetal bovine serum : ウシ胎児血清

FcεRI : high affinity receptor for IgE : 高親和性 IgE 受容体

GA<sup>2</sup>LEN : Global Allergy and Asthma European Network

HRP : horseradish peroxidase

IgE : immunoglobulin E : 免疫グロブリン E

IgG : immunoglobulin G : 免疫グロブリン G

NFAT : nuclear factor of activated T cells : 活性化 T 細胞核内因子

PAF : platelet-activating factor

PBS : phosphate buffered saline : リン酸緩衝生理食塩水

PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate

QOL : quality of life

ROC : receiver operating characteristic

SD : standard deviation : 標準偏差

TBS : tris-buffered saline : トリス緩衝生理食塩水

TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

UAS : urticaria activity score

WAO : World Allergy Organization

## 概要

背景:

慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticaria, CSU) は特定の誘発因子がなく、自発的に誘発され、6週間以上にわたり膨疹と掻痒を繰り返す蕁麻疹とされている。CSU 患者の一部は自己の血清を皮内に注射する自己血清皮内テスト (autologous serum skin test, ASST) を行うと陽性になり、血清中に誘発因子が存在すると考えられている。さらに IgE に対する自己抗体 (抗 IgE 自己抗体) もしくは FcεRI の α 鎖に対する自己抗体 (抗 α 鎖自己抗体) も患者の一部で存在する。抗ヒスタミン薬の治療抵抗性の患者においてシクロスポリンやオマリズマブが用いられる。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとして ASST 陰性や血清 IgE 値が高値であることや末梢血好塩基球の FcεRI 発現高いことが報告されている。しかし、シクロスポリンの治療の効果を予測するバイオマーカーはまだ明らかになっていない。

目的: 本研究では、CSU のシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

方法: 抗ヒスタミン薬の 2 倍量の加療にて効果不十分の CSU 患者 34 名 (女性 20 人、男性 14 人) を対象とした。シクロスポリンは 3mg/kg/day で約 4 週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度は Urticaria Activity Score 7 (UAS7) を用いて評価した。治療後の UAS7 が 6 以下を効果ありとした。ASST の陰性群と陽性群の間の男女比、年齢、重症度 (UAS7)、罹患期間、血清 IgE 値、末梢血好塩基球数、抗核抗体陽性率、抗サイログロブリン抗体陽性率、抗マイクロゾーム抗体陽性率を比較した。抗 FcεRIα 鎖自己抗体および抗 IgE 抗体自己濃度を ELISA、

これら自己抗体の FcεRI 架橋能を IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法で測定し、比較した。統計学的解析は Mann-Whitney-U test または Fisher's exact test を用いた。p < 0.05 を統計学的に有意とした。

結果：シクロスポリン投与によって ASST 陽性群の UAS7 ≤ 6 になった割合は、ASST 陰性群よりも有意に高値であった (p = 0.0048)。ASST 陽性群と ASST 陰性群では臨床的な背景において有意差はみられず、また抗 FcεRIα 鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体濃度・FcεRI 架橋能も有意な差はみられなかった。ASST 陰性群および ASST 陽性群の間に血清 IgE 値に有意な差はみられなかったが、シクロスポリンの治療後 UAS7 ≤ 6 群では治療後 UAS7 > 6 群と比較し、血清 IgE が有意に低値であった (p = 0.0003)。ROC 曲線から得られた最適なカットオフ値は 88.5 IU/mL であり、その感度は 81.0%、特異度は 69.2%であった。ASST 陽性群において血清 IgE 値のカットオフ値でシクロスポリンの治療効果を比較したところ、血清 IgE 値 ≤ 88.5 群では血清 IgE 値 > 88.5 群と比較して UAS ≤ 6 になる割合が統計学的に有意に高値であった (p = 0.024)。血清 IgE 値 ≤ 88.5 群と血清 IgE 値 > 88.5 群の ASST 陽性率を比較したが、両群において有意な差はみられなかった (p = 0.727)。

結語：CSU 患者において ASST 陽性と血清 IgE 値がカットオフ値以下であることがシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーになることが新たに判明した。ASST 陰性群と ASST 陽性群の患者背景に有意な差はなく、抗 α 鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体は ASST を決める因子ではなく、シクロスポリンの治療の効果にもこれら自己抗体の影響はみられなかった。そのため ASST 陽性群の血清には膨疹を惹起するなんらかの原因因子が存在すると考えられた。ま

たオマリズマブの治療効果のバイオマーカーとは正反対の結果であった。シクロスポリンとオマリズマブの作用機序は全くことなり、CSU は治療の観点から2つ群が存在することが示唆された。CSU の治療において ASST 陽性・血清 IgE 低値群はシクロスポリン、ASST 陰性・血清 IgE 高値群はオマリズマブが勧められる。

## 緒言

### 1. 蕁麻疹

European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Global Allergy and Asthma European Network (GA<sup>2</sup>LEN) / European Dermatology Forum (EDF) / World Allergy Organization (WAO) (以下 EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO)のガイドラインでは蕁麻疹は膨疹と掻痒が 30 分から 24 時間以内に自然消失することが特徴であるとされている。蕁麻疹は誘発因子が同定されているかどうかによって、特発性と誘発性に分類される。特発性は持続期間により急性特発性蕁麻疹と慢性特発性蕁麻疹に、誘発性は寒冷蕁麻疹、遅延性圧蕁麻疹、温熱蕁麻疹、日光蕁麻疹、水蕁麻疹、振動性血管浮腫、コリン性蕁麻疹、接触蕁麻疹に分類される (表 1)。顔面の浮腫を含む血管浮腫と呼ばれるものも蕁麻疹の一部として分類される<sup>1</sup>。膨疹と掻痒の 2 つの症状を特徴とする疾患であるが、誘発因子が多岐にわたり、機序は十分に理解されていない。

### 2. 慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticaria, CSU)

蕁麻疹のなかで膨疹と掻痒の出現と消褪が、6 週間以上継続するものを CSU と定義されている<sup>1</sup>。CSU は全人口の 2-3%が一生のうちで 1 度は発症すると考えられている<sup>2</sup>。CSU の原因としてヒスタミンやサブスタンス P などが報告されているが<sup>3 4</sup>、これらの因子のみでは発症しない CSU も存在しているため CSU 発症の全容を明らかにできていない。そのため効果的な治療が行えず、治療をしても治癒するまでに 52%が 2 年、43%が 3 年、14%が 5 年費やすとされている<sup>5</sup>、さらに CSU 患者 QOL は冠動脈疾患患者より低下しており<sup>6</sup>、労働生産性は低下し、社会において多大な損失を与えている<sup>7 8</sup>。

### 3. 慢性特発性蕁麻疹とマスト細胞

マスト細胞はアレルギー炎症や寄生虫排除に関与する細胞である<sup>9</sup>。CSUにおいても皮膚マスト細胞は脱顆粒し、ヒスタミンや platelet-activating factor (PAF)などの生理活性物質を放出する。それら因子は皮膚微小血管や神経に作用し、血管拡張や血漿成分の漏出や痒みを惹起する<sup>1</sup>。CSU患者の膨疹部の病理組織では、マスト細胞が増加すると報告がある一方で<sup>10 11 12</sup>、増加はしないとの報告もある<sup>13 14</sup>。CSUにおいてマスト細胞数は増減に議論の余地はあるが、皮膚組織においてヒスタミンは増加し<sup>3</sup>、CSU患者血清ではマスト細胞特異的プロテアーゼであるトリプターゼの上昇がみられる<sup>15</sup>。蕁麻疹の治療において抗ヒスタミン薬が主役であることを鑑みると、マスト細胞がCSUの中心的役割を担っていると考えられる。

### 4. 慢性特発性蕁麻疹と好塩基球

好塩基球もマスト細胞と同様にアレルギー炎症や寄生虫排除に関与し、細胞表面に FcεRI を発現している<sup>16 17</sup>。多価抗原によってその抗原特異的 IgE の結合した FcεRI が架橋されると好塩基球も、ヒスタミンや IL-4、IL-13、IL-31 などのサイトカインを放出する<sup>18 19</sup>。CSUにおける好塩基球の関与が報告されている。CSU患者の末梢血好塩基球数は減少し<sup>20</sup>、病変部の皮膚には好塩基球の浸潤がみられる<sup>21</sup>。さらに病勢と末梢血好塩基球数は負の相関関係がある<sup>22</sup>。CSU患者の好塩基球の反応性を調べた報告では、CSU患者の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対し反応性は低下するが、FcεRI を介さない刺激には反応性は低下しない<sup>23</sup>。さらにCSUの患者にオマリズマブの治療を行うと末梢血好塩基球の反応性は上昇し、末梢血好塩基球数は増加する<sup>24 25</sup>。このように治療前後で好塩基球の動態に大きな変化があり、マスト細胞とともにCSUの病態に深く関わってい

ると推測できる。

## 5. 慢性特発性蕁麻疹の治療のガイドライン

EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO のガイドラインでは CSU の治療にはまず第 2 世代の抗ヒスタミン薬が用いられる。2-4 週間経過しても、かゆみや膨疹が出現を繰り返すようであれば 2 倍もしくは 4 倍量の抗ヒスタミン薬を用いる。抗ヒスタミン薬の増量による効果がみられない場合はヒト化抗 IgE モノクローナル抗体であるオマリズマブを用いる。さらにオマリズマブ治療にも効果がみられない場合は免疫抑制剤のシクロスポリンを用いる<sup>1</sup> (図 1)。オマリズマブは血中の遊離型 IgE や好塩基球、マスト細胞の FcεRI に結合している IgE を捕捉するため、免疫抑制はみられない<sup>26</sup>。一方でシクロスポリンは CSU に対して効果的であるが、高血圧や血清クレアチニンの上昇などの副作用があり、投与にあたり定期的な採血が必要である<sup>27</sup>。オマリズマブの薬価は、後発品も存在するシクロスポリンと比べ、非常に高額になる。したがって、治療法を選択するための基準を定め、患者の負担を減らすことが必要である。

## 6. 慢性特発性蕁麻疹と自己抗体

CSU 患者の血清中に、自己抗体が存在していることが報告されている<sup>28</sup>。IgE に対する自己抗体 (抗 IgE 自己抗体) もしくは FcεRI の α 鎖に対する自己抗体 (抗 α 鎖自己抗体) が主な自己抗体であることが報告されている<sup>29</sup>。全 CSU 患者の 0 - 69% に抗 IgE 自己抗体が、4 - 64% に抗 α 鎖自己抗体が検出される<sup>30</sup>。蕁麻疹に加え、尋常性天疱瘡や皮膚筋炎や全身性エリテマトーデスにも抗 α 鎖自己抗体はみられ、さらに健常人でも抗 α 鎖自己抗体は検出されている<sup>31</sup>。CSU 患者の抗 α 鎖自己抗体の脱顆粒能についても検証されているが、脱顆粒能を有

するという報告がある一方で<sup>31</sup>、有さないとの報告もあり<sup>32</sup>、これら自己抗体の存在や CSU 病態への関与は不明である。ほかにも CSU 患者には甲状腺に対する自己抗体が 3.7-37.1%に検出されることが報告されている<sup>33</sup>。

## 7. 自己血清皮内テスト (autologous serum skin test, ASST)

ASST では自己血清の皮内注射により生じた膨疹を測定し、血清成分中に存在する自己反応性の因子を確認する試験である。ASST の膨疹部の病理組織では、マスト細胞の脱顆粒が確認されていることから、血清中にはマスト細胞を活性化させる因子が含まれている<sup>34</sup>。ASST 陽性患者の血清で膨疹を惹起する因子を探索した報告がある。その報告によると IgG 分画、補体、IgE を除去もしくは不活化しても膨疹を惹起するため、これら以外の因子が膨疹の惹起に関与しているが、詳細は不明である<sup>35</sup>。ASST の陽性率は、皮内注射する血清量、ASST 施行から計測までの時間、生理食塩水注射部位と比べどれほど膨疹が大きければ陽性とするかの判断基準が施設間で異なるため、陽性率が 4.1~76.5%と幅があるため陽性の判定が曖昧である<sup>36</sup>。ASST 陽性患者は ASST 陰性患者と比較してかゆみが強く、全身症状が多く、罹患期間も長いと報告がある<sup>37 38</sup>。一方で両群において重症度や罹患期間に差がないと報告もあり<sup>39 40</sup>、ASST と臨床背景の関連性はみられていない。ASST 陰性患者では抗ヒスタミン薬抵抗性の CSU の治療であるオマリズマブの治療効果が早期にみられるとされているが、最終的には両群に同様の治療効果がみられる<sup>41</sup>。そのため ASST と治療効果との関連は不明である。現在は EAACI のガイドラインにおいて生理食塩水によって起こる膨疹と比較して、直径が 1.5mm 以上の膨疹を陽性としている<sup>36</sup>。

## 8. 慢性特発性蕁麻疹の治療のバイオマーカー

慢性特発性蕁麻疹の治療において、抗ヒスタミン薬の治療の抵抗性のバイオマーカーとして血漿中の C5a や D-ダイマーの高値、長時間継続する膨疹が報告されている<sup>42</sup>。オマリズマブの治療のバイオマーカーは血清 IgE 値が高値、D-ダイマーが高値、末梢血好塩基球の FcεRI が高発現、CSU 患者の血清を用いた好塩基球活性化試験が陰性であることが知られている<sup>41 43 44 45 46</sup>。しかし、シクロスポリンの治療効果を予測するバイオマーカーはまだ知られていない。

## 研究の目的

本研究では、CSU のシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

## 期待される成果

この研究結果により、CSU の治療を選択する際、どの薬剤を選択すれば患者の精神的負担や経済的負担を減らした効果的な治療を行うことができるかの判断基準になることが期待される。

## 対象・使用試薬

### (1) 倫理的考慮

本研究の生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会、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、委員会の承認を得た。患者の血液の採取に際して、平成 29 年 2 月 16 日付けで、研究課題「慢性蕁麻疹患者の病態解明のための研究」承認番号 RK-150908-12 として承認を得た。すべての被験者から、ヘルシンキ宣言に従いインフォームドコンセントを得た。安全対策に関しては、研究課題「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発 (2015 医 3-2)」、「免疫・アレルギー疾患におけるマスト細胞の役割の解明 (2016 医 10)」として、日本大学医学部組み換え DNA 実験安全委員会の承認を得た。

### (2) 対象

本研究は 2004 年 2 月～2017 年 8 月までに日本大学医学部附属板橋病院皮膚科を受診した慢性蕁麻疹患者を対象とした。EAACI の診断基準に準じ、誘発因子が特定できず、膨疹や血管浮腫が 6 週間以上持続する場合を CSU と診断した<sup>1</sup>。CSU 患者のうち抗ヒスタミン薬を 2 倍量にしても効果不十分である患者を対象とした。このなかで①問診や検査上、誘発性蕁麻疹の疑いがある患者、②採血時に免疫抑制剤 (コルチコステロイド、シクロスポリン) を使用中の患者は除外した。上記を満たす CSU 患者 34 人が研究に参加した。女性 59% で年齢は中央値が 47 歳 (範囲 18-82 歳) であった。また対象患者のなかにオマリズマブの治療歴のある患者はいなかった。

### (3). 使用抗体、メディウム、試薬、物品

以下の抗体、試薬、物品はそれぞれ下記の会社から購入した。

#### 抗体

- horseradish peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (clone G18-145) (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, U.S.A.)
- 抗ヒト IgE 抗体 (Aglient, Santa Clara, CA, U.S.A.)
- マウス抗ヒト FcεRIα モノクローナル抗体 (CRA1) (BioAcademia, Osaka, Japan)
- マウス抗ヒト FcεRIα モノクローナル抗体 (CRA2) (BioAcademia)

#### 試薬

- Geneticin (Gibco, Waltham, MA, U.S.A.)
- GlutaMAX-I (Gibco)
- HCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)
- Hygromycin B (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)
- Ionomycin (Plymouth Meeting, PA, U.S.A.)
- MEM non-essential amino acids solution (NEAA) (Gibco)
- MEMα, no nucleoside (Gibco)
- ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, U.S.A.)
- Penicillin-streptomycin (Gibco)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, HE, Germany)
- Phosphate buffered saline (PBS) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (Gibco)
- TMB microwell peroxidase substrate system (KPL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)
- Tris-buffered saline powder (TBS) (TAKARA BIO INC, Siga, Japan)

- Tween 20 (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- Fetal bovine serum (FBS) (Gibco)
- ヒト IgE, myeloma (Calbiochem, Darmstadt, HE, Germany)
- ヒト IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, U.S.A.)
- メトトレキサート (Sigma-Aldrich)

#### 物品

- Ab-Rapid SPiN EX (ProteNova, Kagawa, Japan)
- Amicon centrifugal filter units (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Germany)
- Amicon ultra-4 centrifugal filter devices (Merck Millipore)
- Amicon ultra-0.5 100kDa (Merck Millipore)
- Centricon plus-70 (Merck Millipore)
- Centro LB 960 microplate luminometer (BERTHOLD, Bad Wildbad, Germany)
- Maxisorp plate (Cosmobio company, Tokyo, Japan)
- B&W IsoPlate-96 TC (Perkin Elmer, MA, U.S.A)
- 24 well plate (CORNING, Corning, NY, U.S.A)
- 96 well plate (CORNING)

# 方法

## 1. 検体血清からの IgG の精製

Ab-Rapid SPiN EX を用いて、患者の血清から IgG 分画を精製した。

### 1-1. カラムの準備

付属のカラムの下部についているスナップオフプラグを外し、カラムを付属の 2 mL チューブにセットした。2,000×g で 5 秒間遠心し、ゲル保存液を取り除いた。カラム内に 600  $\mu$ L の PBS を入れ、2,000×g で 5 秒間遠心し、ゲルを平衡化した。カラムの下にスナップオフプラグを刺し込んだ。

### 2-2. 血清の添加

血清 100 $\mu$ L に PBS 500 $\mu$ L を加え、6 倍希釈した血清をカラムに加えた。30-60 秒に 1 回転倒混和しながら 10 分間反応させ、スナップオフプラグを外し 2,000×g で 5 秒間遠心した。600  $\mu$ L の PBS をカラムに入れ、2,000×g で 5 秒間遠心し、合計 3 回洗浄した。カラムにトラップされた IgG を回収するために、カラムの下にスナップオフプラグを刺し込み、200  $\mu$ L の付属の溶出液 (0.1 M Glycine-HCl) (pH 2.5-3.0) を加えた。タッピングで混和後、1 分間静置した。スナップオフプラグを外し、5  $\mu$ L の付属の中和液 (1 M Tris) が入ったマイクロチューブにカラムをセットした。2,000×g で 5 秒間遠心し、IgG 溶出液 200 $\mu$ L を回収し、300  $\mu$ L の PBS を加えた (計 500 $\mu$ L)。

### 1-3. 培地置換

Amicon centrifugal filter units 付属の回収チューブに付属のフィルターデバイスをセットし、総量 500  $\mu$ L の IgG 溶出液を入れた。15,000×g で 15 分間遠心した。新しい回収チューブにフィルターデバイスを逆さまにセットし、1,000×g で 2 分間遠心した。回収した IgG 溶出液 (約 20 $\mu$ L) に PBS 600  $\mu$ L を入れ、最終的に血清の約 6 倍希釈の精製 IgG とした。

## 2. 抗 IgE 抗体濃度測定

Staubach P ら、Atta AM ら、Gruber BL らの論文に準じて、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) によって抗 IgE 抗体濃度を測定した<sup>47 48 49</sup>。

すなわち Maxisorp plates にヒト IgE, myeloma 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (0.1 M carbonate buffer, pH 9.6) を 100  $\mu\text{L}$  加え、4°C で一晩静置して固相化した。洗浄液 (0.05% Tween を含んだ PBS) でプレートを 4 回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、ブロッキング液 (10% FBS を含んだ PBS) 100  $\mu\text{L}$  を入れ、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、PBS で 10 倍希釈した精製 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 万倍希釈した HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100  $\mu\text{L}$  入れ、室温で 1 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を 100  $\mu\text{L}$  加え、発色させた。2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  で反応を停止させ、Multiskan GO microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) で 450 nm の吸光度を測定した。既知の濃度のヒト IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, U.S.A.) を 50 ng/ mL から 0.775 ng / mL まで倍々希釈で固相化し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出し、得られた吸光度を基に検量曲線を作成した。

## 3. 抗 $\alpha$ 鎖自己抗体濃度測定

Lee MF ら、Pachlopnik JM ら、Moana JD らの論文に準じて、ELISA 法によって抗  $\alpha$  鎖自己抗体濃度を測定した<sup>50 51 52</sup>。

すなわち Maxisorp plates に 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のリコンビナント可溶性  $\alpha$  鎖を 100  $\mu\text{L}$  (0.1 M carbonate buffer, pH 9.6) を加え、4°C で一晩静置し固相化した。洗浄液

(0.05%Tween を含んだ PBS)でプレートを 4 回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、ブロッキング液 (10%FBS を含んだ PBS)100  $\mu$ L を入れ、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、PBS で 10 倍希釈した精製 IgG 分画を 100  $\mu$ 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 万倍希釈した HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100  $\mu$ L 入れ、室温で 1 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を 100  $\mu$ L 加え、発色させた。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止させ、Multiskan GO microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) で 450 nm の吸光度を測定した。プレート間の補正のため、ヒト化抗 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  抗体 (clone CRA2)を 62.5 ng / mL から 0.975 ng / mL まで倍々希釈したものを毎回必ず測定し、検量曲線を描き、検体の精製 IgG に含まれる抗  $\alpha$  鎖抗体濃度を算出した<sup>53</sup>。

#### 4. IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法

Nakamura らは、ヒト Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  鎖と nuclear factor of activated T cells (NFAT) – responsive luciferase reporter を発現したラット好塩基球白血病細胞株 (RS-ATL8 細胞)を用いて、luciferase の発光強度を測定することで、Fc  $\epsilon$  RI の架橋能を解析する方法を報告した。この方法は NFAT の核内移行が起こると、luciferase が発現し、この細胞破砕液に基質 (luciferase assay substrate)を添加することで発光する<sup>54</sup>。この EXiLE 法を応用して CSU 患者の精製 IgG 分画に含まれる抗  $\alpha$  鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能に差があるかどうかを調べた。

#### 5. 改良型 EXiLE 法を用いた抗 $\alpha$ 鎖自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能の測定

RS-ATL8 細胞の調整：RS-ATL8 細胞は国立医薬品食品衛生研究所、医薬安全

科学部室長、中村亮介博士のご厚意で供与して頂いた。RS-ATL8 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で 24 well plate に播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  下で 2 日間培養した。培地は MEM、 $10\% \text{FBS}$ 、 $1\% \text{glutaMAX-I}$ 、 $1\% \text{penicillin-streptomycin}$ 、 $0.5 \text{ mg/mL geneticin}$ 、 $0.2 \text{ mg/mL hygromycin B}$  を含んだ培養液 (MEM 培地) を培養に用いた。2 日後、well 中の上清を除去し、MEM 培地を 2 mL 加え、ピペッティングで plate に接着している RS-ATL8 細胞をはがし、1 mL ずつ別の well に播種して、上記同様に培養した。2 日後、well 中の上清を除去し、MEM 培地を 2 mL 添加した。その well から細胞をはがし、 $2 \times 10^4$  cells/well で、B&W IsoPlate-96 TC に播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  下で一晩培養した。

精製 IgG による刺激：翌日 well 中の上清を除き、PBS で well を洗浄後、CSU および NC 由来の  $25 \mu\text{L}$  の精製 IgG と  $25 \mu\text{L}$  の MEM 培地を混合したものを添加し、3 時間刺激した。

Luciferase assay：刺激後、上清を除き ONE-Glo Luciferase assay System を  $50 \mu\text{L}$  ずつ加え、細胞を破碎した。centro LB 960 microplate luminometer で発光を検出した。

fold increase の算出：fold increase は、RS-ATL8 細胞に MEM 培地のみを添加した発光強度を 1 として算出した。内在性のコントロールとして、CRA1 および  $1 \mu\text{g/mL}$  の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と  $1 \mu\text{g/mL}$  の Ionomycin (P+I) 刺激による発光強度を毎回測定した。また NFAT-responsive luciferase reporter のみを発現した RBL-2H3 細胞を帝京平成大学薬学部医薬品機能教育研究部門薬物治療学ユニット、秋山晴代先生のご厚意で供与して頂いた。この細胞はヒト  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha/\beta/\gamma$  鎖を発現していないが、NFAT-responsive luciferase reporter を発現させた細胞 (RBL-NH4) で、RS-ATL8 細胞のネガティブコントロールとして用いた。

## 6. 改良型 EXiLE 法を用いた抗 IgE 自己抗体による FcεRI の架橋能の測定

精製 IgG の MEM 置換：検体血清から精製した IgG は PBS で希釈されているため、EXiLE 法で使用できるように MEM 培地に置換した。amicon ultra-0.5 100 kDa のフィルターと付属のエッペンチューブをセットし、超純水を加えて 10000×g, 4°C で 2 分間遠心し、フィルター及びエッペンチューブ内の超純水を除去し、洗浄した。200 μL の MEM を洗浄したフィルターに加え、次いで 300 μL の検体精製 IgG を加えてピペッティングした。14000×g、4°C で 10 分間遠心後、フィルターを新しい付属エッペンチューブに逆向きにセットした。1000×g、4°C で 2 分間遠心すると、エッペンチューブに 15–30 μL 程の濃縮液が回収され、液量をピペットマンで測定した。濃縮液を回収したエッペンチューブに MEM 培地を加え共洗いし、1.5 mL エッペンチューブに 300 μL になるように移し、精製 IgG の MEM 置換を行った。精製 IgG 濃度は血清の 6 倍希釈となった。

抗 α 鎖自己抗体の吸着除去：吸着除去前日に 96 well ELISA plate に 1 μg/mL の可溶性 α 鎖 (0.1 M carbonate buffer, pH 9.6) を 100 μL/well で 4°C、一晩固相化し、この固相化プレートを 3 枚作製した。MEM 置換した精製 IgG を MEM 培地で 2 倍希釈した。固相化したプレートを室温に戻し、1 well 当たり 300 μL の PBS で 2 回洗浄した。希釈したサンプルを 1 well あたり 80 μL ずつ加え、室温で 30 分間静置し 1 回目の吸着を行った。1 回目の吸着後に各 well から上清を回収し、1 回目同様に可溶性 α 鎖を固相化したプレートを 2 回目、3 回目の吸着を行った。3 回目の吸着後、各 well の上清を全量回収し、抗 α 鎖自己抗体除去後の精製 IgG エッペンチューブにまとめて -30°C で保管した。抗 α 鎖自己抗体吸着除去後精製 IgG は使用前日に 4°C で保管し、実験に使用した。

EXiLE 法：抗 α 鎖自己抗体の架橋能測定と同様に、RS-ATL8 細胞を B&W IsoPlate-96 TC に 1 well 当たり  $2 \times 10^4$  cells/well で播種した培養プレートを用意した。抗 α

鎖自己抗体吸着除去後精製 IgG を 4 °C 保管から室温にもどした。ヒト IgE を 3 µg/mL に調整した。またコントロールとして抗ヒト IgG 抗体を 3.0, 1.0, 0.3, 0.1, 0.03 および 0.01 µg/mL の濃度で調整した。RS-ATL8 細胞の培養上清を除去し、PBS で洗浄した。調整したヒト IgE を 1 well 当たり 50 µL ずつ加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で感作した。感作後、上清を除去し、PBS で 2 回洗浄した。抗 FcεRIα 鎖抗体吸着除去後、精製 IgG および抗ヒト IgG 抗体を 1 well あたり 50 µL で細胞に加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>s 下で 3 時間 刺激した。発光の測定および fold increase の算出は抗 α 鎖自己抗体による FcεRI の架橋能の測定プロトコールと同様に行った。

#### 7. 自己血清皮内テスト(ASST)

EAACI/GA<sup>2</sup>LEN のガイドラインに準じて ASST を行った<sup>36</sup>。静脈血を 10 mL 採取し 15 分静置した後、3,000 rpm で 15 分遠心分離し血清を回収した。1 mL シリンジと 27G 針を用い、血清 50 µL を前腕屈側に皮内注射した。陰性コントロールとして血清注射部位から 3~5 cm 離れた部位に生理食塩水を 50 µL 皮内注射した。30 分後に判定し、膨疹の直径が陰性コントロールより 1.5 mm 以上ある場合を陽性と定めた。

#### 8. 患者背景との比較

実験で得られたデータと患者背景（性別、年齢、罹患期間、ASST の結果、重症度、他疾患の自己抗体の有無、末梢血非特異的 IgE 値、一般採血結果、シクロスポリンの治療効果）を調査した。重症度には国際的な蕁麻疹重症度評価方法である Urticaria Activity Score 7 (UAS7) を用いた<sup>55</sup>。他疾患の自己抗体として、抗核抗体、抗サイログロブリン抗体、抗マイクログローム抗体を測定し

た。シクロスポリンの治療効果は、シクロスポリン内服開始前と開始4週後のUAS7を比較した。UAS7とは患者の痒みの程度と（0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe）膨疹の数（0 = none, 1 = 1-20, 2 = 21-50, 3 = 50以上）によるスコアを1日ごとに合計し（スコア: 0-6）、さらにそのスコアを1週間分合計したものである。合計点が0点は蕁麻疹なし、1-6点がコントロール良好、7-15点が軽症、16-27点が中等症、28-42点が重症とした(表2)。

## 9. 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, CA, USA)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

### 1. 治療にシクロスポリンを用いた ASST 陽性群と ASST 陰性群の患者背景の比較

シクロスポリンを投与した患者 34 名中 (年齢中央値 47 歳 : 年齢幅 18 - 82)、ASST 陰性 13 人 (48%)、ASST 陽性は 21 名 (62%)であった (表 3)。ASST 陰性患者の一覧を表 4、ASST 陽性患者の一覧を表 5 に示す。ASST 陰性群および ASST 陽性群において、男女比、年齢、罹患期間、重症度 UAS7、血清 IgE 値、末梢好塩基球数、抗核抗体陽性率、抗サイログロブリン抗体陽性率、抗マイクログローム抗体陽性率、抗  $\alpha$  鎖自己抗体濃度と Fc $\epsilon$ RI 架橋能および抗 IgE 自己抗体濃度と Fc $\epsilon$ RI 架橋能には統計学的に有意差はみられなかった (表 3)。ASST 陰性群および ASST 陽性群においてシクロスポリンの治療効果を比較したところ、シクロスポリン治療により  $UAS \leq 6$  に至った患者の割合は ASST 陰性群で 13 人中 1 人 (8%)、ASST 陽性群で 21 人中 12 人 (43%) であり、ASST 陽性群のほうが  $UAS \leq 6$  となった割合が統計学的に有意に高かった ( $p = 0.0048$ ) (図 2)。

### 2. シクロスポリンの治療による UAS7 の推移

ASST 陰性群および ASST 陽性群のシクロスポリンの治療前後の UAS7 を観察した。両群ともに統計学的有意に UAS7 は低下した。ASST 陰性群ではシクロスポリン治療後に重症である  $UAS7 \geq 28$  は 13 人中 10 人 (77%)、中等症である  $16 \leq UAS7 \leq 27$  は 13 人中 2 人 (15%)、軽症である良好である  $UAS7 \leq 6$  は 13 人中 1 人 (8%)が存在した。ASST 陽性群では  $UAS7 \geq 28$  は 21 人中 4 人 (19%)、軽症である  $7 \leq UAS7 \leq 15$  は 21 人中 5 人 (24%)、軽症である良好である  $UAS7 \leq 6$  は 21 人中 12 人 (57%)が存在した(図 3A,B)。

### 3. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群の患者背景の比較

シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群において患者背景を比較した。男女比 (図 4A)、年齢 (図 4B)、罹患期間 (図 4C)、治療前 UAS7 (図 4D)、末梢好塩基球数、抗核抗体陽性率、抗サイログロブリン抗体陽性率、抗マイクロゾーム抗体陽性率において統計学的に有意差はなかった。

### 4. シクロスポリンの治療と血清 IgE 値の関係

シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群のシクロスポリン治療前の血清 IgE 値は、UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン治療前の血清 IgE 値よりも、有意に低値であった ( $p=0.0003$ ) (図 5A)。ROC 曲線を作成し、血清 IgE 値の最適なカットオフ値を算出したところ、カットオフ値は 88.5 であった。このときの感度は 91%、特異度は 69.2% およびオッズ比は 9.56 であった。ASST に加え、血清 IgE 値もシクロスポリンの治療のバイオマーカーになることが考えられた。

### 5. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体の濃度の比較

他の因子がバイオマーカーになりうるかを検証するために、まず抗  $\alpha$  鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体自己抗体の濃度を測定した。UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の間で抗  $\alpha$  鎖自己抗体 (図 6A) および抗 IgE 自己抗体濃度 (図 6B) に有意な差はみられなかった。

### 6. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体による Fc $\epsilon$ RI 架橋能との関係

UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群間において抗  $\alpha$  鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体の濃度に有意な差はみられなかったために、次にシクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$

6群と UAS7>6群において抗 $\alpha$ 鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体の Fc $\epsilon$ RI 架橋能を比較した。両群において抗 $\alpha$ 鎖自己抗体 (図 7A)および抗 IgE 自己抗体 (図 7B)による Fc $\epsilon$ RI 架橋能に統計学的な有意差はみられなかった。

#### 7. ASST 陰性群, ASST 陽性群の血清 IgE カットオフ値でのシクロスポリンの治療効果の比較

治療前に ASST が陽性であること (図 2, 3)および治療前の血清 IgE 値が低値 (図 5)であることが、シクロスポリンの効果予測のバイオマーカーになる可能性が考えられたため、2つのパラメーターとシクロスポリンの治療効果の関係を調べた。図 5 で算出した血清 IgE 値 88.5 を用いて、シクロスポリン投与患者を ASST 陰性かつ血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群 (図 8A)、ASST 陽性かつ血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群 (図 8B)、ASST 陰性かつ血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群 (図 8C) そして ASST 陽性かつ血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群 (図 8D)の 4つのグループにわけた。シクロスポリンの治療前後の UAS7 を比較したところ、ASST 陰性かつ血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群で 4人中 1人 (25%)、ASST 陽性かつ血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群で 9人中 8人 (89%)、ASST 陰性かつ血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群で 9人中 0人 (0%)、ASST 陽性かつ血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群で 12人中 4人 (31%)がシクロスポリンの治療によって UAS $\leq$ 6 となった。

#### 8. ASST 陽性群における血清 IgE カットオフ値でのシクロスポリンの治療効果の比較

ASST 陽性群で血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 群および血清 IgE 値 $>$ 88.5 群でシクロスポリンの治療後に UAS $\leq$ 6 になった患者の割合を比較したところ、血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 群の方が血清 IgE 値 $>$ 88.5 群よりも、UAS $\leq$ 6 になった割合が統計学的に有意に高値であった ( $p=0.024$ ) (図 9)。また、ASST と血清 IgE 値の間に関係があるか調

べるために、血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 群および血清 IgE 値 $>$ 88.5 群で ASST の陽性率を比較した。血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 群および血清 IgE 値 $>$ 88.5 群で、ASST の陽性率に有意な差はみられなかった ( $p = 0.727$ ) (図 10)。ASST と血清 IgE 値は独立した因子であった。したがって治療開始前に ASST が陽性であることと血清 IgE 値がカットオフ値以下であることが、シクロスポリンの治療によってコントロール良好となりうる患者を見出すバイオマーカーになることが示唆された。

## 考察

本研究では、治療開始前に施行した ASST が陽性であること、血清 IgE 値がカットオフ値以下 ( $\leq 88.5$  IU/ml)であることがシクロスポリンの治療効果を示すバイオマーカーとして有用であることが判明した (図 2, 5A)。これまでにシクロスポリンの治療前に効果を予測するバイオマーカーはなかった。本研究の成果は、シクロスポリンの治療の効果予測のための重要な指標になることが示唆された。

ASST 陽性とは、陰性コントロールとして用いた生理食塩水を皮下に注射した部位より、自己血清を皮下に注射したときに生じる膨疹が 1.5mm 以上になることである。ASST 陽性の原因となる因子を検討した報告では、ASST 陽性患者の血清の補体や IgE の不活性化、IgG の除去をしても ASST が陽性であることから、膨疹の誘発には、補体、IgE や IgG 抗体は重要ではないという報告がある<sup>35</sup>。本研究においては ASST 陽性群と ASST 陰性群に臨床的な背景に違いはなく、抗  $\alpha$  鎖自己抗体と抗 IgE 抗体の濃度と Fc $\epsilon$ RI 架橋能にも有意な差はみられなかった (表 3)。これらのことから、ASST 陽性の原因として、膨疹は自己抗体によって誘発されるのではないと考えられた。ASST 陽性の患者においてシクロスポリンの治療後に再度 ASST を行うと誘発される膨疹の大きさがシクロスポリンの治療前より小さくなることや<sup>56</sup>、血漿交換療法や免疫グロブリン大量療法の有効性も報告されていることから<sup>57 58 59</sup>、なんらかの血清の因子が ASST 陽性の CSU 患者の病態に関与していると考えられる。この血清の因子としてサイトカイン、脂質メディエーター、神経ペプチドなどが想定されるが、今後検討が必要である。

シクロスポリンの作用機序は、T 細胞内のカルシニューリンを阻害し、NFAT の活性化を阻害し、IL-2 の産生が低下することが知られている<sup>60</sup>。さらにシクロ

スポリンは好塩基球やマスト細胞に作用し、ヒスタミン遊離を抑制する<sup>61 62 63</sup>。これらの既知の作用機序からは ASST 陰性群も ASST 陽性群にもシクロスポリンが有効であると推測はできるが、ASST 陰性群にはシクロスポリンの効果は乏しかった (図 3)。したがって、ASST 陽性患者の血清中には、NFAT を活性化させる因子が含まれている可能性も考えられる。その可能性の一つとしては神経ペプチドの一つであるサブスタンス P の存在が挙げられる。サブスタンス P が NFAT の転写因子を活性化させることが報告されている<sup>64</sup>。サブスタンス P と ASST との関係は明らかではないが、蕁麻疹の重症度と正の相関関係がある<sup>4</sup>。今後、サブスタンス P と ASST の関係、シクロスポリンの治療効果の関係を検討する必要がある。

ASST はガイドラインに準じて、自己血清を皮内に注射して生じた膨疹が陰性コントロールより 1.5 mm 以上ある場合を陽性と判定した<sup>36</sup>。ASST の陽性率に幅があるために他施設で行う場合もガイドラインに準拠した方法で行う必要がある。また抗ヒスタミン薬もガイドラインに準じて ASST の実施 2 日前から休薬を行った。抗ヒスタミン薬内服後に経時的ヒスタミンによるプリックテストを行った研究では、2 日間の抗ヒスタミン薬の休薬で皮膚マスト細胞の脱顆粒に影響しなかったと報告がある<sup>65 66 67</sup>。さらに *in vitro* で抗ヒスタミン薬の皮膚マスト細胞の脱顆粒への影響を検討した研究では、抗ヒスタミン薬の一つであるケトフェチンは濃度 0.01-10 $\mu$ M の添加では IgE 依存性の活性化による皮膚マスト細胞の脱顆粒を抑制しないと報告されている<sup>68</sup>。しかし、ケトフェチンを経口投与した場合の最高血中濃度は 1.6nM であり<sup>69</sup>、皮膚マスト細胞の脱顆粒に影響しないと推測できる。したがって、抗ヒスタミン薬が ASST の結果に与えた影響は少ないと考える。今後統一されたプロトコールで ASST を施行すれば、他施設でもシクロスポリンの効果を予測することが可能であると考えられる。

血清 IgE 値がカットオフ値以下であることもシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーとなることが判明した。ヒトでは報告はないが、マウスでは血清 IgE 値の産生は抗ヒスタミン薬の影響を受けないと報告されている<sup>70</sup>。血清 IgE 値の高値はヒト化抗 IgE モノクローナル抗体であるオマリズマブの治療のバイオマーカーになり、治療効果を示すことが報告されている<sup>43,71</sup>。オマリズマブの作用機序として以下のことが知られている。オマリズマブがフリーの IgE と結合し、血中のフリーの IgE を減少させ、その結果、好塩基球やマスト細胞上の FcεRI の発現が低下し、好塩基球やマスト細胞の脱顆粒が抑制される<sup>26</sup>。オマリズマブが形質細胞からの IgE 産生を低下させる<sup>72</sup>。実際に、オマリズマブは末梢血好塩基球の FcεRI の発現が高い患者に対して治療効果が高く、オマリズマブの開始とともに末梢血好塩基球の FcεRI の発現は低下する<sup>45</sup>。このようにオマリズマブは IgE-FcεRI の経路が病態の中心となる CSU 患者群で効果があることが推測される。本邦での CSU に対するオマリズマブの使用成績は UAS7 ≤ 6 になる割合が 54.3%であった<sup>73</sup>。このオマリズマブが効かない残りの群が、IgE-FcεRI の経路が CSU の病態の中心にない CSU 群である可能性は考えられる。本研究ではシクロスポリンの効果は 34 人中 13 人(38%)にみられ、オマリズマブが効かない群はシクロスポリンが効く群に相当する可能性が考えられる。

近年 CSU 患者の血清の自己反応性の IgE が網羅的に解析された。CSU 患者が抗 IL-24 IgE 抗体をもち、ヒトマスト細胞を脱顆粒させる機能があり、さらに UAS7 と有意な相関関係があることが報告されている<sup>74</sup>。自己反応性の IgE とオマリズマブの関係は明らかではないが、理論的にはオマリズマブの作用機序と自己反応性の IgE の存在は合致している。一方でシクロスポリンは自己反応性の IgE 以外のものが関与する蕁麻疹で効果がみられやすいと考えられる。

シクロスポリンとオマリズマブのバイオマーカーが血清 IgE 値に関して正反

対の結果であった。また、ASST 陰性群は ASST 陽性群よりオマリズマブの治療効果が早期にみられるとの報告もある<sup>41</sup>。ASST に関してもシクロスポリンとオマリズマブのバイオマーカーと正反対の結果となった。これらをまとめると CSU の病態に少なくとも二群が存在することが考えられる。一方は ASST 陽性群であり、血清になんらかの蕁麻疹を誘発する因子が存在する。もう一方は ASST 陰性群であり、IgE-FcεRI 経路が中心となる群である。今後 CSU の病態をこれら二群にわけること、CSU の病態解明につながると考えられる。

現在の CSU の治療のガイドラインではオマリズマブが効かない場合にシクロスポリンを用いるアルゴリズムになっている (図 1)。ガイドラインではオマリズマブは 6 カ月間の投与で治療の効果判定と記載があり<sup>1</sup>、実際にオマリズマブ開始後 3-6 カ月で緩徐に効果がみられる患者も存在する<sup>75</sup>。つまりオマリズマブが効果的であるかどうかを判断するために、時間が必要であり、その間の医療費などの患者の負荷が増えることになる。本研究から、治療開始前に ASST 陽性で血清 IgE 値がカットオフ値以下であればシクロスポリンによって  $UAS7 \leq 6$  に至る可能性が高いことがわかった。抗ヒスタミン薬の治療に対して抵抗性である場合にオマリズマブとシクロスポリンのどちらかが効きやすいかの判断でき、患者の身体的、精神的負担の軽減につながり、早期の CSU の治癒にもつながると考えられる。

## まとめ

- ① ASST 陽性群では ASST 陰性群に比べて、シクロスポリンの治療が有意に有効であることがわかった。ASST はシクロスポリンの治療効果予測のバイオマーカーであることがわかった。
- ② シクロスポリンの治療後  $UAS7 \leq 6$  群は治療後  $UAS7 > 6$  群と比べて、血清 IgE 値は有意に低値であった。シクロスポリンの治療効果予測の血清 IgE 値のカットオフ値は 88.5IU/mL であった。血清 IgE 値はシクロスポリンの治療効果予測の簡便なバイオマーカーであることがわかった。
- ③ ASST と血清 IgE 値はそれぞれ独立した因子であり、ASST 陽性かつ血清 IgE 値が低値であることは、シクロスポリンがさらに有効であることがわかった。
- ④ 抗  $\alpha$  鎖自己抗体および抗 IgE 自己抗体の濃度および Fc $\epsilon$ RI 架橋能は ASST 陽性群と ASST 陰性群において有意な差はみられなかった。これら自己抗体はシクロスポリンの治療効果をわける因子ではなかった。
- ⑤ CSU の治療でシクロスポリンとオマリズマブを選択する上で、ASST と血清 IgE 値がバイオマーカーとなった。ASST 陽性・血清 IgE 低値はシクロスポリン、ASST 陰性・血清 IgE 高値はオマリズマブが勧められる。

## 謝辞

本研究は、日本大学医学部免疫・アレルギー学プロジェクトチーム IR・医学教育センターにおいて実施されたものです。

本研究に関して、研究並びに学位論文のご指導、ご校閲を直接賜りました同グループの岡山吉道准教授に深謝いたします。研究のご指導を賜りました豊島翔太博士、坂本明美氏、鐘ヶ江佳寿子氏、日本大学医学部血液膠原病内科の下川敏文博士、岩田光浩博士、日本大学医学部皮膚科の葉山惟大博士、藤澤大輔博士、伊崎聡志博士、西盛信幸博士、伊東真奈先生に深謝いたします。

本研究の統計学的解析につきご指導賜りましたすがいこどもクリニックの菅井和子博士に深謝いたします。

本研究に使用する細胞をご提供いただきました、国立医薬品食品衛生研究所、医薬安全科学部室長、中村亮介博士、および帝京平成大学薬学部医薬品機能教育研究部、秋山晴代博士に深謝致します。

本研究のご指導を賜りました日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野、照井正教授に深謝致します。

本研究は患者様のご協力なしには不可能なものでした。快く血液を提供してくださった患者様方に深謝致します。

## 図表

表 1. 蕁麻疹の分類

特発性	急性蕁麻疹
	慢性特発性蕁麻疹
刺激誘発性	寒冷蕁麻疹
	遅延性圧蕁麻疹
	温熱蕁麻疹
	日光蕁麻疹
	水蕁麻疹
	振動性血管浮腫
	コリン性蕁麻疹
	接触蕁麻疹

表 2. Urticaria activity score 7 (UAS7)を用いた重症度判定

スコア	膨疹	痒み
0	なし	なし
1	軽症 (24時間あたり20個未満の膨疹)	軽症 (痒みはあるが煩わしさや厄介さはない)
2	中等症 (24時間あたり20・50個の膨疹)	中等症 (厄介ではあるが日常生活の活動や睡眠を妨げない)
3	重症 (24時間あたり51個以上の膨疹、あるいは大きな融合性の膨疹)	重症 (重度の痒みで日常生活の活動や睡眠を妨げるのに十分厄介である)

スコアの合計：1日 0・6点のスコアを1週間分合計する

表 3. ASST 陰群と ASST 陽性群の比較

	全体	ASST 陰性	ASST 陽性	P 値
人数	34	13	21	
女性 (%)	59	62	57	> 0.999 #
年齢 中央値 (範囲)	47 (18-82)	47 (18-82)	46 (32-82)	0.965 †
罹患期間 (月) 中央値 (範囲)	18 (2-480)	30 (2-300)	13 (2-480)	0.396 †
Urticaria Activity Score 7, 平均 (範囲)	33 (20-42)	34 (21-42)	32 (20-42)	0.424 †
血清 IgE 値 (IU/mL, 平均 ±)	258 ± 384	231 ± 230	275 ± 459	0.576 †
末梢血好塩基球数 (/mm <sup>3</sup> , 平均 ± SD)	33.1 ± 26.4	34.2 ± 29.2	32.5 ± 25.3	0.979 †
抗核抗体陽性率 (%)	12	15	9.5	0.627 #
抗サイログロブリン抗体陽性率 (%)	8.8	7.7	9.5	> 0.999 #
抗マイクロソーム抗体 (%)	8.8	0	14	0.270 #
抗 FcεRIα 自己抗体濃度 (μg/mL, 平均 ± SD)	1.83 ± 1.95	1.21 ± 1.29	2.20 ± 2.20	0.129 †
抗 IgE 自己抗体濃度 (μg/mL, 平均 ± SD)	1.22 ± 1.35	0.83 ± 0.39	1.47 ± 1.67	0.353 †
抗 FcεRIα 自己抗体 FcεRI 架橋能 (FI, 平均 ± SD)	1.74 ± 2.44	1.03 ± 0.09	2.18 ± 3.05	0.071 †
抗 IgE 自己抗体 FcεRI 架橋能 (FI, 平均 ± SD)	1.22 ± 1.35	1.26 ± 0.21	1.60 ± 0.73	0.056 †

標準偏差 (standard deviation, SD)、Fold increase (FI)

# Fisher exact test, † Mann Whitney U test

表 4. ASST 陰性群の患者データ一覧

患者番号	性別	年齢	罹患期間(月)	治療前 UAS7	治療後 UAS7	血清 IgE値 (IU/ml)	末梢血好塩基球数 (/mm <sup>3</sup> )	抗α鎖自己抗体濃度(μg/ml)	抗IgE自己抗体濃度(μg/ml)	抗α鎖自己抗体架橋能(FI値)	抗IgE自己抗体架橋能(FI値)	治療歴
1	女	18	4	42	28	27	20.4	5.04	0.88	1.08	1.19	H1, H2
2	女	27	13	35	35	67	13.8	0.56	0.30	1.04	1.48	H1, H2
3	男	33	84	28	16	562	19.4	2.09	1.30	0.90	1.19	H1, H2
4	男	36	2	35	28	81	24.0	1.56	0.88	1.15	1.39	H1, H2
5	男	42	2	35	28	233	36.0	1.66	0.15	1.00	1.14	H1, H2
6	女	45	300	21	21	122	31.0	1.00	1.41	0.89	1.43	H1, H2
7	女	47	96	35	28	272	9.0	0.56	0.95	1.12	1.27	H1, H2, LT
8	女	60	30	42	38	830	11.4	1.18	0.80	0.87	1.41	H1, H2
9	男	61	84	42	35	275	89.0	0.25	0.95	1.07	1.35	H1, H2
10	男	63	24	28	21	230	29.5	0.42	0.28	0.96	0.65	H1, H2, LT
11	女	67	72	42	0	2	70.2	0.79	1.02	1.08	1.29	H1, H2
12	女	71	6	35	28	156	89.6	0.23	1.21	1.08	1.16	H1, H2, LT
13	女	82	24	28	35	180	12.4	0.42	0.64	1.10	1.46	H1, H2, LT

Fold increase (FI)、抗ヒスタミン薬(H1)、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬(H2)、ロイコトリエン拮抗薬(LT)

表 5. ASST 陽性群の患者データ一覧

患者番号	性別	年齢	罹患期間(月)	治療前UAS7	治療後UAS7	血清IgE値(IU/ml)	末梢血好塩基球数(/mm <sup>3</sup> )	抗α鎖自己抗体濃度(μg/ml)	抗IgE自己抗体濃度(μg/ml)	抗α鎖自己抗体架橋能(FI値)	抗IgE自己抗体架橋能(FI値)	治療歴
1	女	32	7	42	14	173	0.0	6.54	7.09	1.64	1.57	H1, H2, LT
2	男	34	20	21	0	207	15.6	2.55	0.70	9.18	1.65	H1, H2
3	男	35	60	21	10	530	24.0	1.42	0.63	1.13	1.46	H1, H2, LT
4	男	38	14	35	32	129	38.5	1.58	1.82	1.06	1.73	H1, H2
5	女	39	240	28	0	73	66.6	1.41	0.40	1.12	1.32	H1, H2, LT
6	女	39	15	35	0	108	82.8	5.28	0.56	1.04	1.27	H1, H2, LT
7	女	39	48	28	4	29	10.6	0.71	0.92	1.65	1.38	H1, H2
8	女	41	36	20	0	15	22.4	2.14	2.06	0.88	1.16	H1, H2, LT
9	男	42	120	35	0	154	63.2	0.71	0.78	1.00	1.41	H1, H2
10	女	46	6	28	7	77	67.2	7.47	1.39	1.42	1.32	H1, H2
11	女	46	3	42	28	459	21.0	4.59	1.82	1.08	1.26	H1, H2
12	女	47	18	28	6	83	37.2	1.08	1.32	0.97	1.32	H1, H2, LT
13	女	51	2	28	0	46	13.8	0.69	0.33	1.33	1.60	H1, H2
14	男	51	12	35	2	63	22.4	0.83	0.38	1.06	1.35	H1, H2
15	男	56	30	42	14	507	62.1	0.34	NA	1.00	1.43	H1, H2, LT
16	男	63	3	42	35	90	8.0	0.39	1.21	2.87	2.54	H1, H2
17	男	65	3	42	28	545	50.4	1.30	0.43	1.15	1.32	H1, H2
18	女	71	2	30	7	211	19.5	0.62	0.34	0.96	1.46	H1, H2
19	男	73	6	21	0	87	31.2	0.57	4.85	1.00	1.32	H1, H2, LT
20	女	73	480	30	0	171	49.0	5.21	1.03	1.15	1.29	H1, H2
21	女	82	12	42	0	8	8.2	0.78	1.28	12.97	4.54	H1, H2

Fold increase (FI)、抗ヒスタミン薬(H1)、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬(H2)、ロイコトリエン拮抗薬(LT)

図 1. CSU 治療のアルゴリズム

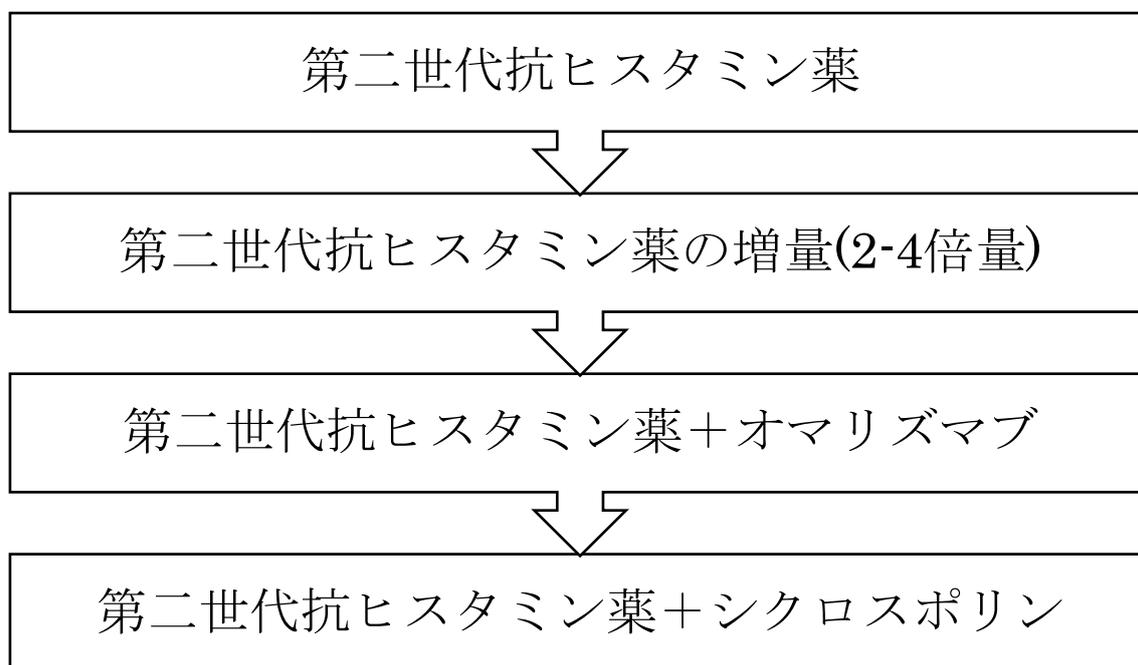


図 2. ASST 陰性群と ASST 陽性群のシクロスポリン治療効果の比較

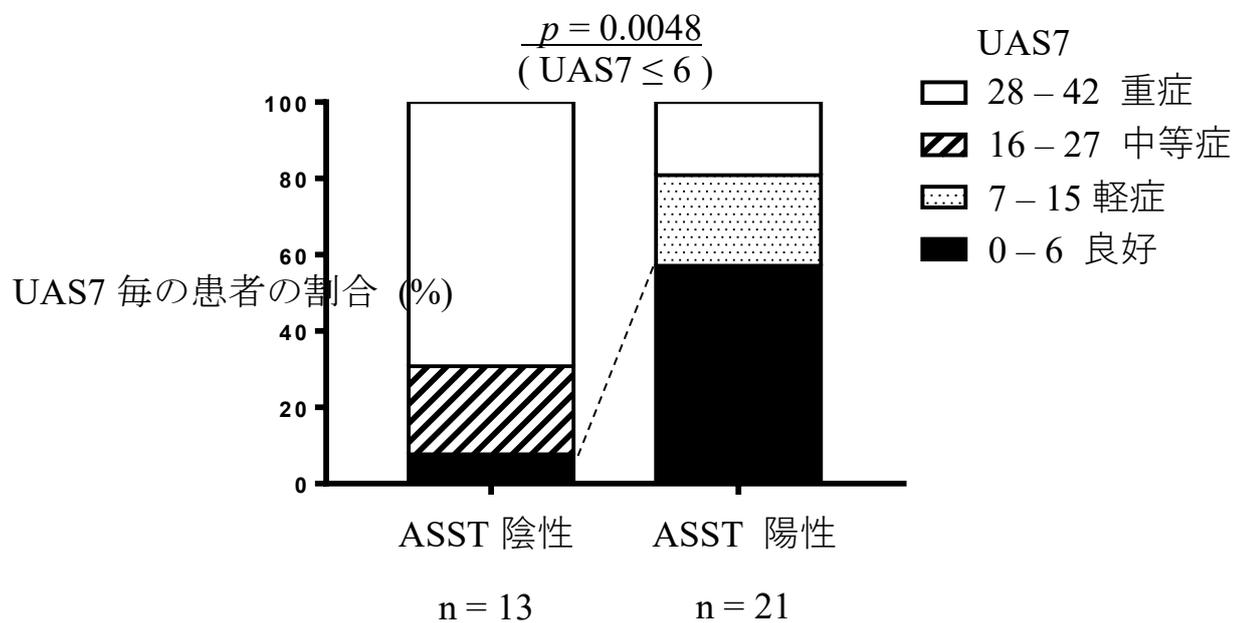


図 3. シクロスポリンの治療による UAS7 の推移  
 (A) ASST 陰性群 (B) ASST 陽性群

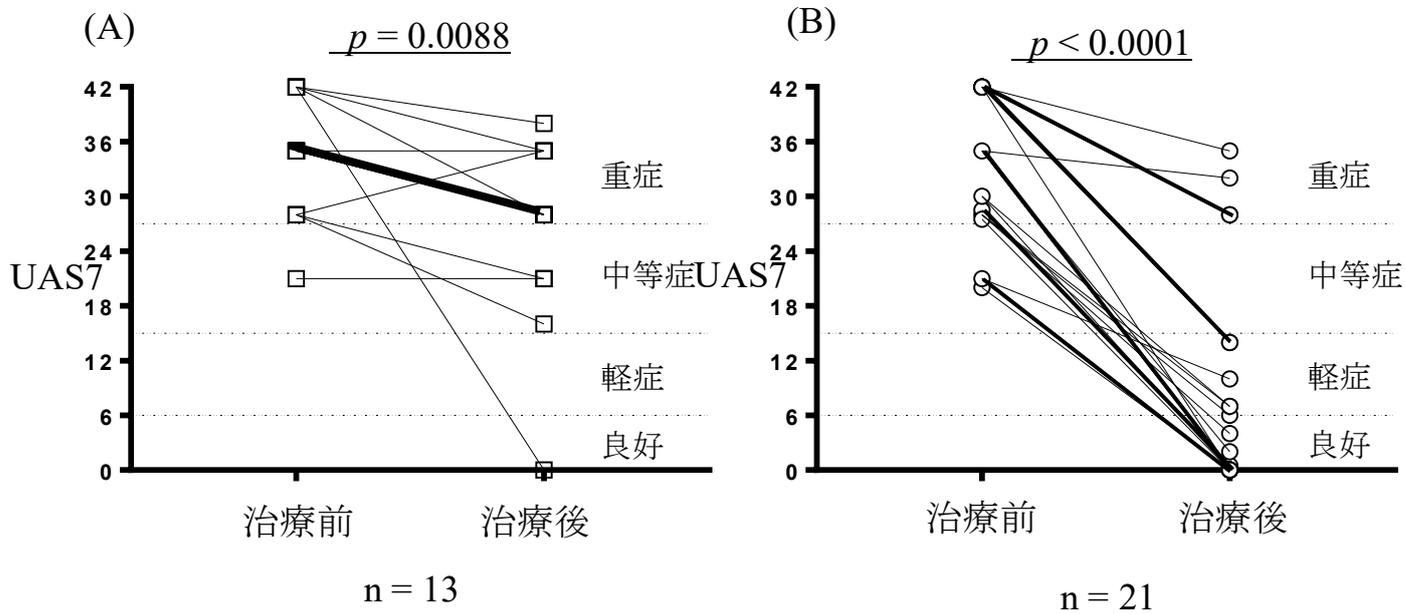


図 4. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群の臨床背景の比較

(A) 男女比 (B) 年齢 (C) 罹患期間 (D) 治療前 UAS7

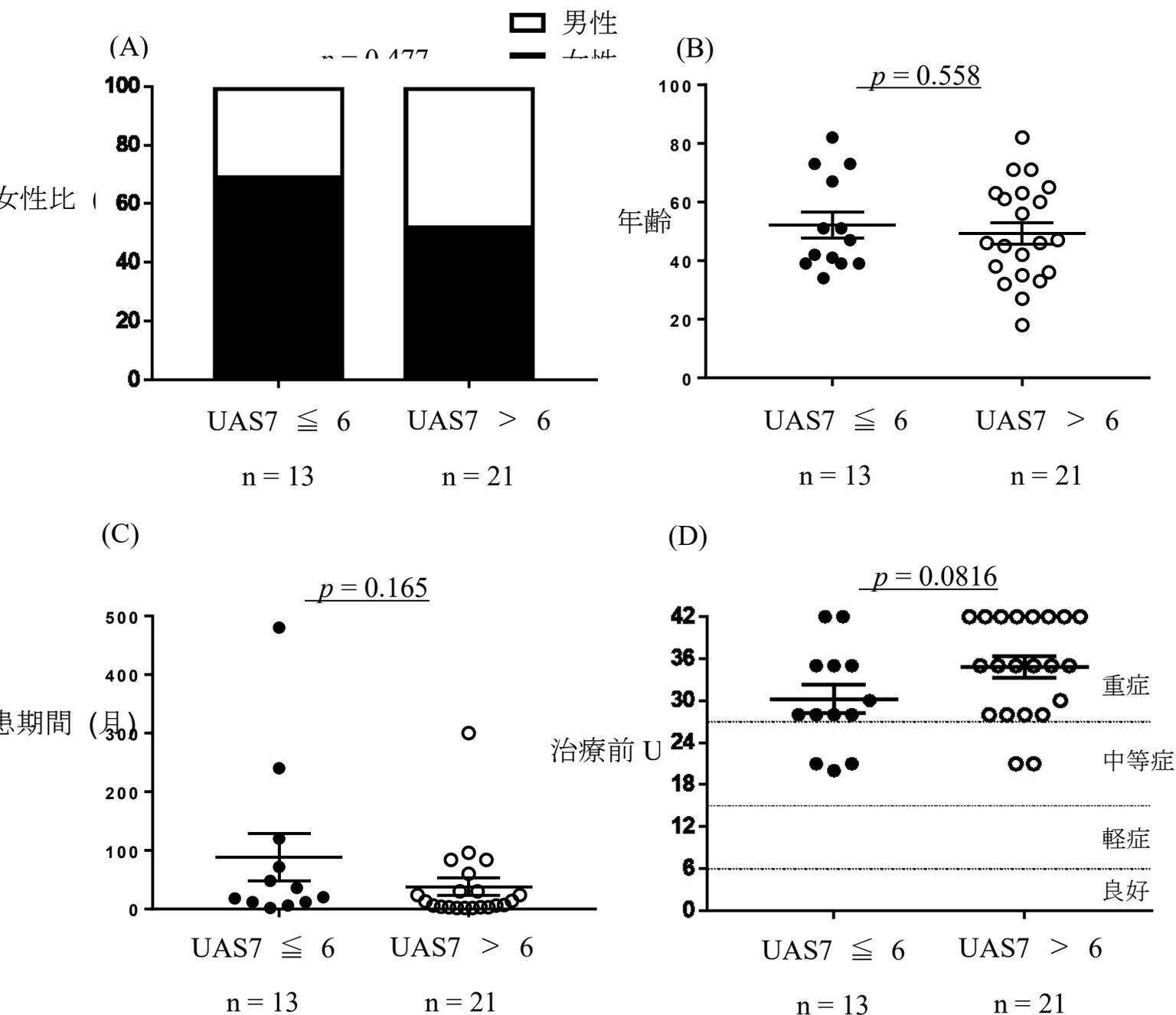


図 5. シクロスポリンの治療と血清 IgE 値の関係

(A) 治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン投与前血清 IgE 値の比較

(B) 血清 IgE 値の ROC 曲線

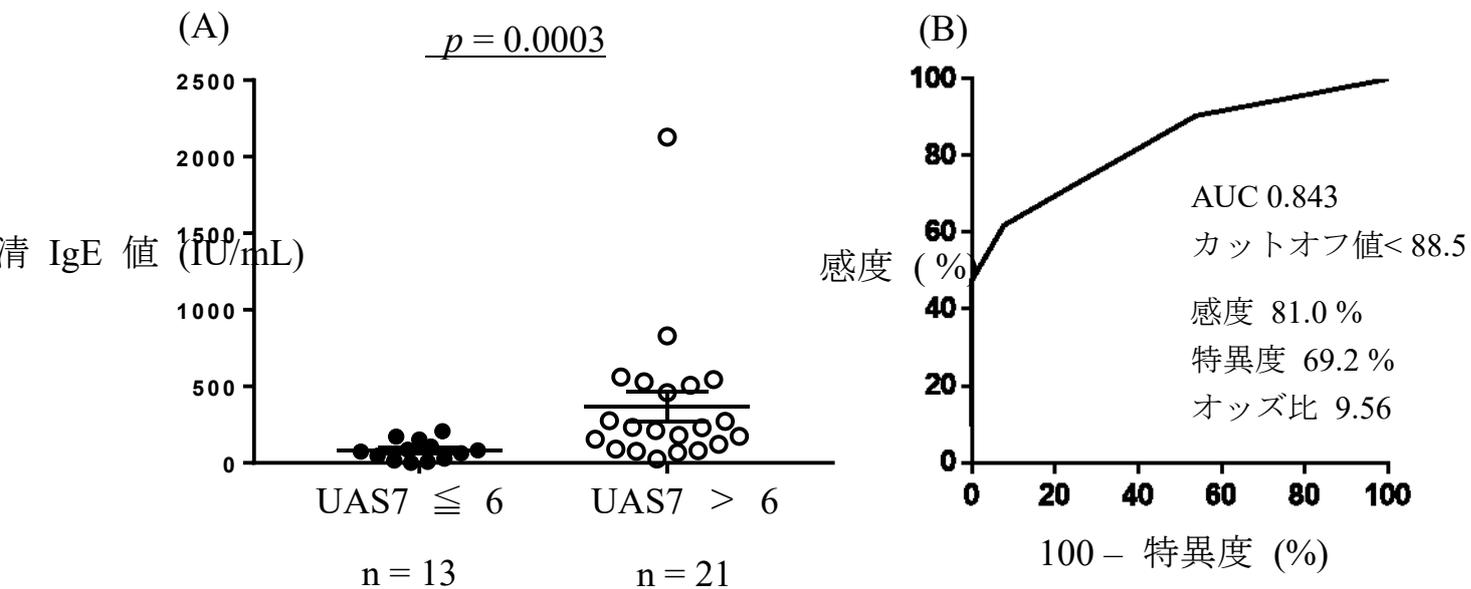


図 6. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体濃度の比較

(A) 抗 $\alpha$ 鎖自己抗体 (B) 抗 IgE 自己抗体

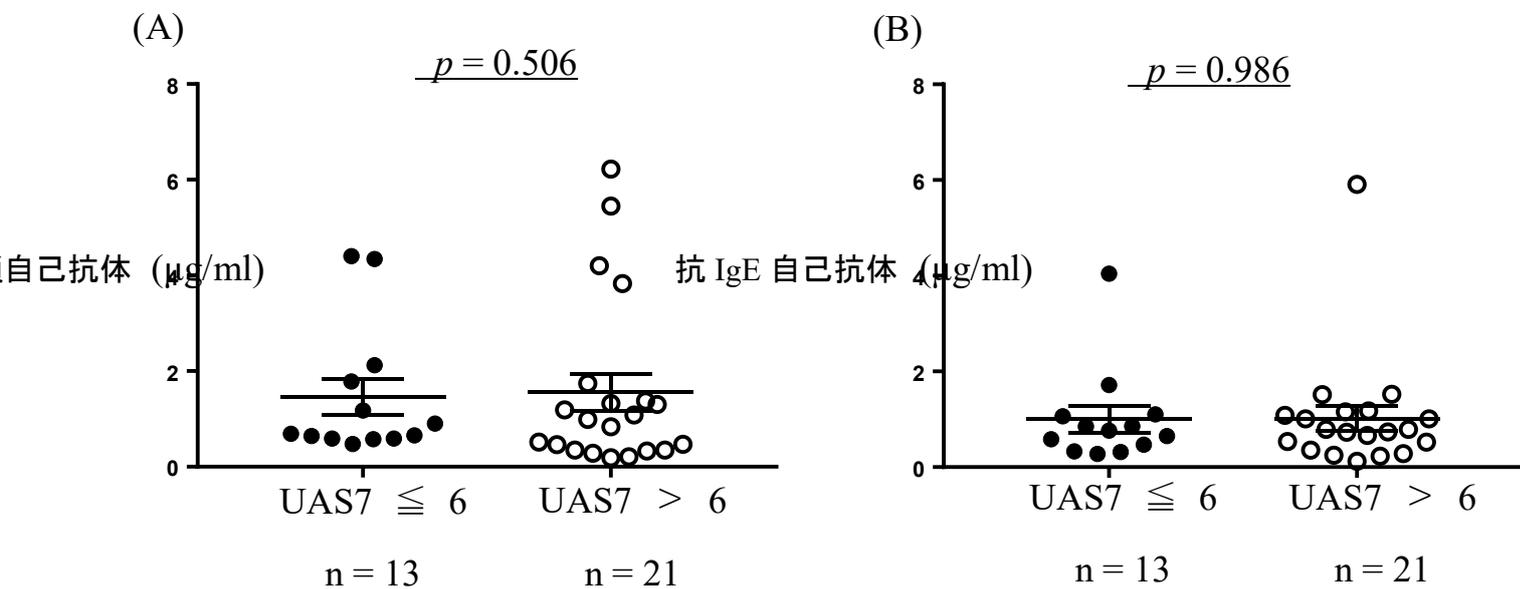


図7. シクロスポリンの治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体による Fc $\epsilon$ RI 架橋能の比較

(A) 抗 $\alpha$ 鎖自己抗体 (B) 抗 IgE 自己抗体

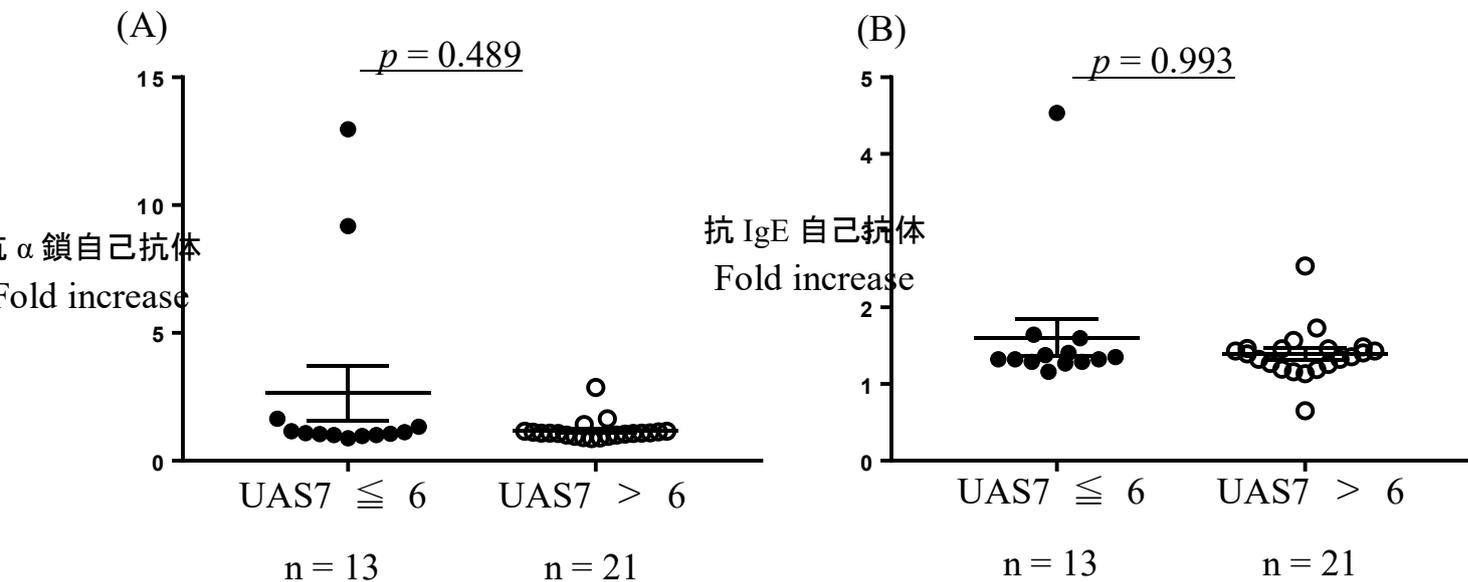


図8. ASST 陰性群、ASST 陽性群の血清 IgE 値カットオフ値でのシクロスポリンの治療効果の比較

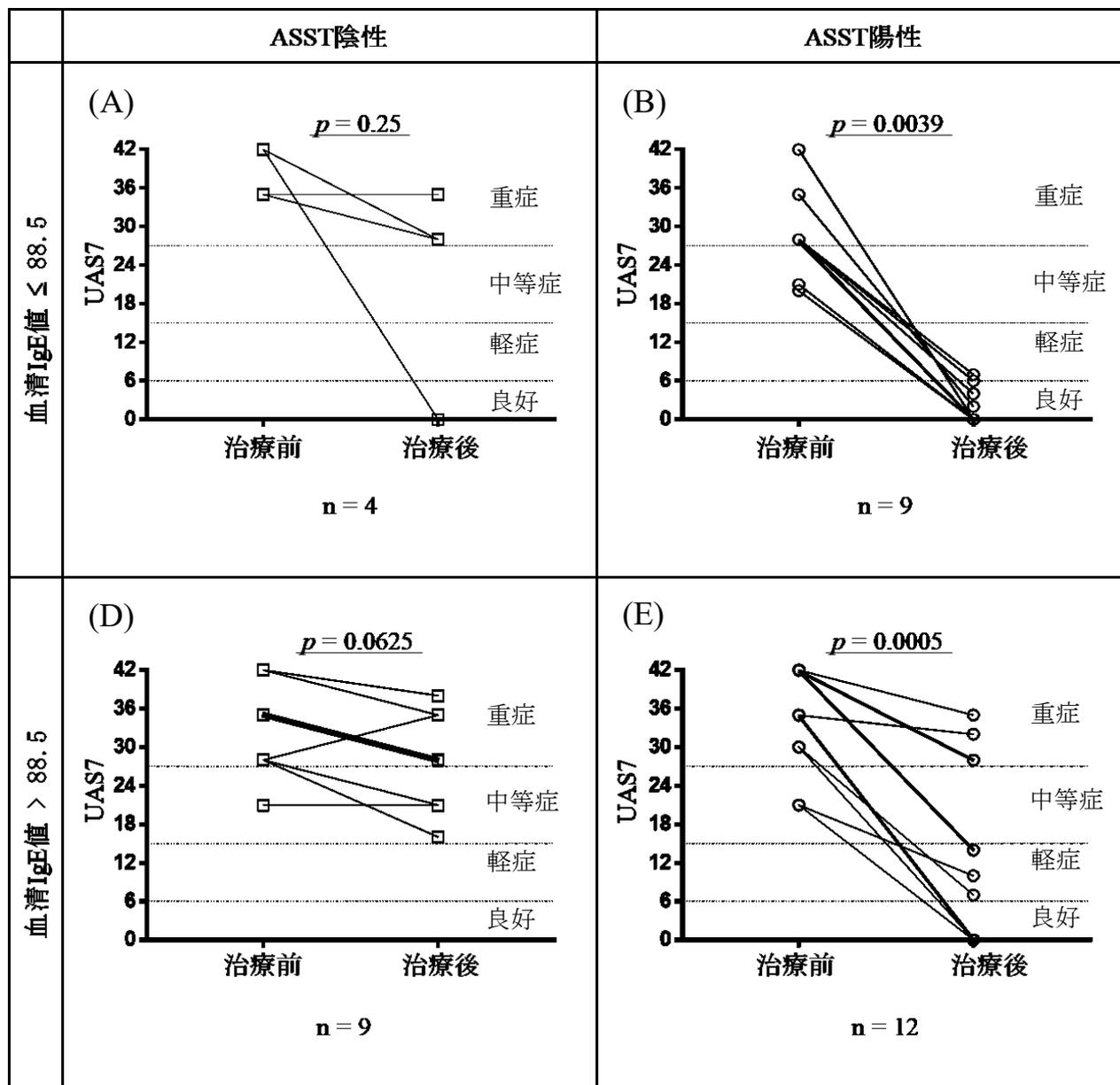


図 9. ASST 陽性群における IgE カットオフ値でのシクロスポリンの治療効果の比較

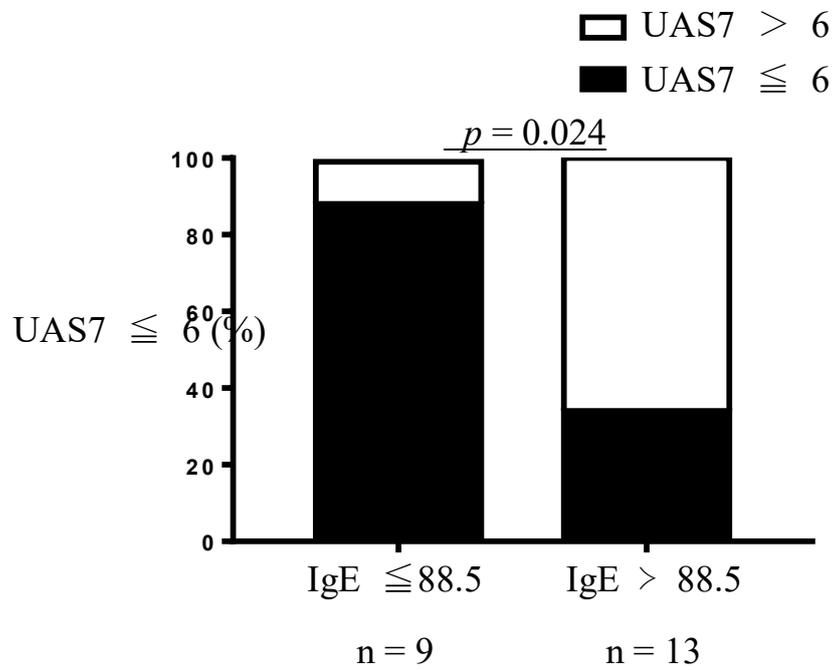
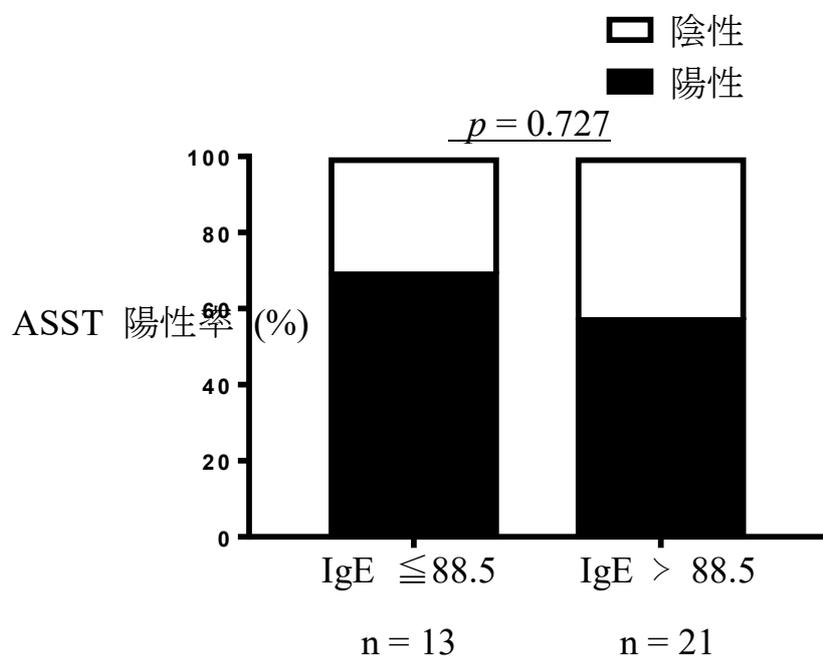


図 10. 血清 IgE 値カットオフ値での ASST 陽性率の比較



## 図説

### 図 1. CSU 治療のアルゴリズム

CSU の治療にはまず第 2 世代の抗ヒスタミン薬が用いられる。2-4 週間経過しても、かゆみや膨疹が出現を繰り返すようであれば 2 倍もしくは 4 倍量の抗ヒスタミン薬を用いる。抗ヒスタミン薬の増量による効果がみられない場合はヒト化抗 IgE モノクローナル抗体であるオマリズマブを用いる。さらにオマリズマブ治療にも効果がみられない場合は免疫抑制剤のシクロスポリンを用いる。

### 図 2. ASST 陰性群と ASST 陽性群のシクロスポリンの治療効果の比較

シクロスポリンの治療後の重症度の割合 (UAS7) を ASST 陰性および ASST 陽性に分けて示した。統計学的解析には Fisher exact test を行った。

### 図 3. シクロスポリンの治療による UAS7 の推移

(A) ASST 陰性群 (n=13) において、シクロスポリンの治療前後の UAS7 の推移を示した (太線は 4 人の重複を示す)。

(B) ASST 陽性群 (n=21) において、シクロスポリンの治療前後の UAS7 の推移を示した (太線は 2 人の重複を示す)。

統計学的解析には Mann Whitney U test を行った。

### 図 4. シクロスポリン治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の臨床背景の比較

シクロスポリンの治療後の UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群間の女性比(A)、年齢 (B)、罹患期間 (C)、治療前 UAS7 (D)を比較した。シンボルは患者個人を表し、(B, C) 線は、中央値と標準誤差を示している。(D) 線は平均値と標準誤差を示している。統計学的解析には(A) Fisher exact test、(B, C, D) Mann Whitney U test を行った。

### 図 5. シクロスポリンの治療と血清 IgE 値の関係

(A) 治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン投与前血清 IgE 値シンボルは患者個人を表し、線は平均値と標準誤差を示している。統計学的解析には Mann Whitney U test を行った。

(B) ROC 曲線 (AUC 0.843)を作成し、適切なカットオフ値を算出した。カットオフ値を IgE $<$ 88.5IU/mL としたときの感度は 81.0%、特異度は 69.2%であり、オッズ比 9.56 であった。

### 図 6. シクロスポリン治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体濃度の比較

(A) 図は治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン投与前の抗  $\alpha$  鎖

自己抗体濃度を示している。

(B) 図は治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン投与前の抗 IgE 自己抗体濃度を示している。

シンボルは患者個人を表し、線は平均値と標準誤差を示し、統計学的解析は Mann Whitney U test を行った。

図 7. シクロスポリン治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と UAS7 $>$ 6 群の自己抗体による Fc $\epsilon$ RI 架橋能の比較

(A) 図は治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン投与前の抗  $\alpha$  鎖自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能を示している。

(B) 図は治療後 UAS7 $\leq$ 6 群と治療後 UAS7 $>$ 6 群のシクロスポリン投与前の抗 IgE 自己抗体による Fc $\epsilon$ RI の架橋能を示している。

シンボルは患者個人を表し、線は平均値と標準誤差を示し、統計学的解析は Mann Whitney U test を行った。

図 8. ASST 陰性群、ASST 陽性群の血清 IgE 値カットオフ値でのシクロスポリン治療効果の比較

(A) ASST 陰性かつ血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群、(B) ASST 陽性かつ血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群 (太線は 2 人の重複を示す)、(C) ASST 陰性かつ血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群 (太線は 3 人の重複を示す)、(D) ASST 陽性かつ血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群 (太線は 2 人の重複を示す)のシクロスポリンの治療後 UAS7 の推移を示した。シンボルは患者個人を表し、統計学的解析は Mann Whitney U test を行った。

図 9. ASST 陽性群における IgE カットオフ値でのシクロスポリンの治療効果の比較

ASST 陽性群のなかで血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群 (n=9)および血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群 (n=13)において、シクロスポリンの治療によって UAS7 $\leq$ 6 になった割合を示している。白は UAS $>$ 6 の群および黒は UAS $\leq$ 6 の群を示し、統計学的解析は Fisher exact test を行った。

図 10. IgE カットオフ値での ASST 陽性率の比較

血清 IgE 値 $\leq$ 88.5 の群 (n=13)および血清 IgE 値 $>$ 88.5 の群 (n=21)において、ASST 陽性の割合を示している。白は ASST 陰性および黒は ASST 陽性を示し、統計学的解析は Fisher exact test を行った。

## 引用文献

1. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, et al. The EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy* 2018;73:1393-414.
2. Powell RJ, Leech SC, Till S, et al. BSACI guideline for the management of chronic urticaria and angioedema. *Clin Exp Allergy* 2015;45:547-65.
3. Kaplan AP, Horáková Z, Katz SI. Assessment of tissue fluid histamine levels in patients with urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1978;61:350-4.
4. Metz M, Krull C, Hawro T, et al. Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *J Invest Dermatol* 2014;134:2833-6.
5. Toubi E, Kessel A, Avshovich N, et al. Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: a prospective study of 139 patients. *Allergy* 2004;59:869-73.
6. O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M, Greaves MW. The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br J Dermatol* 1997;136:197-201.
7. Murota H, Kitaba S, Tani M, et al. Impact of sedative and non-sedative antihistamines on the impaired productivity and quality of life in patients with pruritic skin diseases. *Allergol Int* 2010;59:345-54.
8. Parisi CA, Ritchie C, Petriz N, Morelo Torres C. Direct Medical Costs of Chronic Urticaria in a Private Health Organization of Buenos Aires, Argentina. *Value Health Reg Issues* 2016;11:57-9.
9. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:693-704.
10. Elias J, Boss E, Kaplan AP. Studies of the cellular infiltrate of chronic idiopathic urticaria: prominence of T-lymphocytes, monocytes, and mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78:914-8.
11. Nettis E, Dambra P, Loria MP, et al. Mast-cell phenotype in urticaria. *Allergy* 2001;56:915.
12. Kay AB, Ying S, Ardelean E, et al. Elevations in vascular markers and eosinophils in chronic spontaneous urticarial weals with low-level persistence in uninvolved skin. *Br J Dermatol* 2014;171:505-11.
13. Smith CH, Kepley C, Schwartz LB, Lee TH. Mast cell number and phenotype in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:360-4.
14. Bédard PM, Brunet C, Pelletier G, Hébert J. Increased compound 48/80 induced local histamine release from nonlesional skin of patients with chronic urticaria. *J Allergy*

Clin Immunol 1986;78:1121-5.

15. Ferrer M, Nuñez-Córdoba JM, Luquin E, et al. Serum total tryptase levels are increased in patients with active chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1760-6.

16. Hoffmann HJ. News in Cellular Allergology: A Review of the Human Mast Cell and Basophil Granulocyte Literature from January 2013 to May 2015. *Int Arch Allergy Immunol* 2015;168:253-62.

17. Eberle JU, Voehringer D. Role of basophils in protective immunity to parasitic infections. *Semin Immunopathol* 2016;38:605-13.

18. Schroeder JT. Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol* 2009;101:123-61.

19. Raap U, Gehring M, Kleiner S, et al. Human basophils are a source of - and are differentially activated by - IL-31. *Clin Exp Allergy* 2017;47:499-508.

20. Grattan CE, Walpole D, Francis DM, et al. Flow cytometric analysis of basophil numbers in chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1417-24.

21. Ito Y, Satoh T, Takayama K, Miyagishi C, Walls AF, Yokozeki H. Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. *Allergy* 2011;66:1107-13.

22. Grattan CE, Dawn G, Gibbs S, Francis DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy* 2003;33:337-41.

23. Luquin E, Kaplan AP, Ferrer M. Increased responsiveness of basophils of patients with chronic urticaria to sera but hypo-responsiveness to other stimuli. *Clin Exp Allergy* 2005;35:456-60.

24. Macglashan DW, Saini SS. Omalizumab increases the intrinsic sensitivity of human basophils to IgE-mediated stimulation. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:906-11.e1-4.

25. Saini SS, Omachi TA, Trzaskoma B, et al. Effect of Omalizumab on Blood Basophil Counts in Patients with Chronic Idiopathic/Spontaneous Urticaria. *J Invest Dermatol* 2017;137:958-61.

26. Kaplan AP, Giménez-Arnau AM, Saini SS. Mechanisms of action that contribute to efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Allergy* 2017;72:519-33.

27. Kulthanan K, Chaweekulrat P, Komoltri C, et al. Cyclosporine for Chronic Spontaneous Urticaria: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018;6:586-99.

28. Grattan CE, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CT, Bradfield JW. A serological mediator in chronic idiopathic urticaria--a clinical, immunological and histological

- evaluation. *Br J Dermatol* 1986;114:583-90.
29. Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 1993;328:1599-604.
  30. 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* 2017;139:1772-81.e1.
  31. Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcεpsilonRIα autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 1998;101:243-51.
  32. Kikuchi Y, Kaplan AP. Mechanisms of autoimmune activation of basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1056-62.
  33. Kolkhir P, Metz M, Altrichter S, Maurer M. Comorbidity of chronic spontaneous urticaria and autoimmune thyroid diseases: A systematic review. *Allergy* 2017;72:1440-60.
  34. Grattan CE, Boon AP, Eady RA, Winkelmann RK. The pathology of the autologous serum skin test response in chronic urticaria resembles IgE-mediated late-phase reactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;93:198-204.
  35. Fagiolo U, Kricek F, Ruf C, Peserico A, Amadori A, Cancian M. Effects of complement inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:567-72.
  36. Konstantinou GN, Asero R, Maurer M, Sabroe RA, Schmid-Grendelmeier P, Grattan CE. EAACI/GA(2)LEN task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria. *Allergy* 2009;64:1256-68.
  37. Sabroe RA, Seed PT, Francis DM, Barr RM, Black AK, Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-FcεpsilonRI or anti-IgE autoantibodies. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:443-50.
  38. Caproni M, Volpi W, Giomi B, et al. Chronic idiopathic and chronic autoimmune urticaria: clinical and immunopathological features of 68 subjects. *Acta Derm Venereol* 2004;84:288-90.
  39. Kulthanan K, Jiamton S, Gorvanich T, Pinkaew S. Autologous serum skin test in chronic idiopathic urticaria: prevalence, correlation and clinical implications. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2006;24:201-6.
  40. Staubach P, Eckhardt-Henn A, Dechene M, et al. Quality of life in patients with chronic urticaria is differentially impaired and determined by psychiatric comorbidity. *Br J Dermatol* 2006;154:294-8.

41. Gericke J, Metz M, Ohanyan T, et al. Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1059-61.e1.
42. Huilan Z, Bihua L, Runxiang L, Jiayan L, Luyang L, Zhenjie L. Features of Antihistamine-Resistant Chronic Urticaria and Chronic Urticaria During Exacerbation. *Indian J Dermatol* 2015;60:323.
43. Ertas R, Ozyurt K, Atasoy M, Hawro T, Maurer M. The clinical response to omalizumab in chronic spontaneous urticaria patients is linked to and predicted by IgE levels and their change. *Allergy* 2018;73:705-12.
44. Cugno M, Genovese G, Ferrucci S, Casazza G, Asero R, Marzano AV. IgE and D-dimer baseline levels are higher in responders than nonresponders to omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Br J Dermatol* 2018;179:776-7.
45. Deza G, Bertolín-Colilla M, Pujol RM, et al. Basophil FcεRI Expression in Chronic Spontaneous Urticaria: A Potential Immunological Predictor of Response to Omalizumab Therapy. *Acta Derm Venereol* 2017;97:698-704.
46. Palacios T, Stillman L, Borish L, Lawrence M. Lack of basophil CD203c-upregulating activity as an immunological marker to predict response to treatment with omalizumab in patients with symptomatic chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:529-30.
47. Staubach P, Onnen K, Vonend A, et al. Autologous whole blood injections to patients with chronic urticaria and a positive autologous serum skin test: a placebo-controlled trial. *Dermatology* 2006;212:150-9.
48. Atta AM, Rodrigues MZ, Sousa CP, Medeiros Júnior M, Sousa-Atta ML. Autoantibody production in chronic idiopathic urticaria is not associated with *Helicobacter pylori* infection. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:13-7.
49. Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V, Kaplan AP. Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 1988;90:213-7.
50. Lee MF, Lin TM, Liu SW, Chen YH. A rapid method of detecting autoantibody against FcεRIα for chronic spontaneous urticaria. *PLoS One* 2014;9:e109565.
51. Pachlopnik JM, Horn MP, Fux M, et al. Natural anti-FcεRIα autoantibodies may interfere with diagnostic tests for autoimmune urticaria. *J Autoimmun* 2004;22:43-51.
52. Mozena JD, Tiñana A, Negri J, Steinke JW, Borish L. Lack of a role for cross-reacting anti-thyroid antibodies in chronic idiopathic urticaria. *J Invest Dermatol* 2010;130:1860-5.

53. Takai T, Takahashi K, Akagawa-Chihara M, et al. Production of humanized antibody against human high-affinity IgE receptor in a serum-free culture of CHO cells, and purification of the Fab fragments. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:1082-9.
54. Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Tsuge I, Urisu A, Teshima R. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy* 2010;65:1266-73.
55. Weller K, Siebenhaar F, Hawro T, Altrichter S, Schoepke N, Maurer M. Clinical Measures of Chronic Urticaria. *Immunol Allergy Clin North Am* 2017;37:35-49.
56. Grattan CE, O'Donnell BF, Francis DM, et al. Randomized double-blind study of cyclosporin in chronic 'idiopathic' urticaria. *Br J Dermatol* 2000;143:365-72.
57. Grattan CE, Francis DM, Slater NG, Barlow RJ, Greaves MW. Plasmapheresis for severe, unremitting, chronic urticaria. *Lancet* 1992;339:1078-80.
58. O'Donnell BF, Barr RM, Black AK, et al. Intravenous immunoglobulin in autoimmune chronic urticaria. *Br J Dermatol* 1998;138:101-6.
59. Mitzel-Kaoukhov H, Staubach P, Müller-Brenne T. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment in therapy-resistant chronic spontaneous urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:253-8.
60. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000;47:119-25.
61. Cirillo R, Triggiani M, Siri L, et al. Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin. *J Immunol* 1990;144:3891-7.
62. Marsland AM, Soundararajan S, Joseph K, Kaplan AP. Effects of calcineurin inhibitors on an in vitro assay for chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2005;35:554-9.
63. Stellato C, de Paulis A, Ciccarelli A, et al. Anti-inflammatory effect of cyclosporin A on human skin mast cells. *J Invest Dermatol* 1992;98:800-4.
64. Seybold VS, Coicou LG, Groth RD, Mermelstein PG. Substance P initiates NFAT-dependent gene expression in spinal neurons. *J Neurochem* 2006;97:397-407.
65. Simons FE, Simons KJ, Frith EM. The pharmacokinetics and antihistaminic of the H1 receptor antagonist hydroxyzine. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:69-75.
66. Rao KS, Menon PK, Hilman BC, Sebastian CS, Bairnsfather L. Duration of the suppressive effect of tricyclic antidepressants on histamine-induced wheal-and-flare reactions in human skin. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:752-7.
67. Simons FE, Silver NA, Gu X, Simons KJ. Clinical pharmacology of H1-antihistamines in the skin. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:777-83.
68. Okayama Y, Benyon RC, Lowman MA, Church MK. In vitro effects of H1-

antihistamines on histamine and PGD<sub>2</sub> release from mast cells of human lung, tonsil, and skin. *Allergy* 1994;49:246-53.

69. Fahmy RH, Badr-Eldin SM. Novel delivery approach for ketotifen fumarate: dissofilms formulation using 3<sup>2</sup> experimental design: in vitro/in vivo evaluation. *Pharm Dev Technol* 2014;19:521-30.

70. Nakazawa T, Umegae Y. Effect of histamine antagonists and agonists on IgE production in mice. *Ann Allergy* 1992;68:319-23.

71. Cugno M, Genovese G, Ferrucci S, Casazza G, Asero R, Marzano AV. IgE and D-dimer baseline levels are higher in responders than nonresponders to omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Br J Dermatol* 2018.

72. Chan MA, Gigliotti NM, Dotson AL, Rosenwasser LJ. Omalizumab may decrease IgE synthesis by targeting membrane IgE<sup>+</sup> human B cells. *Clin Transl Allergy* 2013;3:29.

73. Hide M, Igarashi A, Yagami A, et al. Efficacy and safety of omalizumab for the treatment of refractory chronic spontaneous urticaria in Japanese patients: Subgroup analysis of the phase 3 POLARIS study. *Allergol Int* 2018;67:243-52.

74. Schmetzer O, Lakin E, Topal FA, et al. IL-24 is a common and specific autoantigen of IgE in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:876-82.

75. Ferrer M, Boccon-Gibod I, Gonçalo M, et al. Expert opinion: defining response to omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. *Eur J Dermatol* 2017;27:455-63.

なお、本研究は *Allergology International* に掲載されている。

# 研究業績目録

遠藤嵩大

I 発表	①一般発表	13
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	なし)
	②症例報告	4 (単 4 /共 0 )
	③総説	なし
III 著書		なし

## I 発表

### ①一般発表

1. 遠藤嵩大, 篠島由一, 照井正, 石井文人, 橋本隆 : 表皮内好中球皮膚症型 IgA 天疱瘡の 1 例, 第 77 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 東京, 2014 年 2 月
2. 遠藤嵩大, 尾崎由美, 葉山惟大, 天貝純郁, 鈴木啓之, 照井正, 片野晴隆: 粉瘤と鑑別を要した耳垂メルケル細胞癌の 1 例, 第 65 回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 大阪, 2014 年 10 月
3. 遠藤嵩大, 葉山惟大, 天貝純郁, 藤田英樹, 照井正: 乳癌術後の放射線療法により水疱性類天疱瘡をきたした 1 例, 第 78 回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2015 年 2 月
4. 遠藤嵩大, 葉山惟大, 藤田英樹, 照井正: 尋常性乾癬が先行した皮膚筋炎の 1 例, 第 30 回日本乾癬学会学術大会 名古屋, 2015 年 9 月
5. 遠藤嵩大, 黒羽根係一, 羽尾貴子, 鎌田英明: 分層植皮による下腿潰瘍治療に局所陰圧閉鎖療法 PICO®を応用した 1 例, 第 867 回日本皮膚科学会合同臨床地方会, 東京, 2016 年 7 月
6. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者と健常人(NC)の好塩基球における IgE 依存性刺激による反応性の比較, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態解明と新規治療法の開発」平成 28 年度報告会, 東京, 2017 年 2 月
7. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹患者と健常人の好塩基球における抗 FcεRIα 鎖抗体(CRA1)と抗 IgE 抗体刺激による反応性

- の比較, 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017 年 6 月
8. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 葉山惟大, 坂本朋美、鐘ヶ江加寿子, 照井正, 岡山吉道: CSU 患者に対するオマリズマブの治療効果と CSU 患者の好塩基球動態の関係, 平成 29 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017 年 11 月
  9. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅 智靖, 岡山吉道, 照井正: Analysis of the serum factor responsible for suppressing basophil FcεRI-mediated activation in patients with chronic spontaneous urticaria, 日本研究皮膚科学会第 42 回年次学術大会, 高知, 2017 年 12 月
  10. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 葉山惟大, 坂本朋美、鐘ヶ江加寿子, 照井正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する反応性の差異とオマリズマブに対する治療効果について, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態解明と新規治療法の開発」平成 29 年度報告会, 東京, 2018 年 2 月
  11. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 葉山惟大, 西盛信幸, 伊崎聡志, 鐘ヶ江加寿子, 坂本朋美, 照井正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における IgE 依存性の反応性とオマリズマブの治療効果, 第 67 回日本アレルギー学会学術大会, 千葉, 2018 年 6 月
  12. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 葉山惟大, 西盛信幸, 伊崎聡志, 鐘ヶ江加寿子, 坂本朋美, 照井正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の抗 FcεRIα 鎖自己抗体による FcεRI 架橋能とオマリズマブの治療効果, 第 67 回日本アレルギー学会学術大会, 千葉, 2018 年 6 月
  13. 遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊東真奈, 葉山惟大, 西盛信幸, 伊崎聡志, 鐘ヶ江

加寿子, 坂本朋美, 照井正, 岡山吉道 : 慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する刺激に反応する(R)群と反応しない群(NR)群のオマリズマブの治療効果, アレルギー・好酸球研究会 2018, 東京, 2018年9月

②特別発表

なし

II 論文

①原著論文

1. なし

②症例報告

1. 遠藤嵩大, 篠島由一, 照井正, 石井文人, 橋本隆 : IgA 天疱瘡 (intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis-type) の 1 例, 臨床皮膚科, 69: 119-202, 2015.
2. 遠藤嵩大, 尾崎由美, 葉山惟大, 天貝純郁, 鈴木啓之, 照井正, 片野晴隆 : 粉瘤との鑑別を要した耳垂の Merkel 細胞ポリオーマウイルス陽性 Merkel 細胞癌の 1 例, 臨床皮膚科, 70: 427-430, 2016.
3. 遠藤嵩大, 黒羽根系一, 羽尾貴子, 鎌田英明 : 網状分層植皮による下腿潰瘍治療に局所陰圧閉鎖療法 PICO を応用した 1 例, 臨床皮膚科 71: 177-180, 2017.
4. 遠藤嵩大, 車谷紋乃, 葉山惟大, 照井正 : アスファルト除去にワセリンを用いた熱傷の 1 例, 皮膚科の臨床, 60:1156-1157, 2018.

③総説

なし

Ⅲ 著書

なし