

論 文 要 旨

Basophil Activation Test based on CD203c Expression in the Diagnosis of Fish Allergy

【 魚アレルギーの診断における CD203c 発現測定による好塩基球活性化試験 】

【序論及び目的】

魚アレルギーの原因となる蛋白質は多くの魚種間で交差抗原性を示し魚アレルギー患者は複数の魚種の摂取でアレルギー症状を呈することがあるため、全ての魚種の除去を指示されることがあり栄養や社会生活において不利益が大きい。食物経口負荷試験(OFC)では摂取可能な魚種を見つけることができるが、複数回の OFC には多くの時間も費やすことが障害になる。特異的 IgE 抗体価(sIgE)測定は魚アレルギーにおける診断予測能は低く商業ベースで検査可能な魚種も限られている。好塩基球活性化試験の診断予測の有用性が報告されているが、魚アレルギーについての報告はまだない。本研究の目的は魚アレルギーの診断における好塩基球活性化試験の有用性を評価することである。

【材料及び方法】

＜研究デザインと対象者＞

国立病院機構三重病院で 2010 年から 2018 年の間に魚アレルギーを疑われて各魚種に対する好塩基球活性化試験を行われた患者を対象として、診療録を用いて後方視的に分析した。魚アレルギーの診断は OFC で陽性もしくは院外で各魚種摂取後に明らかな即時型アレルギー症状が出現した症例とし、魚アレルギーの否定は OFC での陰性もしくは症状なく複数回の摂取したことの確認で行った。

＜好塩基球活性化試験に用いる魚肉抽出液の作成＞

新鮮な魚肉を加熱し粉碎後に濾過遠心分離を行い、抽出液を採取した。抽出液を凍結乾燥して保存し、溶解後に蛋白濃度を調整して好塩基球活性化試験の反応液とした。

抽出液作成魚種：サケ、サバ、マグロ、タイ、ブリ、ヒラメ、カツオ、アカウオ、サンマ、アジ、サワラ、カマス、イワシ、ホッケ、シシャモ

＜好塩基球活性化試験および特異的 IgE 抗体価測定＞

Beckman Coulter 社の Allergenicity Kit を用いてフローサイトメーターで好塩基球の CD203c 発現を定量化した。魚抽出液反応後の CD203c 発現増強細胞の割合と陽性コントロールでの CD203c 発現増強細胞の割合の比を BAT score として算出した。陽性コントロールでの CD203c 発現増強細胞が 10%未満の患者は low responder として除外した。商業ベースで検査可能なマグロ、サケ、サバ、アジの sIgE とアレルギーコンポーネントが標準化されているタラ(Gad c 1)とコイ(Cyp c 1)の sIgE も測定した。

＜統計学的検討＞カテゴリー変数の比較はカイ二乗検定、二群間の比較は Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。BAT score と sIgE の診断予測能を確認するために ROC 解析の AUC を算出しカットオフ値を求め特異度、陽性的中率、陰性的中率および正診率を算出した。

＜倫理面の対応＞

本研究は国立病院機構三重病院倫理審査委員会で承認を得た。後方視的研究であるためオプトアウトの機会を設けた。

【結果】

51人の患者ののべ184検体での好塩基球活性化試験とのべ86検体でのsIgE検査が行われ、のべ90検体(好塩基球活性化試験を行った検体の48.9%)で魚アレルギーが診断された。検体数の多い5魚種(サケ、サバ、マグロ、タイ、ブリ)の結果を用いてBAT scoreの診断予測能を評価した。5魚種全てで当該魚種に対するアレルギーと診断された患者のBAT scoreは非アレルギー患者のBAT scoreよりも有意差を持って高値であり、ROC曲線のAUCは0.72から0.88だった。カットオフ値での特異度は0.82-0.91、正診率は0.74から0.91だった。単独での症例数が少ない魚種では、BAT scoreのカットオフ値を最初に検討した5魚種の結果に近い0.3とした。5症例以上の魚種ではカットオフ値:0.3での正診率は0.6以上あり、5症例未満の魚種では正診率は0.33から1.0だった。

次にBAT scoreとsIgEの診断予測能を比較した。sIgEはサバでは有意差があったがサケ・マグロでは有意差がなく、BAT scoreのROC曲線のAUCはサケ0.8、サバ0.72、マグロ0.84でありsIgEのROC曲線のAUCはサケ0.7、サバ0.75、マグロ0.51だった。Gad c 1とCyp c 1のsIgEは魚アレルギー患者で非アレルギー患者より有意差を持って高値だった。ROC曲線のAUCはBAT score:0.79、Gad c 1:0.70、Cyp c 1:0.70であり統計学的な有意差はなかったがBAT scoreが最も高値だった。アニサキスアレルギーは魚アレルギーと誤診されることがあり、食物経口負荷試験での確認が困難であるため、アニサキスのsIgEの有無を確認した。アニサキスに感作されていた群と感作のない群において、BAT score、Gad c 1とCyp c 1のsIgE抗体価および魚アレルギー患者数に有意差はなかった。

【結論及び考察】

<結論>自施設で精製した魚肉抽出液を使用してCD203c発現を観察した好塩基球活性化試験は、良好な魚アレルギーの診断予測能を有した。

<考察>好塩基球活性化試験は全血を使用した検査であり血清中の抗原特異的IgG4抗体などのブロック抗体の影響も含めた好塩基球の活性化を観察できる点がsIgEのみを調べる検査と異なり、生体内でのアレルギー反応をより正確に反映している可能性がある。現在臨床で利用可能なsIgEと同等の診断予測能だが、検査が必要な魚肉の抽出液を準備すればどのような魚種でも検査が可能であることが好塩基球活性化試験の優位性と考えられた。

魚のアレルゲンコンポーネントとしてパルブアルブミン、エノラーゼ、アルドラーゼ、コラーゲンの4種類があり、主要アレルゲンであるパルブアルブミンは含有量と症状が関連することも報告されている。複数のコンポーネントが抽出液に含まれること、コンポーネントの割合が実際の魚肉の含有量と一致していることが好塩基球活性化試験の特異度の高さに寄与したと考えられた。

本研究にはlimitationがある。①アニサキスアレルギーが結果に影響を与えている可能性がある。患者のアニサキスのsIgEを確認し、感作されている患者と感作されていない患者で各測定値や魚アレルギーの診断に差がないことも確認した。②全ての患者で食物経口負荷試験が行えていない。③リポポリサッカライドが好塩基球の反応に影響を与えている可能性がある。これまでの報告でリポポリサッカライドは1000EU/mLなどの高濃度で抗原による活性化を増強することが分かっている。大腸菌製剤中のリポポリサッカライドの濃度は900-1700EU/mLと報告されており、本研究では抽出液を10倍希釈して使用しているため大腸菌の抽出液を使用しても90-170EU/mLの濃度にしかならない。抽出液作成に新鮮な魚肉を使用し魚肉内の細菌の増殖は防いでいる可能性が高く、濃縮された細菌製剤よりも魚肉内の細菌量は少ないと考えた。④濃度別の検討が出来ていない。複数の濃度での確認を行いEC50などの数値を算出した方がよいが、時間と費用の問題で2つの濃度のみで検討した。⑤サンプルサイズが小さい。⑥診療録を用いた後方視的な研究であり、診療録記載医師の臨床的な正診率は確認できていない。

