

食物アレルギーの診断におけるヒスタミン遊離試験の有用性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-01-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大谷, 智子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10470/00031761

食物アレルギーの診断におけるヒスタミン遊離試験の有用性

東京女子医科大学東医療センター小児科

オオタニ トモコ
大谷 智子

(受理 平成29年2月17日)

Utility of the Peripheral Blood Basophil Histamine Release Test in the Diagnosis of Food Allergy in Children

Tomoko OTANI

Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

The Basophil Histamine Release Test (HRT) was developed 20 years ago. Following technological advances, Allerport HRT kit (Shionogi & Co. Ltd. Osaka, Japan), an automated HRT, was subsequently released. Despite an increased number of detectable antigens and simplicity of use, Allerport HRT kit has not been widely utilized in clinical settings. Possible reasons for this include the existence of low-responders, observed in approximately 20% of cases, and the difficulty in interpreting test results representing a histamine-release curve. Effects of antihistamine medication and the amount of time required for assessment are believed to partially account for the low-response rate. A reduction in the low-response rate may further increase the sensitivity of HRT. Furthermore, some reports suggest that HRT can be utilized in assessing the timing of oral food challenge (OFC) tests through a chronological review of the histamine release curves, determining challenge doses for the OFC by looking at antigen release rates, and in assessment of severe cases where trace amounts of antigens trigger high histamine release.

Key Words: histamine release test, low responder, food allergy, oral food challenge test

はじめに

食物アレルギー患者数は、先進国において増加していることが報告されている¹⁾。日本での有病率も高く、特に小児では保育園や学校等での管理表提出も徹底され、アドレナリン自己注射薬（エピペン[®]）を所持している小児も少なくない。近年、食物アレルギーに関する考え方や治療方法も変化しつつあり、2016年10月に食物アレルギー診療ガイドラインが、2012年から4年ぶりに改訂発行された²⁾。食物経口負荷試験が診断の gold standard であることは従来通りであるが、補助診断としてアレルギーコンポーネント特異的 IgE 抗体測定が新規の診断として紹介されている。また、好塩基球を用いた検査としてヒスタミン遊離試験（Histamine release test :

以下 HRT）と好塩基球活性化試験（basophil activation test : BAT）が呈示されている。保険収載されている HRT は、従来から施行されている検査法であるが、認知度が低く臨床の現場では汎用されていない。著者の永年にわたる臨床経験より、生体反応に近い検査で特異度が高いとされている HRT の食物除去解除の指標としての活用法を報告する。

歴史と原理

生体内の組織に分布する肥満細胞や末梢血液中に存在する好塩基球から I 型アレルギー反応により脱顆粒が生じ、他の化学伝達物質とともにヒスタミンが放出され様々な生理活性により多彩な症状を引き起こす。末梢血好塩基球には肥満細胞と同様に IgE 抗体が結合していることから、この好塩基球を用い

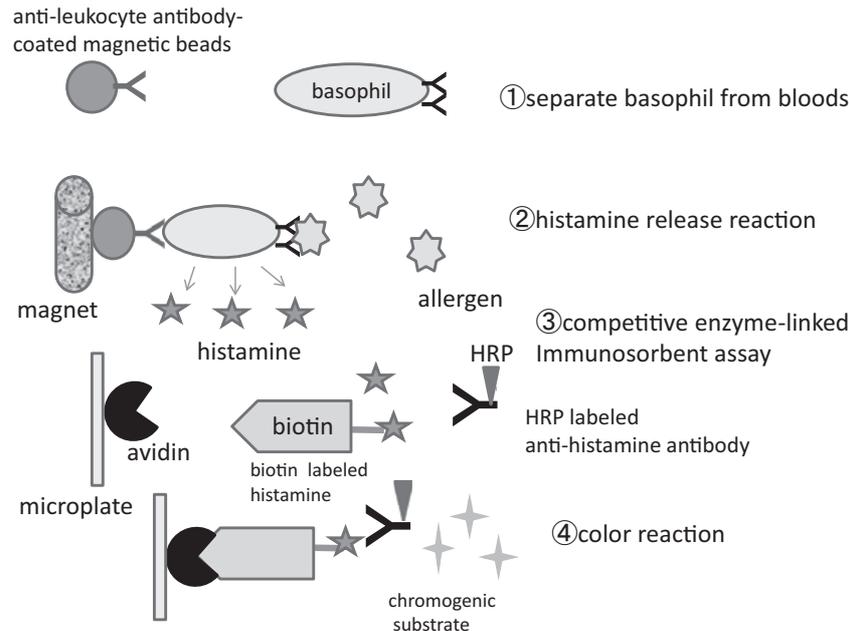


Fig. 1 Measurement principle of HRT

たHRTが、I型アレルギーの原因検索方法として有用であることが報告されていた³⁾。しかしながら、好塩基球を分離することは難しく、大量の血液と時間を要することから実験室内での開発研究に留まっていた⁴⁾⁵⁾。その後、Stahlら⁶⁾によりグラスファイバーにヒスタミンが吸着する原理を応用した簡易キットが開発され、HRTの日常診療応用として「ルシカHRT」として1996年に発売された⁷⁾が2002年に製造中止になっている。さらに、Nishiら⁸⁾は、抗好塩基球抗体を結合させた磁気粒子を用いて全血中の好塩基球を分離する技術を開発し、酵素免疫法により測定する「HRTシオノギ」が2000年に販売された⁹⁾。しかしながら、用手法で操作が煩雑なことから、検索アレルゲンが食物では卵白、牛乳、小麦、大豆、米の5種のセットに限られていたため、これを改良した全自動で測定可能な「アラポートHRT」が2011年に販売され現在に至っている¹⁰⁾。食物抗原も20種類に増え、組み合わせで検査が可能となっている。

測定原理は、①全血検体に好塩基球に特異的なモノクローナル抗白血球抗体磁性粒子を加え、好塩基球と結合させた後に磁石を用いて分離する。②希釈濃度を変えた5種類のアレルゲン(A~Eの順に濃度が低下)を加えてヒスタミンを遊離させる。また、コントロール液を加えてヒスタミン遊離反応を引き起こす。③抗ヒスタミン抗体には酵素標識としてホースラディッシュペロキシダーゼ(horseradish peroxidase: HRP)を結合させる。遊離したヒスタミ

ンとビオチン結合ヒスタミンを標識抗体に対し競合的に反応させる。④ビオチン結合タンパク質であるアビジンとビオチンが結合することを利用した酵素免疫測定法により測定する。生成したビオチン結合ヒスタミン・標識抗体複合体とマイクロプレートに固相されたアビジンを結合させる。呈色液を加え酵素反応を行い吸光度を測定する(Fig.1)。

「ルシカHRT」は、全血中で反応させるため多くの血液を要したのに対し、「シオノギHRT」「アラポートHRT」では、少量の血液で反応可能なキットを開発した。このことは、血液から好塩基球を分離した後にアレルゲンを作用させることから血清非存在下でヒスタミン遊離を検討していることになり、血清の影響を受けていないことを認識しなければならない。

測定結果と判定

測定結果はヒスタミンの遊離率で表され、末梢血中好塩基球絶対数の影響は受けないのが特徴である。遊離率は、次の計算式で算出される。

特異的ヒスタミン遊離率% =

$$\frac{\text{特異的ヒスタミン遊離率} - \text{SHR}}{\text{総ヒスタミン含有量} : \text{T} - \text{SHR}} \times 100$$

総ヒスタミン含有量(総ヒスタミン遊離量:T)は、分離した好塩基球をジキトニンで溶解し、溶出したヒスタミン濃度(nmol/L)を測定し、自然ヒスタミン遊離量(spontaneous histamine release:

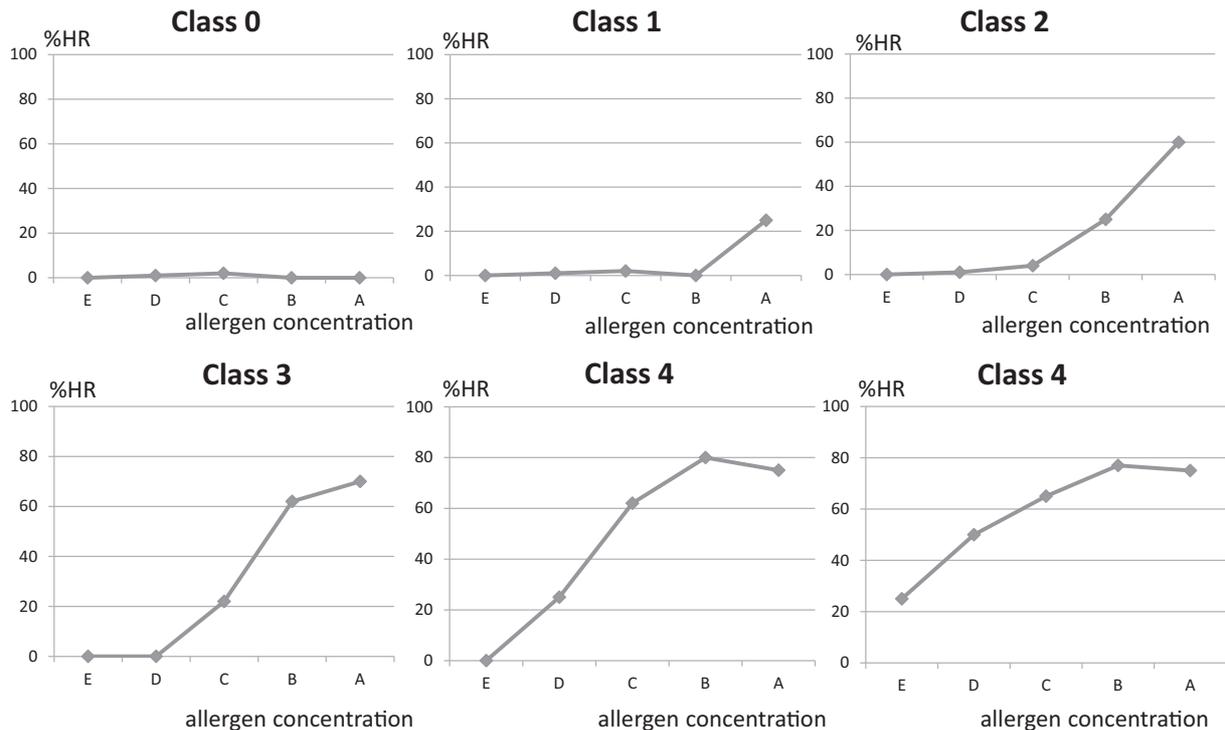


Fig. 2 Class determination of the measurement results
%HR, % histamine release.

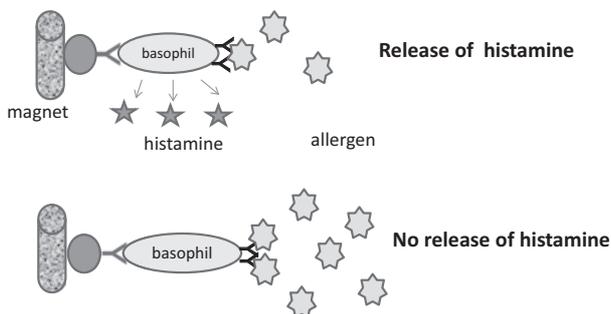


Fig. 3 Difference in reactivity depending on allergen concentration in HRT
Histamine release does not occur in excess of allergen.

SHR：非特異的ヒスタミン遊離量）は、無刺激で緩衝液中に存在するヒスタミン濃度（nmol/L）を測定した値である。

陽性コントロールは、抗ヒトIgE抗体と反応させ、その10倍希釈濃度勾配（E～A、0.5～5,000 ng/mL）に応じたヒスタミン遊離量を測定し遊離率を求める。

特異的ヒスタミン遊離量は、各抗原における5段階（E～A）の刺激濃度で反応させてヒスタミン遊離量を測定する。抗原濃度および希釈濃度は、抗原別に異なっている。

検査結果は、E濃度からA濃度までのヒスタミン遊離率を結んだヒスタミン遊離曲線で表現される。カットオフ値は、一部の抗原を除いてはヒスタミン遊離率20%を超えるものを有意なヒスタミン遊離と判断し、A濃度でもヒスタミン遊離が認められないクラス0（陰性）からDまたはE濃度で遊離が認められる場合はクラス4と表現される（Fig. 2）。

また、ヒスタミン遊離曲線の陽性例では山型もしくは台形として描かれることが多い。この理由として、アレルゲン濃度が効率よく特異IgE抗体と架橋できるアレルゲン濃度で最大の遊離率となること、また濃度が高くなり抗原過多の状態では、架橋が起こらないことから反応が抑制され、ヒスタミン遊離量が減少することによって考えられる（Fig. 3）。

ヒスタミン遊離率は、前述の計算式で算出されることから、分母を構成するTとSHRの測定値は、重要な因子と考えられる。中川ら⁹⁾は、「HRT シオノギ」で、内科、小児科領域のアレルギー疾患患者214例の総ヒスタミン含有量を測定した結果、ヒト末梢血好塩基球中のTは、最低190 nmol/L、最高2,860 nmol/Lの範囲を持つ500～900 nmol/Lを頂点とする正規分布を示したと報告している。佐藤ら¹¹⁾、伊藤ら¹²⁾の鶏卵アレルギーにおける検討では、Tは中央値497.4（73.9～1,358.4）nmol/Lで、症例により大き

く異なっていた。T は広い濃度範囲で分布し、負荷陽性群と陰性群の間で有意差を認めなかったのに対し、SHR/T の検討では、負荷陽性群が陰性群に比べ有意に高値だったことを報告している¹²⁾。また、複数のアレルギーを持つ症例の SHR/T は、単独アレルギー陽性群又は陰性群で他のアレルギーを持たない群より有意に高値を示していたことから、SHR/T が高値なことは、SHR の量が多すぎるか、T が少ないことを意味している。SHR の多さは、好塩基球が既に生体内で何らかの刺激を受けていることが考えられ、特異的な抗原刺激に対して過敏性が亢進していると考えられる。

以上のことから、結果を解釈する際に、個々の検体中に十分量の好塩基球の存在を反映する T が 200 nmol/L 以上であることと、SHR が多すぎるかどうかを確かめる必要がある。

low-responder の存在

ヒスタミン遊離試験の欠点として、約 20 % に低反応を示す low-responder が存在することが挙げられる。low-responder とは、陽性コントロールのヒスタミン遊離率が A 濃度でも 20 % を超えない検体とされている。伊藤¹³⁾は、low-responder 化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と抗ヒスタミン薬などの薬物の影響を挙げている。我々は low-responder の経時的な検討を行った結果、低年齢児に多いことと、寛解するに伴い low-responder 化していくことを報告した¹⁴⁾。伊藤ら¹²⁾は、low-responder をサブグループに分け、濃度依存的なヒスタミン遊離曲線において、B または A 濃度で弱いながらもヒスタミン遊離を示している最大遊離率が 10 % を超える群を LOW responder、それ以外の遊離できない群を NON responder と区別して定義し、LOW responder は低いながらも有意なヒスタミン遊離反応を捉えているが、NON responder は意味のあるヒスタミン遊離反応を検出できない群であると呈示した。いずれの報告においても low-responder の免疫学的な機序は明らかにされていないが、結果として low-responder において表示される陰性を真の陰性と誤解しない解釈が重要である。

測定意義と解釈

2011 年より、ヒスタミン遊離試験として利用できる方法は「アラポート HRT」のみであるが、「HRT シオノギ」の原理をそのまま応用し、自動分析化した方法である。このことは、2 つのデータには相関が

あることを伊藤ら¹⁰⁾が報告している。一方、今までに臨床で汎用されている IgE 抗体に関する検査は、放射線アレルギー吸着試験 (radioallergosorbent test : RAST) であったが、現在の測定方法では酵素または蛍光標識が用いられている蛍光酵素免疫法 (fluorescence enzyme immunoassay : FEIA) である。これらの特異的 IgE 抗体を検出する方法は、単に感作を示しているものであり、必ずしも生体内のアレルギー反応を反映させていないことは周知のことである。これに対し、HRT は抗原負荷により IgE 抗体を架橋させ遊離したヒスタミンを測定するため、同じ *in vitro* の検査でも、より生体内の反応に近い特徴を持っており、経口食物負荷試験を実施する前の補助診断として有用であると考えられる。伊藤ら¹⁰⁾は、HRT と特異的 IgE 抗体検査の臨床性能試験を 25 の抗原において比較した結果、HRT の感度は 52.6~97.6 % (平均 78.0 %)、特異度は 56.6~95.8 % (平均 87.3 %)、診断効率は 68.8~95.4 % (平均 87.6 %) であり、特異的 IgE 抗体検査の感度は 0~100 % (平均 84.0 %)、特異度は 40.1~94.4 % (平均 68.3 %)、診断効率は 50.9~91.8 % (平均 74.9 %) であったと報告している。このことから、HRT は汎用されている特異的 IgE 抗体検査と比較して感度ではやや低い、特異度では優れていることが判る。したがって、低年齢時の食物アレルギーの診断においては、low-responder の多い HRT より、感度が高くコンポーネント診断も可能な特異的 IgE 抗体検査が有用であり、特異度の高い HRT は、年長児での耐性獲得の判断として特異的 IgE 抗体検査の補助的な診断方法として位置づけられる。佐藤ら¹¹⁾は、鶏卵アレルギーにおいて HRT の最大ヒスタミン遊離率の抗原濃度ではなく閾値である卵白抗原濃度 6 ng/ml (D 濃度に相当) でのヒスタミン遊離率が症状誘発予測の良い指標になることを示している。抗原により特定の刺激濃度におけるヒスタミン遊離率が診断指標になり得ることが示唆され、新しい解釈として発展することが期待される。福富ら¹⁵⁾は、卵白アレルギーの除去解除年齢を特異的 IgE 抗体検査 (FEIA) と HRT を用い比較検討した結果、HRT の特異度が高いことから、HRT は除去解除をする前の実施すべき検査法として有用であると報告している。以上のことから、HRT は保険診療において行える生体内の反応に最も近いアレルギー抗原検索検査であり、特異度が高く、除去解除のための経口食物負荷試験を安全に行うために事前に行われるべき検

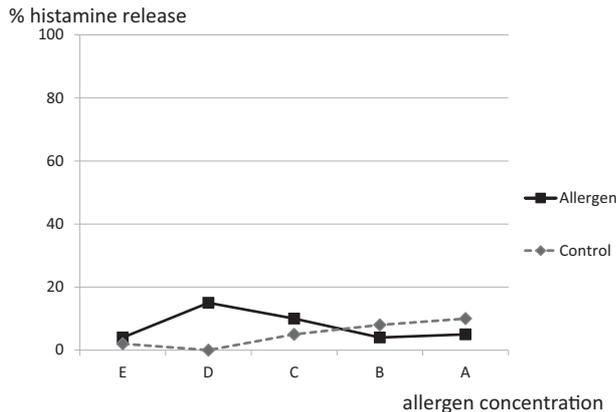


Fig. 4 Positive case of open food challenge test in low-responder

査であることが示唆される。

「アラポート HRT」に変更され、自動化が進み検査項目数の増加や検査日数の短縮が行われたにも関わらず、十分に普及されなかった原因として low-responder の存在が大きいと思われる。しかしながら、採血時期と抗ヒスタミン薬の影響を考慮すれば、HRT の low-responder 率はさらに低くなり、特異的 IgE 抗体を検出する方法より感度が高くなることが期待され、鋭敏にアナフィラキシーを予測できる検査と認識される可能性が高い。

また、これらの症例においても遊離曲線の描出結果により解釈が異なることも、一般臨床医に理解されなかった一因ではないかと考えられる。low-responder 症例において経口卵白負荷試験が陽性であった症例の HRT 結果を、Fig. 4 に示す。描いてあるヒスタミン遊離曲線は、コントロールの遊離率が 20 % 以下の low-responder であってもアレルゲン濃度の C, D では卵白によるヒスタミン遊離率がコントロールを上回っている特徴があった。この場合は、検査結果として陰性と示されるが、ヒスタミン遊離曲線を注視し負荷試験陽性になり得ることを念頭に解釈をする必要がある。

また、我々は各濃度におけるコントロールの遊離率と卵白、牛乳、小麦抗原の遊離率を比較し、高い場合を陽性、低い場合を陰性として経口食物負荷試験の結果と比較検討したところ、卵白抗原においては C, D 濃度で有意に高い一致率が認められた¹⁶⁾。症例数が少ないことから、他の抗原では有意な結果を見いだせなかったが、今後、さらに検討していきたいと考えている。

臨床応用例

1. 経時的検討例

特異的 IgE 抗体検査やプリックテストでは陽性を示し、経時的に経過を観察している症例において Fig. 5 のように、HRT 検査結果が陰性化してくる症例も多く認められる。特異的 IgE 抗体検査の probability も高値の場合においては、食物経口負荷試験の時期を判断する指標になると考えられる。

2. 食物経口負荷試験の負荷量の決定

抗原濃度別にヒスタミン遊離率が検出される HRT では、Fig. 6 に表される症例 I の場合には、濃度 D から遊離率が上昇することより、負荷総量を軽減し微量から開始する必要がある。これに対し症例 II では、濃度 B から遊離率が高値を示しており、比較的安全に負荷試験を行えることが示唆される。

3. 重症例の予測

E 濃度で既にヒスタミン遊離率が 20 % を超えている Fig. 6 の症例 III では、ごく微量の抗原量で誘発される可能性が考えられ、食物経口負荷試験を施行する際には細心の注意が必要であり、また、微量混入等の症状誘発も考慮しなければならない。

今後の課題

HRT 検査が普及しなかった要因としては、検査対象の約 20 % に low-responder が存在し、特に検査需要の高い低年齢児に多いことが挙げられる。また、HRT は好塩基球からヒスタミンが遊離される繊細な検査であることから、low-responder 化を防ぐためにも、被験者は抗アレルギー薬や抗ヒスタミン薬を 72 時間以上休薬しなくてはならないことが挙げられる。したがって、内服薬を中止できないような症例では施行することが難しい。さらに、検体の保存条件も影響を与えるとされており、採血後 24 時間以内には測定を行うことが望ましい。しかし、HRT は委託検査で行われている施設が多く、翌日が日曜日、祭日の場合は、2 日後の測定になり正確な結果を得られにくい。また、抗原刺激の違いや陽性基準についての評価も今後の検討が必要である。このような課題を解決するには、さらなる開発が必要とされるが、今後の「アラポート HRT」の販売自体も懸念される状況下では、難しい課題と考えられる。

おわりに

食物経口負荷試験は、食物アレルギーにおける最も重要とされる検査であるが、アナフィラキシーの危険を伴うこともある。負荷試験における重篤な症状の発現を避けるためにも負荷試験施行時期および

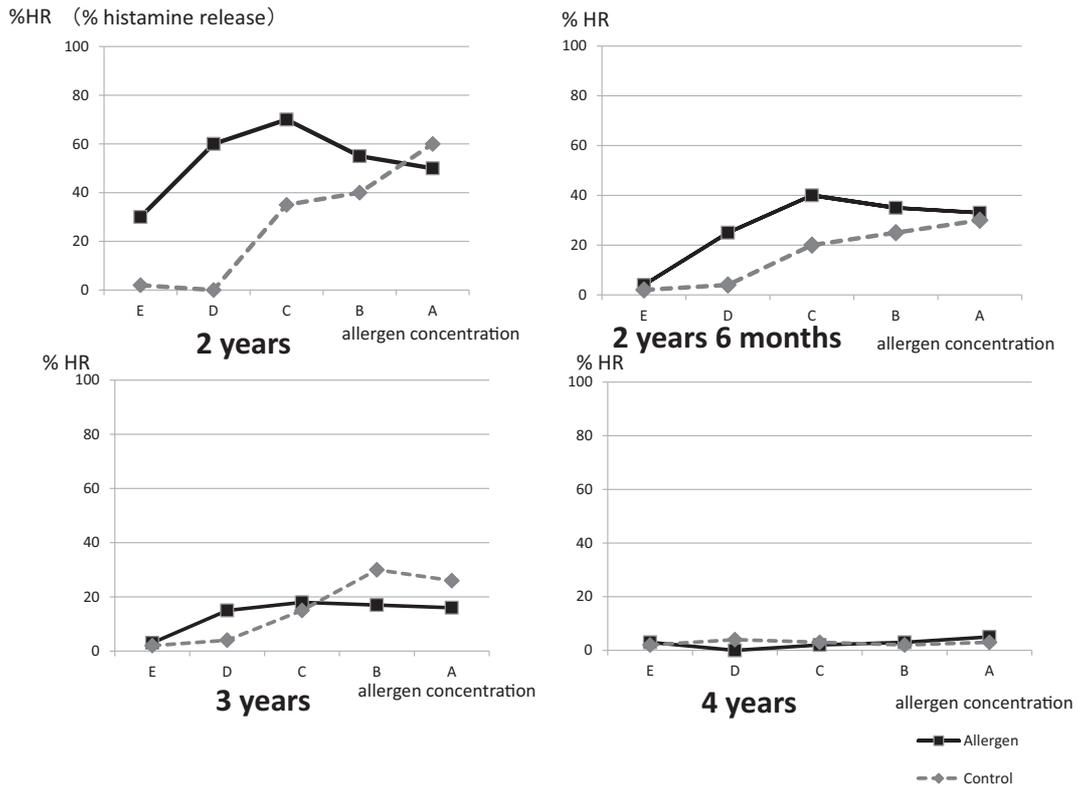


Fig. 5 Cases studied over time
Case of a low-responder with remission

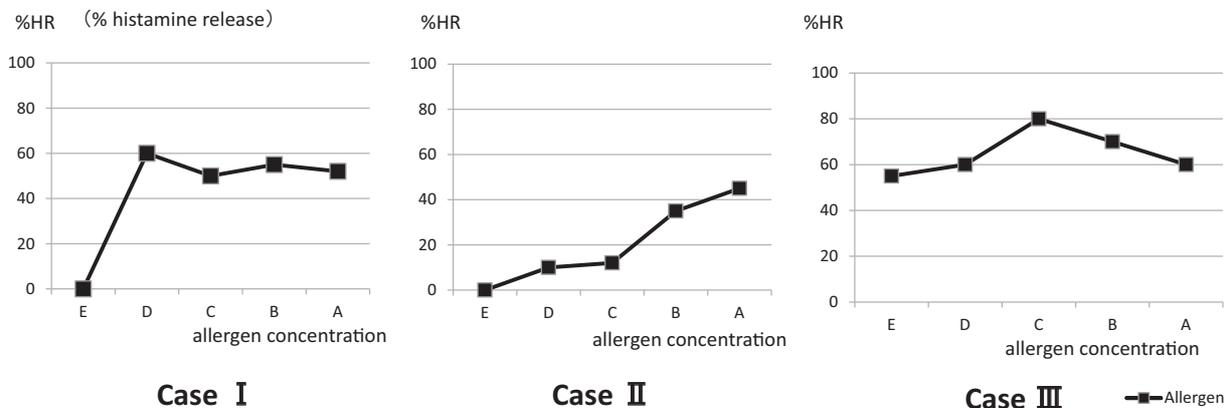


Fig. 6 Effective cases using HRT
Case I: case with reaction at low concentration.
Case II: case with reaction at high concentration.
Case III: case with reaction at trace amount.

負荷総量を予見するために、HRT は意義のある検査と考えられる。今後、有用性が理解され、臨床の場において再び活用されることが望まれる。

開示すべき利益相反状態はない。

文 献

1) Prescott SL, Pawankar R, Allen KT et al: A

global survey of changing patterns of food allergy burden in children. World Allergy Organ J 6: 21, 2013

2) 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会：「食物アレルギー診療ガイドライン2016」，協和企画，東京（2016）

3) Lichtenstein LM, Osler AG: Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena: IX. Histamine release from human leukocytes by ragweed

- pollen antigen. *J Exp Med* **120**: 507-530, 1964
- 4) **Clinton PM, Murdoch RD, Kemeny DM**: Development of a micro assay for histamine release. *Clin Allergy* **17**: 181-189, 1987
 - 5) **Sainte-Laudy J, Sabbash A, Vallon C et al**: Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm Res* **47**: 401-408, 1998
 - 6) **Stahl Skov P, Norn S, Weeke B**: A new method for detecting histamine release. *Agents Actions* **14**: 414-416, 1984
 - 7) **大山邦夫, 倉持健太郎, 芹沢 領ほか**: アレルギー診断薬 HRT の基礎的検討. *医と薬学* **31**: 113-125, 1994
 - 8) **Nishi H, Nishimura S, Higashiura M et al**: A new method for histamine release from purified peripheral blood basophils using monoclonal antibody-coated magnetic beads. *J Immunol Methods* **240**: 39-46, 2000
 - 9) **中川武正, 駒瀬裕子, 森 直行ほか**: HRT シオノギ (ヒスタミン遊離試験) の臨床的有用性の検討. *医と薬学* **43**: 861-870, 2000
 - 10) **伊藤節子, 宇理須厚雄, 各務美智子ほか**: 自動分析装置によるヒスタミン遊離試験の臨床的有用性の検討. *医と薬学* **59**: 917-924, 2008
 - 11) **佐藤さくら, 伊藤浩明, 宇理須厚雄ほか**: 好塩基球ヒスタミン遊離試験「アラポート HRT」の鶏卵アレルギー診断への有用性 (多施設共同研究). *アレルギー* **64**: 136-148, 2015
 - 12) **伊藤浩明, 佐藤さくら, 宇理須厚雄ほか**: 好塩基球ヒスタミン遊離試験における自然ヒスタミン遊離率と low responder に関する検討. *アレルギー* **65**: 48-56, 2016
 - 13) **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
 - 14) **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
 - 15) **福富 悌, 篠田紳司, 寺元貴英ほか**: 免疫・アレルギー・喘息 食物除去解除時におけるヒスタミン遊離試験の有用性の検討. *小児臨* **55**: 1415-1419, 2002
 - 16) **東 範彦, 國井優子, 野中早苗ほか**: 食物アレルギーの診断 食物負荷試験におけるヒスタミン遊離試験の有用性. *アレルギー* **63**: 521, 2014